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

Einfluss des NF-κB-Signalwegs auf die Wirkung von HDAC-Inhibitoren in Urothelkarzinomzellen

**Dissertation** 

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

> vorgelegt von Inka Nina Müller 2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg

## Zusammenfassung

Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDAC-Inhibitoren, HDACi) stellen eine neuartige Therapieoption beim Urothelkarzinom (UC) dar. Während sie sich bei anderen Tumorentitäten bereits in der klinischen Studienphase befinden oder schon zur Therapie zugelassen wurden, blieb ihre Wirkung im invasiven Urothelkarzinom bisher hinter den Erwartungen zurück. Vorarbeiten des Urologischen Forschungslabors der HHU zeigten, dass UC-Zelllinien (UCC) unter der Behandlung mit dem Pan-HDACi SAHA (Vorinostat, Zolinza) die Apoptose umgingen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der unter SAHA detektierten Induktion von Zellzyklusregulatoren, wie p21<sup>CIP1</sup> und Cyclin D1, und des Inhibitors der intrinsischen Apoptose BCL-XL liegen. Da diese Faktoren von Zielgenen des klassischen NF-κB-Signalwegs kodiert werden, wurde in dieser Dissertation untersucht, ob SAHA tatsächlich den klassischen NF-κB-Signalweg aktiviert und eruiert, ob die Kombination von HDACi mit NF-κB-Signalweg-Inhibitoren eine Therapieoption für das UC bietet.

Hierfür wurde die Aktivität des klassischen NF-κB-Signalwegs in mehreren UCC unter basalen Bedingungen, nach Aktivierung mit dem bekannten Induktor TNFα, nach Inhibition des Signalwegs auf der Stufe der IκBα-Phosphorylierung durch Bay11-7082 oder Bay11-7085 und nach Behandlung mit SAHA bestimmt. Dazu wurde die Translokation der beiden wichtigsten Transkriptionsfaktoren des klassischen NF-κB-Signalwegs, ReIA (p65) und NFκB1 (p50), in den Nukleus immunzytochemisch verfolgt, die Gesamtexpression von ReIA (p65) und seines Inhibitors IκBα auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse gemessen und das mRNA-Expressionsniveau der NF-κB-Zielgene *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CCND1* (Cyclin D1), *BCL2L1* (BCL-XL), *CXCL8* (IL8), *XIAP* (XIAP) und *BIRC5* (Survivin) mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

Zu Beginn dieser Arbeit konnten die vorbeschriebenen Effekte der SAHA-Behandlung auf benigne Urothelzellen und UCC reproduziert werden. Demnach wirkte SAHA erst in hohen Konzentrationen ( $\geq$  5 µM) deutlich zytotoxisch und Apoptosezeichen waren selten. Die Behandlung der UCC mit TNFα hatte fast ausnahmslos die erwarteten Wirkungen, wie Translokation von RelA in den Nukleus, Induktion der IkBα-Degradation und erhöhte Expression der Zielgene, mit Ausnahme von *BIRC5*. Basal war RelA im Nukleus nicht nachzuweisen. SAHA führte ebenfalls zu Translokationen von RelA und p50 in den Zellkern, jedoch generell schwächer und zelllinienabhängig. SAHA verminderte in allen drei UCC die Menge von IkBα. Auf mRNA-Ebene induzierte SAHA zelllinienübergreifend die Genexpression von *CDKN1A* und *CXCL8* signifikant, reprimierte jedoch *XIAP* und *BIRC5*. Die Wirkung von SAHA auf *CCND1* und *BCL2L1* hing von der Zelllinie ab. Bay11-7082 hemmte erwartungsgemäß die Wirkungen von TNFα, nahm jedoch keinen Einfluss auf die von SAHA induzierten Effekte.

Schließlich wurde die Wirkung von NF-κB-Inhibitoren allein und in Kombination mit SAHA auf die UCC untersucht. Die Blockierung des Signalwegs durch Bay11-7082, Bay11-7085 oder Bortezomib verminderte die Zahl vitaler Zellen in allen UCC. Apoptosezeichen waren unter Bay11-7082 sehr selten, lediglich eine UCC wies morphologische Zeichen der Apoptoseinduktion auf. Auf mRNA-Ebene reprimierte Bay11-7082 zelllinienunabhängig die Expression von *XIAP* und *BIRC5*, induzierte *CDKN1A* und *CXCL8* und nahm keinen Einfluss auf die Expression von *BCL2L1*. Allein die Wirkung auf *CCND1* hing von der Zelllinie ab. Die Kombination von SAHA mit Bay11-7082 ergab weder in den Zellvitalitätsassays noch in der quantitativen RT-PCR einen mehr als additiven Effekt, ebenso wenig wie in der Kombination mit dem 26S-Proteasominhibitor Bortezomib.

Zusammenfassend lässt sich die Frage nach einer wesentlichen Aktivierung des kanonischen NF-κB-Signalwegs durch SAHA verneinen, auch wenn der HDACi zum Teil auf die gleichen Zielgene wie TNFα wirkt. Die unzureichende Wirkung von SAHA auf die UCC beruht demnach nicht auf einer Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs. Inhibitoren des NF-κB-Signalwegs wirken zytotoxisch, jedoch nicht synergistisch mit SAHA.

## Summary

Inhibitors of histone deacetylases (HDAC inhibitors, HDACi) are being investigated as a novel therapeutic option in urothelial carcinoma (UC). However, whereas some HDACi have entered clinical studies or even clinical practice for other tumor entities, their efficacy in UC has been unsatisfactory so far. Previous work in the HHU urological research lab has suggested that UC cell lines (UCC) escape apoptosis activation by the pan-HDACi SAHA (Vorinostat, Zolinza), possibly as a consequence of induction of the cell cycle regulators p21<sup>CIP1</sup> and Cyclin D1 as well as the apoptosis inhibitor BCL-XL by SAHA. These three factors are encoded by target genes of the canonical NF-κB pathway. Therefore, the present thesis addressed the idea that SAHA may activate this pathway and that the combination of HDACi with NF-κB pathway inhibitors might thus enhance their efficacy for UC therapy.

To address these questions, the activity of the canonical NF- $\kappa$ B pathway was investigated under standard culture conditions, following its activation with its established activator TNF $\alpha$ , its inhibition at the step of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation by Bay11-7082 or Bay11-7085, and following treatment with SAHA. For that purpose, the nuclear translocation of the two most important transcription factors of the canonical NF- $\kappa$ B pathway, ReIA (p65) and NF $\kappa$ B1 (p50), was followed by immunocytochemistry, protein expression of ReIA (p65) and its inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  was determined by western blot analysis and mRNA expression of the NF- $\kappa$ B target genes *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CCND1* (Cyclin D1), *BCL2L1* (BCL-XL), *CXCL8* (IL8), *XIAP* (XIAP) and *BIRC5* (Survivin) was measured by qRT-PCR.

Initially, previously described effects of SAHA on benign urothelial cells and UCC were replicated. As expected, only high SAHA concentrations ( $\geq$  5 µM) were cytotoxic and little apoptosis was apparent. Treatment of UCC with TNF $\alpha$  almost throughout exerted the expected effects, including translocation of RelA into the nucleus, degradation of IkB $\alpha$  and increased expression of target genes, with the exception of *BIRC5*. Notably, RelA was not detectable in the nuclei under basal growth conditions. SAHA likewise induced RelA nuclear translocation, but much more weakly than TNF $\alpha$ , and in a cell line-dependent manner. Across all cell lines, SAHA induced expression of *CDKN1A* and *CXCL8*, but repressed *XIAP* and *BIRC5*. Effects on *CCND1* and *BCL2L1* were cell line-dependent. Bay11-7082 blocked TNF $\alpha$  effects, as expected, but did not influence those of SAHA.

Blocking NF-κB signaling by Bay11-7082, Bay11-7085 or bortezomib decreased cell viability in all UCC. Except for one UCC, signs of apoptosis were not evident. Bay11-7082 repressed *XIAP* and *BIRC5* expression across all cell lines, induced *CDKN1A* and *CXCL8*, but did not influence *BCL2L1* expression. Effects on *CCND1* differed among the cell lines. Combining SAHA with Bay11-7082 did not yield more than additive effects on cell viability or gene expression, likewise the combination of SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib.

In conclusion, SAHA does not appear to significantly activate NF-κB signaling, even though target genes overlap. The limited efficacy of SAHA in UCC is thus not due to activation of the canonical NF-κB pathway. Inhibitors of the pathway are cytotoxic in UCC, but do not act in a synergistic fashion with SAHA.

# Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	EDTA	Ethylendiamin-
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra		tetraessigsäure
	large (Bcl2-like 1 isoform 1)	EGF	epidermal growth factor
BIRC4	baculoviral IAP repeat-	E/M	epidermal/mesenchymal
	containing protein 4 (X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) /	FACS	fluorescence-activated cell sorting
	Inhibitor of apoptosis	FCS	fetal calt serum, Fötales
BIRC5	baculoviral IAP repeat-		(hitzeinaktiviert)
	containing protein 5	FITC	Fluorescein isothiocyanate
	(Surviviri)	Fwd	forward
BPE	bovine pituitary extract (Rinderhypophysen-	HADC	Histondeacetylase
	extrakt)	HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
BSA	Bovines Serumalbumin	НАТ	Histonacetyltransferasen
CCND1	Cyclin D1	HG	high-grade
cDNA	komplementäre Desoxy- ribonukleinsäure	HGC	high-grade carzinoma
CDK	cyclin-dependent kinase	HSP90	heat shock protein 90
Cis	Carcinoma in situ	ΙκΒ	Inhibitor of NF-KB
DAPI	4'-6-Diamidino-2-	IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
	phenylindol	IL8	Interleukin 8
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Keratino- cyte FM	Keratinocyte Serum free Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid	LK	Lymphknoten
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LG	low-grade
DOC	Desoxycholat		

Abkürzungsverzeichnis

LGC	low-grade carzinoma	РСа	Prostatakarzinom
MWU-Test MSK1	Mann-Whitney-U-Test mitogen- and	PCAF	P300/CBP-associated factor, K (lysine) acetyltransferase
NEMO	NF-kappa-B essential modulator, inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma	PCR PKA <sub>c</sub>	2B (KAT2B) Polymerase- Kettenreaktion cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit
NEF	(IKK-γ), IKBKG nuclear export sequence	РКСζ	Protein kinase C zeta
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light- chain-enhancer' of	ΡΜΑ	Phorbol 12-myristate 13- acetate
	activated B-cells	PP2A	Protein Phosphatase 2A
NLS	Kernlokalisierungs- sequenz, nuclear	PRR	pattern recognition receptors
	(NLS)	PUNLMP	Papilläre urotheliale Neoplasie mit geringem
ninge	Urothelkarzinom, hochgradig (high-grade)	PVDF- Membran	Polyvinylidenfluorid- Membran
niLGC	Nicht-invasives papilläres Urothelkarzinom,	RHD	Rel-Homologie-Domäne
		KeV	reverse
NSCLC	non small cell lung carcinoma, nicht-klein- zelliges Lungenkarzinom	RNA rpm	Ribonukleinsäure rotations per minute
NP-40	Nonident-40	RT	Raumtemperatur
p21 <sup>CIP1</sup>	cyclin-dependent kinase (CDK)-Inhibitor 1	SAHA	Suberoylanilid- hydroxaminsäure, Pan-HDAC-Inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline		(Vorinostat, Zolinzà)

Abkürzungsverzeichnis

SDS	sodium dodecylsulfate,	UD	Urotheliale Dysplasie
	Natriumdodecylsulfat	UICC	Union internationale
TAD	transkriptionsaktivierende		contre le cancer,
	Domäne		internationale Union gegen
ТВР	TATA-binding protein		den Krebs
TBS-Puffer	Tris-huffered saline	UP	Urotheliale Primärkultur
		UPUMP	Urotheliale Proliferation
TBS-T-Puffer	Tris-buffered saline with	•••••	mit unklarem malignem
	Tween20		Potential
тсс	Transitionalzellkarzinom		
		Vorinostat	Pan-HDAC-Inhibitor (siehe
TERT-NHUC	Telomerase immortalisierte		SAHA)
	normale humane	WHO	World Health Organization,
	Urothelzellen		Weltgesundheits-
TNM-	Klassifikation nach		organisation
Klassifikation	T=Tumor, N=Nodes,	VIAD	V linked inhibitor of
	Lymphknoten und	XIAP	
	M=Metastasen		apoptosis protein /
Iris	Tris-(Hydroxymethyl)		protein 3 (IAP3))
	aminomethan	ZBG	Zink binding group
TUR-B	Transurethrale Resektion	7fKD	Zentrum für Krehs-
	der Harnblase		registerdaten am Robert
τςα	Trichostatin A		Koch-Institut Deutschland

# Inhaltsverzeichnis

1		Einleitung	1
	1.1	Das Urothelkarzinom	1
	1.2	Epigenetik	5
	1.3	Histon-Deacetylasen	6
	1.4	Histon-Deacetylase-Inhibitoren	8
	1.5	Der NF-кB-Signalweg1	1
	1.6	Inhibitoren des NF-кB-Signalwegs1	5
	1.6	.1 Bay11-7082 und Bay11-70851	5
	1.6	.2 Bortezomib	5
	1.7	Zielgene des NF-кB-Signalwegs1	6
	1.7	.1 CCND1 (Cyclin D1)	6
	1.7	12 CDKN1A (p21 <sup>CIP1</sup> )	7
	1.7	.3 <i>BCL2L1</i> (BCLX)	8
	1.7	.4 CXCL8 (IL8)	9
	1.7	.5 XIAP (XIAP) und BIRC5 (Survivin)	D
	1.8	Ziele der Arbeit	2
2		Material	4
	2.1	Zelllinien24	4
	2.2	Medien und Zusätze	5
	2.3	Chemikalien2	5
	2.4	Puffer	7
	2.5	Verwendete Kits	8
	2.6	Programme22	8
	2.7	Primer	8
	2.8	Antikörper29	9
	2.8	.1 Antikörper Western Blot	9
	2.8	2 Antikorner Immuncytochemie 3	ñ
	<b>2.9</b>	Geräte	0
3		Methoden	1
	_		
	3.1	Zellkultivierung und Passagierung	1
	3.2	Darstellung morphologischer Veränderungen nach Behandlung der Urothelkarzinom- zellen mit SAHA und Bay11-7082/-85	1
	3.3	Zellproliferationsmessung mittels CellTiterGlow <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assav	2
	2 4		2
	3.4	Immuncytocnemie	3
	3.4	.1 Versuchsaufbau	3

<ul> <li>3.5.1 Herstellung des Protein-Lysats</li> <li>3.5.2 Fraktionierte Proteinlysate</li> <li>3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay</li> <li>3.6 Western Blot</li> <li>3.6.1 Gel-Elektrophorese</li> <li>3.6.2 Blotting und Detektion</li> <li>3.7 RNA-Isolation</li> <li>3.8 RT-PCR</li> <li>3.8.1 cDNA-Synthese durch reverse Transkription</li> <li>3.8.2 Quantitative Real-time PCR</li> <li>3.9 Durchflusszytometrie</li> <li>4 Ergebnisse</li> <li>4.1 Reproduktion der SAHA-induzierten Effekte auf ausgewählte Zelllinien</li> <li>4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität</li> <li>4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA</li> <li>4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA</li> <li>4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene</li> </ul>	
<ul> <li>3.5.2 Fraktionierte Proteinlysate</li></ul>	
<ul> <li>3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay</li> <li>3.6 Western Blot</li> <li>3.6.1 Gel-Elektrophorese</li> <li>3.6.2 Blotting und Detektion</li> <li>3.7 RNA-Isolation</li> <li>3.8 RT-PCR</li> <li>3.8.1 cDNA-Synthese durch reverse Transkription</li> <li>3.8.2 Quantitative Real-time PCR</li> <li>3.9 Durchflusszytometrie</li> <li>4 Ergebnisse</li> <li>4 Ergebnisse</li> <li>4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität</li> <li>4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA</li> <li>4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA</li> <li>4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene</li> </ul>	
<ul> <li>3.6 Western Blot</li></ul>	
<ul> <li>3.6.1 Gel-Elektrophorese</li></ul>	
<ul> <li>3.6.2 Blotting und Detektion</li></ul>	
<ul> <li>3.7 RNA-Isolation</li></ul>	
<ul> <li>3.8 RT-PCR</li> <li>3.8.1 cDNA-Synthese durch reverse Transkription</li> <li>3.8.2 Quantitative Real-time PCR</li> <li>3.9 Durchflusszytometrie</li> <li>4 Ergebnisse</li> <li>4 4 Ergebnisse</li> <li>4.1 Reproduktion der SAHA-induzierten Effekte auf ausgewählte Zelllinien</li> <li>4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität</li> <li>4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA</li> <li>4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA</li> <li>4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene</li> </ul>	
<ul> <li>3.8.1 cDNA-Synthese durch reverse Transkription</li></ul>	
<ul> <li>3.8.2 Quantitative Real-time PCR</li> <li>3.9 Durchflusszytometrie</li></ul>	
<ul> <li>3.9 Durchflusszytometrie</li></ul>	
<ul> <li>4 Ergebnisse</li> <li>4.1 Reproduktion der SAHA-induzierten Effekte auf ausgewählte Zelllinien</li> <li>4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität</li> <li>4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA</li> <li>4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA</li> <li>4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene</li> </ul>	<i>39</i>
<ul> <li>4.1 Reproduktion der SAHA-induzierten Effekte auf ausgewählte Zelllinien</li></ul>	
<ul> <li>4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität</li></ul>	
<ul> <li>4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA</li></ul>	
<ul> <li>4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA</li> <li>4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene</li> </ul>	40
4.2 Hinweise auf die NF-кB-Aktivierung auf Proteinebene	41
4.2 Hinweise dur die NF-KD-Aktivierung dur Proteinebene	42
4.2.1 Intrazollulära Lakalisation der Proteine PolA und p50 in Uratholkarzinemzelllinien	
4.2.1 Intrazentiale Lokalisation der Proteine ReiA und p50 in Orotnerkalzmonizeninnen	42
4.2.2 Effekte von SARA auf die Expression von ikbu und keia in orotheikarzhomzeninnen	
4.3 Immunfluoreszenz	
4.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von RelA in unbehandelten Zelllinien	45
4.3.2 Effekte der SAHA-Behandlung auf die intrazelluläre Lokalisation von RelA und NF-κB1 (	p50) 46
4.3.3 Molekularer Wirknachweis von Bay11-7082	49
4.4 RT-PCR Analyse der Expression von NF-кВ-Zielgenen	
4.5 Wirkung der Behandlung von Urothelkarzinomzelllinien mit Bay11-7082 und	
Bay11-7085	57
4.5.1 Effekte von IKK-Inhibitoren auf die Vitalität der Urothelkarzinomzelllinien	57
4.5.2 Morphologische Veränderungen der Urothelkarzinomzelllinien unter der Therapie mit	dem
selektiven NF-kB-Inhibitor Bay11-7082	59
4.5.3 Bestimmung der Apoptoserate durch Durchflusszytometrie nach IKK-Inhibition	60
4.6 Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit einer Kombination aus SAHA und	
Bay11-7082	60
4.6.1 Dosiswirkungskurve der Kombinationstherapie mit SAHA und Bay11-7082	61
4.7 Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit dem Proteasominhibitor Bortezom	ıib 62
4.7.1 Effekte der Bortezomib-Behandlung auf die Zellvitalität	62
4.7.2 Dosiswirkungskurve der Kombinationstherapie mit SAHA und Bortezomib	63
5 Diskussion	65
5.1 Wirkung von SAHA	65
5.2 Aktivität des NF-κB-Signalwegs im Urothelkarzinom	73

## 1 Einleitung

## 1.1 Das Urothelkarzinom

Beim Urothelkarzinom handelt es sich um eine Neoplasie der Transitionalzellen des Harntraktes, dem sogenannten Urothel. Das auch als Übergangsepithel bezeichnete Urothel kleidet den gesamten Harntrakt von den Nierenkelchen bis in die proximale Harnröhre aus. Es stellt die Grenzschicht nach luminal dar und ist histologisch betrachtet eine Sonderform des prismatischen Epithelgewebes. Sein mehrschichtiger und damit dehnfähiger Aufbau aus drei bis acht Einzelschichten ermöglicht es dem Gewebe sich an die wechselnden Füllungszustände des Harntraktes anzupassen. Die apikal gelegenen, zum Teil sehr großen, di- oder sogar polyploiden Deckzellen verleihen dem Urothel unter dem Mikroskop sein typisches Aussehen. Maligne entartete Transitionalzellen kommen im gesamten Harntrakt vor, zeigen jedoch eine deutliche Häufung in der Harnblase (95%). Man vermutet, dass die Kontaktzeit des Harns und der darin enthaltenen Noxen mit dem Oberflächenepithel eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung maligner Tumoren spielt, so dass wahrscheinlich auch die Urinstase und die Restharnbildung ein Auftreten begünstigen<sup>1</sup>. In den restlichen 5% der Fälle tritt das Urothelkarzinom im Nierenbeckenkelchsystem und im Harnleiter, im Verhältnis 3:1, auf.

In der Rangliste der weltweit häufigsten Krebserkrankungen liegen die malignen Neoplasien des Harntraktes auf Rang 5<sup>2</sup>. Am weitaus häufigsten handelt es sich dabei um Urothelkarzinome, welche für 94% aller Harnblasenkarzinome verantwortlich sind<sup>3</sup>. Das Harnblasenkarzinom, als vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes<sup>4</sup>, hat eine weltweit hohe, in den letzten Jahren aber weitestgehend stabile Inzidenz mit deutlichen Unterschieden zwischen einzelnen Ländern. So ist die Rate der neu aufgetretenen Erkrankungen in der westlichen Welt am höchsten, in den asiatischen Ländern am niedrigsten<sup>5</sup>. Mit einer altersstandardisierten Rate der Neuerkrankungen von 19,1 für Männer und von 4,0 für Frauen pro 100.000 Personen/Jahr besitzt die Europäischen Union eine der weltweit höchsten Inzidenzraten, wobei auch hier deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedsstaaten vorliegen<sup>6,7</sup>. Nach Schätzungen des ZfKD betrug die altersstandardisierte Inzidenz in Deutschland 35,5 bzw. 8,9/100.000 (22.430 Männer, 7100 Frauen) Einwohner im Jahr 2014<sup>3</sup>. Trotz des seit 1999 in Deutschland verzeichneten Rückgangs von Neuerkrankungen des invasiven Harnblasenkarzinoms um etwa 20% bei Männern, beziehungsweise um 10% bei Frauen, ist es immer noch für etwas mehr als die Hälfte der neu registrierten Fälle verantwortlich (11.680 Männern bzw. 4170 Frauen)<sup>3</sup>. Die altersstandardisierte Sterberate für deutsche Männer bzw. Frauen lag im Jahr 2015 bei 5,7 bzw. 1,8/100.000 Einwohnern<sup>3</sup>.

Der bedeutendste Risikofaktor für die Ausbildung eines Harnblasenkarzinoms ist der Tabakkonsum. Er gilt in etwa 50% der Fälle als Auslöser<sup>5,6,8–10</sup> und wird für 40% aller durch ein Harnblasenkarzinom verursachten Todesfälle verantwortlich gemacht<sup>7</sup>. Sein Rückgang innerhalb der letzten Jahrzehnte, insbesondere in Nordamerika und vielen europäischen Ländern, wird als eine der Hauptursachen für die sinkenden Neuerkrankungsraten angesehen<sup>7</sup>. Aromatische Amine (insbesondere Benzidin, 4-Aminobiphenyl, 4-Chlor-o-Toluidin, 2-Naphthylamin) sowie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und chlorierte Kohlenwasserstoffe gelten im Rahmen beruflicher Exposition als zweithäufigste Ursache für die Ausbildung eines malignen Harnblasentumors<sup>6,11</sup>. Man geht davon aus, dass hierzu eine Exposition über mindestens 2 Jahre nötig ist<sup>1</sup>. Verwendung finden diese Karzinogene in Farben und Lacken, bei der Gummiherstellung und in der Aluminiumindustrie<sup>7</sup>. In älteren Studien wurde der berufliche Kontakt mit den Noxen noch für rund 20% der Fälle verantwortlich gemacht<sup>11</sup>, durch verbesserten Arbeitsschutz konnte in den letzten Jahren ein Rückgang auf knapp 10% verzeichnet werden<sup>6,11</sup>. Die Latenzzeit bis zum Auftreten erster Tumore kann zwischen 5 und 40 Jahre betragen und ist von der Expositionsdauer und -intensität abhängig<sup>1</sup>. Als prädisponierend gelten weiterhin die Einnahme bestimmter Medikamente, wie Cyclophosphamid, Chlornaphazin, Phenazetin und Aristolochiasäure (in Heilkräutermischungen)<sup>12</sup>, chronische Entzündungen<sup>11,12</sup> und die Schistosomiasis/Bilharziose (Infektion mit S. haematobium)<sup>11</sup>. Erwiesenermaßen treten maligne Blasenneoplasien auch nach einer Bestrahlung des kleinen Beckens auf, die Latenz beträgt hier in der Regel mehrere Jahre<sup>12</sup>. Verschiedene Studien weisen zudem auf genetische Faktoren, wie die weniger aktiven Allele der N-Acetyltransferase 2 (NAT2)<sup>7,11</sup> und Glutathiontransferase mu 1 (GSTM1) Null-Genotypen als prädisponierend für die Entstehung maligner Neoplasien hin. Sie stellen kein eigenes spezifisches Risiko für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms dar, sondern erhöhen in Kombination mit entsprechenden Noxen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens<sup>11</sup>.

Das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter linear an<sup>3</sup>, wobei Männer etwa drei- bis viermal so häufig betroffen sind wie Frauen<sup>5</sup>. Laut einer 2018 veröffentlichten Studie liegt das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland aktuell bei 75 Jahren (invasive Form: Männer 76 J / Frauen 74 J; nicht invasive Form 72 J für beide Geschlechter)<sup>3</sup>.

In seltenen Fällen kommen neben dem bereits erwähnten Urothelkarzinom auch andere maligne Tumore in der Harnblase vor. Hierzu zählt neben dem Plattenepithelkarzinom das Adenokarzinom. Laut neuester Zahlen aus Deutschland machen diese jeweils knapp 1% der malignen Blasentumore aus. Interessanterweise kommen diese nicht-urothelialen Karzinome bei Frauen mit 3,1% bzw. 1,4% häufiger vor als bei Männer mit 0,6% bzw. 0,7% <sup>3</sup>.

Klinisch treten Harnwegstumore typischerweise in Form einer Mikro- bzw. schmerzlosen Makrohämaturie, unspezifischer Reizsymptome wie Pollakisurie, Dysurie oder einer Drangsymptomatik in Erscheinung<sup>12,13</sup>. Zur Primärdiagnostik sollte standardmäßig eine Zystoskopie der Harnblase mit histologischer Sicherung auffällig imponierender Areale erfolgen<sup>12</sup>. Dabei ist zu beachten, dass Blasenkarzinome in 50% der Fälle multifokal auftreten und am häufigsten im Bereich der Seiten- und Hinterwand (70%) lokalisiert sind. In gerade einmal 20% der Fälle ist der Bereich des Blasenhalses oder das Trigonums betroffen, am seltensten die Vorderwand (10%)<sup>14</sup>.

Da etwa 2-4% aller Patienten mit einem gesicherten Harnblasenkarzinom bei Diagnosestellung einen Zweittumor im oberen Harntrakt aufweisen<sup>15,13</sup>, wird insbesondere beim nicht-invasiven Urothelkarzinom mit initial bereits multifokalem Auftreten und/oder einer Lokalisation im Bereich des Trigonums und/oder bei einem *high-grade*-Tumor eine zusätzliche Abklärung des oberen Harntraktes über die routinemäßige Sonographie hinaus empfohlen<sup>12</sup>.

Kann ein Tumor nachgewiesen werden, sollte zur weiteren Diagnostik eine sog. differenzierte transurethrale Resektion erfolgen, bei der nicht nur die sichtbaren Tumoranteile zur histopathologischen Beurteilung abgetragen werden, sondern darüber hinaus auch separate Proben der Tumorränder und des Tumorgrunds gewonnen werden. Mit der vollständigen Tumorresektion wird zudem ein kurativer Behandlungsansatz verfolgt<sup>15</sup>.

Das *Staging* der Urothelkarzinome erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der UICC *(Union internationale contre le cancer)* von 2017. Für das *Grading* wird die Klassifikation der WHO verwendet. Im Jahr 2016 veröffentlichte die WHO ihre neuste Klassifikation zur histopathologischen Einteilung uro-genitaler Tumore. Bereits 2004 hatte eine von Grund auf neue Klassifikation die bis dahin gebräuchliche Einteilung von 1973 abgelöst. Statt der Jahrzehnte lang verwendeten Einteilung in Grad 1-3, die aufgrund der großen Heterogenität der G2-Tumore eine Herausforderung für Therapieempfehlungen darstellte, wurde mit der aktuellen Klassifikation eine klare und präzise Unterscheidung zwischen *high-grade* (HG)- und *low-grade* (LG)-Tumoren ermöglicht und damit stärker homogene Tumorgruppen gebildet. Der Begriff "nicht-invasiv" wurde ebenfalls neu mit in die Klassifikation aufgenommen. Mit ihm soll eine eindeutige Trennung der papillären LG- und HG-Tumore von den invasiven Urothelkarzinomen geschaffen werden<sup>2,16</sup>.

Mit mehr als 70% kommen die nicht-invasiven Urothelkarzinome (pTa, pTcis, pT1) am häufigsten vor. Trotz ihrer sehr hohen Rezidivraten von 50-70%<sup>13</sup> ist ihre Prognose gut, da sich nur 15-20% im Verlauf zum muskelinvasiven Wachstum weiter entwickeln<sup>11,13,17</sup>. Entscheidend für den weiteren Verlauf ist das *Grading* und hier insbesondere die

Klassifikation in LGC und HGC. LG-Tumore wie das pTaLG und die PUNLMP haben zwar hohe Rezidivraten (PUNLMP 35%) allerdings fast nie einen Progress mit invasivem Wachstum<sup>2</sup>. Die Progressionsrate der aggressiveren HG-Tumore liegt dagegen bei 50-65%<sup>18</sup>. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei ist die Invasion der Lamina propria. Wird sie vom Tumor infiltriert, geht dies mit einem erhöhten Risiko für eine Progression der Erkrankung und verkürztem Überleben einher<sup>13</sup>.

Muskelinvasive Tumore (≥pT2) machen 25-30% aller Urothelkarzinome bei Diagnosestellung aus<sup>11,13,17</sup>. 25% der Patienten weisen zu diesem Zeitpunkt bereits Lymphknotenmetastasen auf, 5% haben Fernmetastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumor liegt gerade einmal bei 15%<sup>17</sup>.

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms ist abhängig vom Staging und Grading, wobei insbesondere bei den nicht-invasiven Tumoren das Grading therapieentscheidend ist. Im Anschluss an die initiale TUR-B empfielt die EAU in Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven bzw. der Progressionsneigung der Neoplasien eine adjuvante intravesikale Instillationtherapie und hat hierzu eine entsprechende risikoadaptierte Therapieempfehlung herausgegeben. Für "Low-risk"-Tumoren stellt die einmalige Frühinstillation von Mitomycin C (MMC) die alleinige adjuvante Therapie dar. Sie soll die Tumorzellimplantation in der Folge der TUR verhindern. Die Rezidivrate kann damit von 59% auf 45% reduziert werden. Bei "Intermediate-risk"-Tumoren wird zusätzlich eine weiterführende Instillationstherapie in Form einer Erhaltungstherapie über 1 Jahr empfohlen<sup>19</sup>. Neben dem Chemotherapeutikum Mitomycin C wird der Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guérin) verwendet, dessen immunmodulatorische Effekte nachweislich zu einer signifikanten Reduktion der Rezidiv- und Progressionsrate führen<sup>19</sup>. Die Therapie der Wahl bei "High-risk"-Tumoren stellt die BCG-Immuntherapie mit einer Erhaltungstherapie über 1-3 Jahre dar<sup>12,19</sup>. Kommt es zu einem Frührezidiv oder einer Tumorpersistenz unter der Therapie, sollte eine Zystektomie durchgeführt werden<sup>12</sup>. Jeder Patient mit einem nicht-invasiven UC bedarf einer engmaschigen, dem individuellen Risiko angepassten lebenslangen Nachsorge<sup>15</sup>.

Der Goldstandard bei der Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie. Aufgrund eines Infiltrationsrisikos der umliegenden Organe werden beim Mann standardmäßig auch die Prostata und die Samenblasen entfernt, bei der Frau der Uterus. Die Entscheidung über die Resektion der vorderen Vaginalwand und/oder der Adnektomie kann individuell in Abhängigkeit von der Lokalisation des Blasenkarzinoms und des Menopausenstatus der Patientin getroffen weden<sup>12</sup>. Trotz radikaler Therapie ist die Prognose schlecht; innerhalb von 2 Jahren nach

der Operation entwickeln 5-15% der Patienten ein Lokalrezidiv und bis zu 50% der Patienten weisen Fernmetastasen auf<sup>6</sup>. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei  $\leq$  pT2-Tumoren beträgt etwa 75% und liegt bei organüberschreitendem Wachstum ( $\geq$ pT3) bei ca. 50% (pT3) bzw. 36% (pT4)<sup>6</sup>. Ist der Lymphknotenstatus positiv, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom T-Stadium 25-50%<sup>20</sup>. Aufgrund eines in Metaanalysen bisher nicht nachweisbaren signifikanten Vorteils der adjuvanten Chemotherapie auf das Gesamtüberleben<sup>6</sup>, sollte die Indikationsstellung individuell anhand strenger Kriterien erfolgen und Patienten mit einem hohen Progressionsrisiko vorbehalten bleiben<sup>15</sup>. Wichtig ist hierbei die Verwendung von Cisplatin-haltigen Kombinationstherapien, wobei auch sie das mediane Gesamtüberleben von 6 Monaten lediglich auf 12-15 Monate verlängern können. Selbst die jahrelang als Standardtherapie des metastasierten Urothelkarzinom eingesetzte MVAC-Kombinationschemotherapie (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) führt bei gerade einmal 3,7% der Patienten zu einer Tumorfreiheit nach 6 Jahren<sup>20</sup>.

In Anbetracht dieser Fakten wird deutlich, wie wichtig neue Behandlungsansätze für die Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinom sind und wie dringend sie benötigt werden.

## 1.2 Epigenetik

Zu den Mechanismen der Krebsentstehung und der Tumorprogression gehören neben genetischen Mutationen auch ausgeprägte epigenetische Veränderungen. Diese können neben DNA-Methylierung, diversen Histonmodifikationen und Chromatinremodellierung auch lange nicht-kodierende RNAs (IncRNAs) und microRNAs betreffen<sup>21–24</sup> und bedingen eine stabil geänderte Genaktivität. Speziell für das Urothelkarzinom wurde in mehreren Studien eine stark ausgeprägte, alle Tumorstadien umfassende DNA-Hypomethylierung (insbesondere der LINE-1-Retrotransposons)<sup>22,23,25</sup> und in ihrer Aktivität veränderten Histon-Acetyltransferasen/-Deacetylasen und Histon-Methyltransferasen/-Demethylasen nachgewiesen<sup>23</sup>. In fast allen Urothelkarzinomen finden sich Mutationen in wenigstens einem Gen, das für Histonmethylasen (besonders KMT2C/D), Histondemethylasen (besonders KDM6A) oder Histonacetyltransferasen (besonders CEBBP/EP300) kodiert<sup>24</sup>. Es wird angenommen, dass Veränderungen der DNA-Methylierung, Histonmodifikation und der nicht-kodierenden RNA zu Störungen der Zelldifferenzierung führen und mit einem erhöhtem metastatischen Potential einhergehen<sup>23</sup>. Wie Niegisch et al. in einem Übersichtsartikel zur Epigenetik des Urothelkarzinoms betonten<sup>22</sup>, weist das Urothelkarzinom von allen bisher untersuchten Tumorentitäten die meisten Mutationen epigenetischer Regulatorproteine auf. Betroffen sind hiervon nicht nur Proteine der Histonmodifikation, sondern auch der Chromatinremodellierung<sup>22,24</sup>.

In dieser Arbeit soll ein besonderes Augenmerk auf Histonacetylierungen als Histon-Modifikation gelegt werden, insbesondere auf die Histondeacetylasen, da sie aussichtsreiche Ansätze für neue Therapieoptionen bieten könnten.

#### 1.3 Histon-Deacetylasen

Die Acetylierung von Histonen – und ihre Deacetylierung – ist eine lange bekannte, gut erforschte posttranslationale Modifikation. Die Deacetylierung katalysieren Histondeacetylasen (HDACs), von denen im menschlichen Organismus bisher 18 Isoenzyme nachgewiesen wurden. Die Unterschiede zwischen den Isoenzymen liegen in ihrer zellulären Funktion, aber auch in ihrer Lokalisation<sup>26,27</sup>. Anhand ihrer Homologien zu den HDACs von Saccharomyces cerevisiae können sie in 4 Klassen unterteilt werden<sup>28</sup>. Klasse I umfasst HDAC 1, 2, 3, 8 und entspricht dem Rpd3 Gen. Klasse II entspricht dem Hda1 Gen und wird in Klasse IIa (HDAC 4, 5, 7, 9) und Klasse IIb (HDAC 6, 10) unterteilt. In Klasse III werden die Sirtuine zusammengefasst (SIRT 1-7), welche, im Gegensatz zu den Zinkabhängigen Metalloproteinen der anderen Klassen, von NAD<sup>+</sup>-abhängig sind und dem Sir2 Gen der Hefe entsprechen<sup>21,26,28–30</sup>. Die letzte Klasse, Klasse IV, enthält HDAC 11, welches strukturelle Anteile der Klasse I und II in sich vereint und daher einer eigenen Klassifizierung bedarf<sup>28,31,32</sup>.



SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; SIRT, sirtuin; TSA; trichostatin A: VPA, valproic acid.

**Abb. 1.1: Familie der Histondeacetylasen.** Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, (Bolden et al.<sup>28</sup>).

Histondeacetylasen katalysieren die Abspaltung der durch Histonacetyltransferasen angehängten Acetylgruppen von Histon-Lysinresten, meist an ihren flexibleren N-terminalen Enden. Die Deacetylierung führt über die Änderung der Ladung der Lysinreste zu einer erhöhten Affinität zwischen den Histonenden und dem negativ geladenen DNA-Grundgerüst, in dessen Folge das Chromatin kondensiert und die für die Transkription unerlässliche Interaktion zwischen Transkriptionsfaktor und Zielsequenz erschwert wird. HDACs reprimieren daher in der Regel die Transkription und darüber die Expression verschiedenartigster Gene. Neben der reinen Genrepression nehmen sie über die Veränderung der Chromatinstruktur weitreichenden Einfluss auf die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an regulatorische Regionen, unter anderem an Tumorsuppressorgenen und Genen für Proteine zur Zellzyklusregulation<sup>33</sup>.

Entgegen der initialen Annahme, dass HDACs ausschließlich Histone zum Substrat haben, konnten in den letzten Jahren immer mehr Nicht-Histon-Proteine identifiziert werden, die in ihrer Funktion durch eine HDAC-vermittelte Hypoacetylierung ihrer Lysinreste beeinflusst werden<sup>28,31,34</sup>. Beispielhaft seien hier c-Myc, BCL-6, NF- $\kappa$ B (RelA/p65), p53, HIF-1 $\alpha$ , STAT3, das Chaperon HSP90, das DNA-Reparaturenzym Ku70, der Androgen-Rezeptor und  $\alpha$ -Tubulin erwähnt<sup>31,35,36</sup>. Über solche Histon-unabhängigen Lysin-Deacetylierungen sind HDACs in der Lage, zusätzlich zu ihrer Schlüsselfunktion bei der Genexpression, auf eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie die Zellproliferation, Differenzierung und den Zelltod, Einfluss zu nehmen<sup>31</sup>.

Die über viele verschiedene Tumorentitäten hinweg erhobenen Daten weisen auf eine konsistente Dysregulation, oft Überexpression vieler Histondeacetylasen-Isoenzyme in maligne entarteten Zellen hin. Häufig steht eine HDAC-Überexpression im unmittelbaren Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für die Patienten. Dem aktuellen Wissensstand nach scheinen besonders die HDACs der Klassen I und II in der Kanzerogenese involviert zu sein<sup>26</sup>. Suraweera et al. wiesen beispielsweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen der hohen Expression von HDAC1, 2 und 3 und einer damit einhergehenden schlechten Prognose beim Magen- und Ovarialkarzinom hin<sup>21,37,38</sup>. Ebenso besteht eine direkte Assoziation zwischen der Überexpression von HDAC8 und fortgeschrittenen Tumorstadien bzw. geringen Überlebensraten bei Neuroblastom-Patienten<sup>21,39</sup>. Ein erhöhtes Expressionsniveau von HDAC1 geht mit einer schlechten Prognose beim Multiplen Myelom einher<sup>21,40</sup>.

Aufgrund dieser Zusammenhänge stellt die Inhibition von HDACs einen sehr vielversprechenden, neuen Ansatz für die Therapie maligner Erkrankungen dar.

## 1.4 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Unter dem Begriff der HDAC-Inhibitoren (HDACi) werden verschiedene Substanzen zusammengefasst, die ihre hemmende Wirkung zumeist über die Bindung des Zink-Ions im aktiven Zentrum der HDACs entfalten. Sie blockieren daher die Klassen I, II und IV der HDACs, also die Zink-abhängigen Metalloproteine, und lassen die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Sirtuine der Klasse III in ihrer Funktion unbeeinflusst. Die Gruppe der HDACi umfasst mehr als 15 verschiedene, in präklinischen und frühen klinischen Studien getestete Inhibitoren, denen allen eine Zink-bindende Domäne (ZBG) gemein ist, die sich ansonsten jedoch in ihrer chemischen Struktur und damit in ihrer Potenz und Spezifität gegenüber den einzelnen HDAC-Isoenzymen unterscheiden<sup>28,35,41,42</sup>. Neben einer Einteilung auf Basis ihres katalytischen Zentrums in Hydroxamsäuren, Benzamide, Carbonsäuren, Thiole und neueren ZBG<sup>42</sup>, bietet sich vor allem eine Einteilung anhand der durch sie blockierten HDAC-Isoenzyme an. Unter die Pan-HDACi mit einer Blockierung der Klassen I, II und IV fallen die Hydroxamsäuren (Trichostatin A (TSA), Vorinostat (SAHA), LAQ824, CBHA) und die Pyroxamsäuren (PXD101 und CRA-026440). Dem gegenüber stehen die vorwiegend Klasse I-spezifischen HDACi der Carbonsäuren (Valproinsäure und Natriumbutyrat), Benzamide (MS275, CL-994, MGCD0103), sowie die zyklischen Tetrapeptide (Trapoxin, Depsipeptid und Spiruchostatin A)<sup>26</sup>.

Die molekularen Mechanismen hinter der antitumoralen Wirkung der HDAC-Inhibition sind bis heute nur ansatzweise verstanden. Grundlegend und durch eine Vielzahl an Studien nachgewiesen ist, dass der größte Teil der durch HDAC-Inhibition bedingten Effekte auf einer Acetylierung bzw. Hyperacetylierung der Lysinreste von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen beruht und im Falle der Histone über eine offene Chromatinstruktur transkriptionsinduzierend wirkt. Auf diese Weise können HDACi über Tumorsuppressorgene oder die Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen Einfluss auf den Zellzyklus und den Zelltod ausüben. Als Beispiel für die Transkriptionsinduktion sei besonders p21<sup>CIP1</sup> angeführt, eines der am konsistentesten durch die HDAC-Inhibition induzierten Proteine, dessen Expressionsniveau unter der HDAC-Inhibition mit dem Grad der Acetylierung seiner Promotorregion korreliert<sup>31,43,44</sup>. In der Gesamtheit betrachtet, können die Effekte der HDAC-Inhibition als "pleiotrop" bezeichnet werden<sup>21,28,45</sup>, da sie in Abhängigkeit von der Funktion und Lokalisation des blockierten Enzyms zu einem Zellzyklusarrest<sup>28,31,33</sup>, Einleitung der intrinsischen oder extrinsischen Apoptose<sup>26,28,31,33</sup>, Zelltod durch Autophagie<sup>26,31</sup>, ROS-induziertem oder mitotischem Zelltod sowie Seneszenz führen können<sup>31</sup>. Xu et. al machen darauf aufmerksam, dass die Zellantwort zudem durch die Konzentration des verwendeten Medikamentes und der Expositionszeit beeinflussbar ist



und in einem nicht unerheblichen Teil vom "zellulären Kontext" abhängt<sup>31</sup>. Die Wirkungsweise kann also von Zelltyp zu Zelltyp und je nach Tumorart differieren.

**Abb. 1.2: Effekte der HDAC-Inhibition auf Histone und Nicht-Histon-Proteine.** Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, (Bolden et al.<sup>28</sup>).

Das große therapeutische Potential der HDACi steckt in weiten Teilen in der Induktion des programmierten Zelltods und hier vor allem in der Einleitung der intrinsischen Apoptose<sup>28,31</sup>. Infolge der Hemmung der HDAC-Isoenzyme kommt es zur Induktion der pro-apoptotischen Faktoren der BCL2-Familie, wie Bim<sup>46</sup>, Bmf<sup>35,47</sup>, Bax, Bak und Bik<sup>26,31,48,49</sup>, bei gleichzeitiger Repression der Gene für anti-apoptotischer Faktoren derselben Familie, wie Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w und Mcl-1<sup>31,48,49</sup> woraus ein Ungleichgewicht zugunsten der proapoptotischen Proteine resultiert. Daneben konnte die Transkriptionsrepression des *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP)<sup>31,49</sup>, eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies<sup>50</sup> als weitere Auslöser ausgemacht werden. Wie oben erwähnt, sind die Auswirkungen der HDACi auf die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine jedoch "zellkontextabhängig", auch, weil

diese – selbst innerhalb von Zelllinien der gleichen Tumorentität – in ihrem basalen Expressionsniveau stark variieren, weshalb die Effekte der HDACi ebenso unterschiedlich ausfallen<sup>31,48</sup>. Weiter üben HDACi über die Aktivierung von Todesrezeptoren und/oder einer erhöhte Expression von Todesrezeptoren, wie Fas, TNFR und TRAIL-Rezeptor<sup>28,35,51</sup> unmittelbaren Einfluss auf Apoptose-induzierende Signalwege aus.

Die Einflussnahme der HDACi auf den Zellzyklus betrifft pathologische und gesunde Zellen gleichermaßen und resultiert in der überwiegenden Zahl der Fälle in einem Zellzyklusarrest. Während i.A. niedrige Inhibitorkonzentrationen vorwiegend G1-Arreste induzieren, bedingen hohe Dosen einen zusätzlichen Stopp in der G2/M-Phase<sup>31,44</sup>. Bis auf wenige Ausnahmen greifen alle bisher getesteten HDACi in den Zellzyklus ein<sup>28,52</sup>. Als einer der Hauptmechanismen konnte die von p53 unabhängige Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> ausgemacht werden, welches über die Inhibition von Cyclin D / CDK4 die G1-Progression unterbindet<sup>35,44</sup>. Auch dadurch bedingt tritt eine Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRB) ein, in dessen Folge der Transkriptionsfaktor E2F blockiert und der Eintritt in die S-Phase unterbunden wird. Neben p21<sup>CIP1</sup> führt die Repression der Cycline D und A und die eingeschränkte Funktion von CDK2 und CDK4 zu einer Hypophosphorylierung des pRB<sup>28,44</sup>.

Seit 2006 hat die US *Food and Drug Administration* (FDA) vier verschiedene HDACi für klinische Studien zugelassen. Als erstes Medikament überhaupt wurde SAHA (Zolinzä, Vorinostat) 2006 für die Therapie des kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL) freigegeben. 2009 folgte FK228 (Romidepsin/Isodax) zur Behandlung von Patienten mit CTCL nach bereits erfolgter systemischer Therapie und 2014 PDX101 (Belinostat/Beleodaq) für die Behandlung des peripheren T-Zell-Lymphoms (PTCL). LBH589 (Panobinostat/Farydak) ist das neuste Medikament und wurde für die Therapie des Multiplen Myeloms im Jahr 2015 freigegeben<sup>21</sup>. Die ersten Studien lieferten vielversprechende Ergebnisse. So konnte bei Patienten mit einem kutanen T-Zelllymphom in einer groß angelegten Phase II Studie mit SAHA eine objektive Ansprechrate von 30% detektiert werden und unter der Therapie mit dem selektiven Klasse I HDACi FK228 eine objektive Ansprechrate von 32% erhoben werden<sup>26,53</sup>. Bei all den positiven Ergebnissen waren Resistenzen gegenüber HDAC-Inhibitoren von Beginn der Studien an ein häufig gesehenes Phänomen, welches bis heute immer noch weitgehend unklar ist<sup>21</sup>.

SAHA *(suberoylanilide hydroxamic acid),* auch bekannt unter dem Namen Vorinostat oder Zolinza, ist ein HDACi aus der Gruppen der Hydroxamsäuren mit selektiver Toxizität gegenüber Tumorzellen und guter oraler Bioverfügbarkeit. Über eine Bindung an das Zink-Ion im katalytischen Zentrum der Klasse I und II HDACs blockiert es diese in ihrer Funktion als Deacetylasen, wodurch acetylierte Histone und Nicht-Histon-Proteine akkumulieren. Wie für eine solche Substanz zu erwarten, führt SAHA, neben antiproliferativen Effekten als Folge einer Hyperacetylierung der Nicht-Histon-Proteine  $\alpha$ -Tubulin<sup>54</sup>, p53<sup>55</sup> und HSP90<sup>56</sup>, über eine Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> zu einem G1-Zellzyklusarrest und fördert über ein Ungleichgewicht zugunsten der pro-apoptotischen Proteine der BCL2-Familie den programmierten Zelltod<sup>35,44,47,49,57,58</sup>.

Unter laufender SAHA-Therapie traten als häufigste Nebenwirkungen Müdigkeit, Übelkeit und Durchfälle auf, seltener wurden Thrombozytopenien, schwere Anämien, Lungenembolien, Dehydratation sowie verlängerte QT-Zeiten beobachtet<sup>35,57,59</sup>.

#### 1.5 Der NF-κB-Signalweg

NF-κB ist die Abkürzung für "nukleären, an den Promotor leichter Kappa-Ketten der B-Lymphozyten bindenden Faktor" (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), bei dem es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um eine Familie sequenzspezifischer, dimerer Transkriptionsfaktoren handelt. Wie der Name verrät, wurden diese Faktoren zuerst in Lymphozyten entdeckt, sind jedoch in allen Zelltypen bedeutend.

Beim Menschen, wie auch bei anderen Säugetieren, besteht die NF-κB/Rel-Familie aus 5 bzw. 7 verschiedenen Proteinen, nämlich p50/p105 (NF-κB1), p52/p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB und c-Rel. Ihnen allen gemein ist eine ca. 300 Aminosäuren umfassende, N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RDH), welche zur DNA-Bindung, Interaktion mit den IκB-Proteinen und zur Bildung der hetero- bzw. homodimeren Transkriptionsfaktoren dient<sup>60–63</sup>. Die Mitglieder der Rel-Unterfamilie (RelA, RelB, c-Rel) tragen darüber hinaus eine transkriptionsaktivierende Domäne (TAD) innerhalb ihres C-Terminus<sup>61,63</sup>. Dimere ohne Rel-Beteiligung sind dementsprechend nicht in der Lage, transkriptionsaktivierend zu wirken. Ihre Funktion wird als reprimierend beschrieben<sup>63</sup>.

Eine Besonderheit des NF-κB-Signalwegs ist die konstitutive Präsenz der NF-κB-Komplexe unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle. Dies hat zum einen den Vorteil schnell mit einer Aktivierung des Signalweges reagieren zu können, bedeutet aber zum anderen, dass die Transkriptionsfaktoren ansonsten im inaktiven Zustand gehalten werden müssen. Dies geschieht mit Hilfe der Familie der NF-κB-Inhibitoren (IκB) zu deren Mitgliedern IκBα, IκBβ und IκBε zählen. Durch Bindung an die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS), welche Teil der Rel-Homologie-Domäne ist, blockieren und inaktivieren sie die Dimere und halten sie im Cytoplasma zurück<sup>61–64</sup>. Dabei erfahren die NF-κB-Komplexe durch IκBα keine vollständige Blockierung ihrer NLS, wodurch die NF-κB-IκBα-Komplexe auch in nicht stimulierten Zellen regelmäßig im Zellkern nachweisbar sind, ohne jedoch Einfluss auf die Genexpression auszuüben. Dafür scheint der schnelle, durch die *nuclear export sequence* (NES) des IκBα vermittelte Rücktransport verantwortlich zu sein<sup>61,65</sup>. Den inaktiven Zustand des Signalwegs muss man sich daher als ein dynamisches Gleichgewicht vorstellen.

Die IκBs sind nicht die einzigen Inhibitoren der Rel-Transkriptionsfaktoren. Die Vorläuferproteine p105 und p100 der p50- bzw. p52-Monomere tragen auf ihrem C-Terminus ein *ankyrin-repeat motif* (ANK) ähnlich dem der IκB-Moleküle, wodurch sie in der Lage sind als IκB-*like* NF-κB-Inhibitoren zu agieren<sup>61,64,66–69</sup>.



**Abb. 1.3: Abbildung der NF-κB-Familie.** Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, (Chen & Greene<sup>63</sup>).

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie beispielsweise Entzündungs- und Stressreaktionen, die B-Zellreifung, die angeborene und adaptive Immunität, die Zellproliferation und Differenzierung bestimmter Zellen und darüber hinaus den programmierten Zelltod<sup>60</sup>. Man geht davon aus, dass Störungen innerhalb dieses Signalwegs in direktem Zusammenhang mit inflammatorischen und Autoimmun-Erkrankungen sowie der Entwicklung verschiedener Malignome stehen<sup>61,62,64</sup>. Die Aktivierung des Signalwegs kann durch eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Stimuli erfolgen. Neben proinflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1), Wachstumsfaktoren, bakteriellen und viralen Antigenen (Lipopolysaccharide, doppelsträngige RNA) zählen dazu auch DNA-schädigende Substanzen und physikalische Noxen, wie freie Radikale und UV-Strahlen<sup>61,63,70,71</sup>. Für die intrazelluläre Signaltransduktion stehen zwei Signalwege zu Verfügung; der kanonische, welcher auch als "klassischer NF-κB-Signalweg" bezeichnet wird, und der nicht-kanonische Signalweg.

Im Zentrum des kanonischen Signalwegs steht der IκB-Kinase-Komplex (IKK), welcher aus zwei katalytischen Einheiten (IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2)) und einer regulatorischen Einheit (NEMO (IKKγ)) aufgebaut ist. In der Folge einer Ligandenbindung an einen der vorgeschalteten Membranrezeptoren vermittelt IKK die Phosphorylierung der Serine 32 und 36 von IκBα, in dessen Folge es zu einer Ubiquitin-vermittelten Degradation des Inhibitors durch ein 26S-Proteasom und damit zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren kommt. Neben IκBα phosphoryliert IKK auch den IκB-*like* NF-κB-Inhibitor p105, woraufhin dieser entweder vollständig abgebaut und die von ihm inhibierten Dimere aktiviert werden, oder, alternativ dazu, zu p50 prozessiert wird, welches damit für die Bildung neuer Transkriptionsfaktoren zur Verfügung steht. Die Transkriptionsfaktoren des kanonischen Signalwegs setzen sich charakteristischerweise aus den Monomeren NF-κB1 (p50), RelA und cRel zusammen. Der entscheidende Schritt für die Aktivierung des kanonischen Signalweg nur in unterstützender Funktion auf<sup>62,64,69,72</sup>.

Für den nicht-kanonischen Signalweg ist hingegen IKKα von größter Bedeutung, da es den entscheidenden Schritt zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren, die Prozessierung von p100, induziert. Hierfür phosphoryliert es, nach eigener Aktivierung durch die NF-κBinducing kinase (NIK), die C-terminalen Serinreste 866 und 870 von p100, welches daraufhin Ubiquitin-vermittelt zu p52 prozessiert wird und als aktiver Transkriptionsfaktor, in den überwiegenden Fällen als Dimer mit RelB, in den Zellkern wandert. Ein weiterer zentraler Schritt dieses Signalwegs ist die durch die Rezeptor-/Ligandenbindung initiierte, *de-novo*-Synthese der NF-κB-*inducing kinase* (NIK), welche den geschwindigkeitslimitierenden Schritt innerhalb dieser Signalübermittlung darstellt. Während der kanonische Signalweg als schnell ablaufend mit transienter Signalübermittlung beschrieben wird, stellt der nicht-kanonische Signalweg mit seiner langsam ablaufenden, persistierenden Signalübertragung einen Gegensatz dazu dar<sup>64,69</sup>.

Im Zellkern angekommen, binden die Transkriptionsfaktoren an die κB-*sites* (Bindungsstellen) ihrer Zielgene. In ihrem Einfluss auf die Genexpression werden sie durch verschiedene weitere Faktoren unterstützt; allerdings sind die Prozesse im Nukleus bis heute nicht vollständig verstanden. Neben den Histonmodifikationen im Umfeld der NF-κB-Zielgen-Promotoren sind für diese Arbeit vor allem die posttranslationalen Modifikationen des NF-кB-Faktors RelA von besonderem Interesse; sie gelten als Schlüsselmechanismen in der nukleären Regulation des NF-кB-Signalwegs.

Das NF-κB-Monomer RelA agiert vorwiegend im kanonischen Signalweg und hier vor allem in Kombination mit NF-κB1 (p50). Es unterliegt vielfältigen posttranslationalen Modifikationen in Form von Phosphorylierungen, Acetylierungen und Methylierungen<sup>63,73</sup>, wobei ich mich hier auf die posttranslationalen Acetylierungen beschränken werde.

Die Acetylierung von RelA erfolgt signalgekoppelt im Nukleus nach Stimulation durch TNF $\alpha$ oder PMA (Phorbol myristate acetate). Mehrere Studien konnten nachweisen, dass die reversiblen Acetylierungen der Lysinreste in vitro und in vivo durch p300/CBP (histone acetyltransferase p300 / CREB-binding protein), seltener durch PCAF (p300/CBP-associated factor), katalysiert werden<sup>63,74–76</sup>. Die Deacetylierung erfolgt durch HDAC1, HDAC3 und SIRT1<sup>60,75,77,78</sup>. Die Effekte der Acetylierung unterscheiden sich in ihrer Wirkung in Abhängigkeit davon, welcher der sieben Lysinreste des RelA modifiziert wurde. So führt die Acetylierung von K122 und K123 zu einer verminderten Bindung zwischen NF-KB und dem (Immunglobulin) KB-Enhancer, wohingegen die Übertragung einer Acetylgruppe auf den Lysinrest K310 erst die volle Transkriptionsaktivierungsaktivität von p50/RelA ermöglicht. Die Acetylierung von K221 verbessert die Bindung von RelA an die DNA bei gleichzeitig erschwerten Bindungsmöglichkeiten für ΙκΒα. Eine verminderte Affinität der κB-Inhibitoren zu p50/RelA wird durch Acetylgruppen an K218 und K221 hervorgerufen<sup>60,63,74,76</sup>. Huang et al. äußern in ihrer Arbeit mit dem Titel "Posttranslational modifications of NF-KB: another layer of regulation for NF-kB signaling pathway" die Vermutung, dass die verschiedenen Effekte der RelA-Acetylierung zum einen auf einer Konformationsänderung des Proteins selbst beruhen und zum anderen Folge einer durch die Neutralisation der ansonsten positiv geladenen Lysinreste hervorgerufenen verminderten Bindungsaktivität mit der negativ geladenen DNA sind<sup>60</sup>. Wie die Beispiele zeigen, nehmen die posttranslationalen Acetylierungen maßgeblichen Einfluss auf die Wirkung von RelA, in Folge dessen den beteiligten HATs und HDACs – und somit auch ihrer Inhibitoren – eine wichtige Rolle in der Regulation des nukleären NF-ĸB-Signalwegs zukommt.

Es ist lange bekannt, dass aktives NF-κB die *de-novo*-Synthese von IκBα induziert. Heutzutage weiß man, dass dies nicht allein zum Auffüllen der im Zytoplasma verbrauchten Inhibitoren dient, sondern auch zu einer zeitlichen Begrenzung der Transkriptionsinduktion beiträgt, indem IκBα die an die Promotoren gebundenen Transkriptionsfaktoren bindet und mit Hilfe seiner Shuttleeigenschaft zurück ins Zytoplasma trägt<sup>63,79,80</sup>.

## 1.6 Inhibitoren des NF-κB-Signalwegs

Für die Inhibition des NF-κB-Signalwegs wurden zwei verwandte direkte Inhibitoren der IκBα-Phosphorylierung, Bay11-7082 und Bay11-7085, und der 26S-Proteasom-Inhibitor Bortezomib ausgesucht. Diese verhindern den Abbau von IκBα und blockieren somit den NF-κB-Signalweg. In vielen Zellen erhöht dies die Apoptoserate.

### 1.6.1 Bay11-7082 und Bay11-7085

Bay11-7082 ((E)3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile) und Bay11-7085 ((E)-3-(4-t-Butylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile) sind selektive Inhibitoren des klassischen NF-κB-Signalwegs. Über eine irreversible Inhibition der IκB-Kinase (IKK) hemmen sie die TNFα-induzierte Phosphorylierung von IκBα, ohne auf die konstitutive IκBα-Autophosphorylierung einzuwirken. Aufgrund des fehlenden Abbaus von IκBα über das 26S-Proteasom wird NF-κB inaktiv im Zytoplasma gehalten. Bei gleicher Wirkweise unterscheiden sich die beiden Inhibitoren in den antiinflammatorischen Eigenschaften; diese sind nur für Bay11-7085 auch in vivo nachgewiesen<sup>81,82</sup>.

Die Wirksamkeit beider Inhibitoren konnte vielfach belegt werden. So gelang es zum Beispiel, über eine Bay11-7082 vermittelte Inhibition des klassischen NF-κB-Signalwegs die Zellviabilität unterschiedlicher leukämischen Zelllinien effektiv durch Apoptoseinduktion zu senken, wobei dies Caspasen-unabhängig über eine Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte<sup>83</sup>. Des Weiteren ließ sich durch die Behandlung mit Bay11-7082 in CLL-Zellen die Apoptoserate auf 70% anheben<sup>83,84</sup>.

### 1.6.2 Bortezomib

Bortezomib wurde 2003 als erster Proteasom-Inhibitor von der FDA für die Behandlung des therapierefraktären oder rezidivierenden Multiplen Myeloms (MM) zugelassen. Seitdem konnte in einer Vielzahl von Studien eine hohe Wirksamkeit über alle Stadien der Erkrankung hinweg vom neu diagnostiziertem MM bis hin zur Erhaltungstherapie nachgewiesen werden<sup>85–87</sup>, sodass Bortezomib zu einem wichtigen Pfeiler in der Behandlung des MM geworden ist.

Durch seine Interaktion mit dem 26S-Proteasom, genauer gesagt mit der  $\beta_5$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms, inhibiert es die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität dieser Protease, in Folge dessen der Abbau zahlreicher, zuvor über Polyubiquitinierung markierter Proteine blockiert wird. Neben pro- und anti-apoptotischen Proteinen – beispielsweise der Bcl-2-Familie – zählen auch viele Regulatorproteine des Zellzyklus (Cycline, p21 und p53) zu den Substraten des 26S-Proteasoms<sup>88–90</sup>. Über die Hemmung des Abbaus von IkB $\alpha$  inhibiert Bortezomib zuverlässig den klassischen NF-κB-Signalweg und nimmt so Einfluss auf das Zellwachstum und das Überleben der Zellen<sup>85,88</sup>. Über die Bortezomib-induzierte Blockade des NF-κB-Signalwegs kann beispielsweise Caspasen-unabhängig der Zelltod von B-Zell-Lymphomen induziert werden<sup>88,89</sup>.

#### 1.7 Zielgene des NF-κB-Signalwegs

In dieser Arbeit wurden sechs typische Zielgene des NF-κB-Signalwegs analysiert. Die Proteine p21<sup>CIP1</sup> (Gen *CDKN1A*), BCL-XL (Gen *BCL2L1*) und Cyclin D1 (Gen *CCND1*) wurden aufgrund der Ergebnisse von Niegisch et al. [2013] ausgewählt; sie werden häufig durch SAHA-Behandlung in UC-Zelllinien induziert. Erweitert wurde die Versuchsreihe um zwei Vertreter aus der Familie der Apoptose-Suppressoren, XIAP (Gen *XIAP*) und Survivin (Gen *BIRC5*), welche in malignen Zelllinien regelhaft überexprimiert sind und nachweislich im direkten Zusammenhang mit der Apoptoseresistenz stehen, sowie das proinflammatorische Interleukin 8 (Gen *CXCL8*).

#### 1.7.1 CCND1 (Cyclin D1)

Das *CCND1* Gen codiert ein zur Familie der Cycline gehöriges Protein, das Cyclin D1. Cyclin D1 ist ein essentieller Regulator des Zellzyklus und für den Übertritt von der G1- in die S-Phase verantwortlich. Entgegen der für Cycline typischen periodischen Synthese während des Zellzyklus wird die Expression und Akkumulation von Cyclin D1 weniger durch den Zellzyklus als im besonders hohen Maße durch extrazelluläre mitogene Wachstumsfaktoren reguliert<sup>91–93</sup>. Neben der reinen Transkriptions- und Translationsinduktion stabilisieren die Mitogene darüber hinaus das vorliegende Cyclin D1 und führen über eine Inhibition seines Abbaus zu einer zusätzlichen Transkriptions-unabhängigen Steigerung der intrazellulären Konzentration<sup>92–94</sup>. Gebunden an *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) oder *cyclin-dependent kinase 6* (CDK6) reguliert Cyclin D1 die Phosphorylierung des Retinoblastom Protein (RB), wodurch dieses in seiner Funktion als Inhibitor der E2F-Transkriptionsfaktoren blockiert wird und der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase eingeleitet wird<sup>92,95–99</sup>. Über eine Kinase-unabhängige Sequestrierung von CDK-Inhibitoren, wie p27<sup>Kip1</sup> und p21<sup>CIP1</sup>, wirkt es zudem aktivierend auf CDK2-Komplexe, wodurch die G1-Progression weiter vorange-trieben wird<sup>91,92,100</sup>.

Aufgrund seiner sehr häufigen Dysregulation in verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise dem Mammakarzinom<sup>101</sup>, dem Harnblasenkarzinom<sup>102</sup>, dem Mantelzelllymphom<sup>103</sup>, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom<sup>104</sup> und dem Ösophaguskarzinom<sup>105</sup>, konnte Cyclin D1 als ein entscheidender Faktor für die Entwicklung und Progression verschiedener Malignome

ausgemacht werden<sup>92,94,96</sup>. Hohe Cyclin D1-Konzentrationen führen jeweils über eine erhöhte CDK-Aktivität zu einer von extrazellulären Signalen unabhängigeren Zellproliferation<sup>95</sup>. In Brustkrebszellen waren hohe Expressionsniveaus von Cyclin D1 mit einer Verkürzung der G1-Phase bei gleichzeitig erhöhtem Anteil an Tumorzellen, welche die G1-Phase vollständig durchliefen, assoziiert<sup>106,107</sup>.

#### 1.7.2 *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>)

Das *CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)* Gen kodiert p21<sup>CIP1</sup> (auch p21), ein Protein, welches zur CIP/KIP-Familie der *cyclin-dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren (CKIs) gehört. Über seine Funktion, Cyclin E-CDK2 und Cyclin D-CDK4 Komplexe direkt zu binden und zu inhibieren, ist es in der Lage, den Zellzyklus beim Übertritt von der G1- in die S-Phase bzw. von der G2-Phase zur Mitose zu arretieren<sup>108,109</sup>. Es stellt einen (negativen) Schlüsselregulator des Zellzyklus dar<sup>108,110</sup>.

In seiner Funktion als Zellzyklusregulator steht p21<sup>CIP1</sup> besonders unter der Kontrolle des Tumorsuppressor-Proteins p53. Als Antwort auf DNA-Schäden wird p53 aktiviert, welches daraufhin im Zellkern akkumuliert und als Transkriptionsfaktor die Expression von p21<sup>CIP1</sup> erhöht<sup>108–112</sup>. Daneben sind eine Reihe von Tumorsuppressor-Proteinen wie auch Onkogene in der Lage, über eine Bindung von Transkriptionsfaktoren die Expression des p21<sup>CIP1</sup> über spezifische cis-wirkende Elemente in der Promotorregion zu beeinflussen. Als Beispiel seien der *transforming growth factor* (TGF $\beta$ ), das *breast cancer gene 1* (BRCA1), der Nervenwachstumsfaktor (NGF), der E2F-Transkriptionsfaktor (E2F) und die *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Proteine genannt, welche alle transkriptionsinduzierend wirken. Das Oncoprotein c-Myc inhibiert die p21<sup>CIP1</sup>-Expression<sup>108,111–113</sup>. In den letzten Jahren sind zudem immer mehr posttranslationale Modifikationen entdeckt worden, welche sich ebenfalls auf das Expressionsniveau von p21<sup>CIP1</sup> auswirken<sup>111</sup>.

Wie alle Mitglieder der CIP/KIP Familie übt p21<sup>CIP1</sup> zusätzliche, von Cyclin-CDK-Komplexen unabhängige, Funktionen aus und nimmt Einfluss auf Transkription, Apoptose und die Dynamik des Actin-Zytoskelettes. Wichtig für die verschiedenen Funktionen des p21<sup>CIP1</sup> ist, neben den unterschiedlichen Bindungspartnern, die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle<sup>108,110</sup>. So konnte in vielen malignen Zelllinien eine Verbindung zwischen der zytoplasmatischen Lokalisation des p21<sup>CIP1</sup> und einem aggressivem Wachstum, Metastasierung und einer schlechten Prognose hergestellt werden<sup>109–111,114,115</sup>. Im Zytoplasma inhibiert es beispielsweise die ASK1 (apoptosis-signal-reducing kinase 1) und den SAPK/JNK-Signalweg (stress-activated protein kinase / c-Jun-N-terminal kinase 1),

wodurch die stressinduzierte Apoptose blockiert wird. Daneben hemmt es die Pro-Caspase 3, wodurch deren Prozessierung und damit Aktivierung verhindert wird<sup>110–112,116,117</sup>. P21<sup>CIP1</sup> kann also sowohl pro- als auch anti-apoptotisch agieren.

So gegensätzlich wie seine Funktionen, so gegensätzlich sind auch die Folgen der Dysregulation von p21<sup>CIP1</sup> in den unterschiedlichen Tumorzellen. Erhöhte Expressionsniveaus, wie sie beispielsweise beim Mammakarzinom nachgewiesen werden konnten, korrelierten in vielen Fällen mit einem aggressivem, invasivem Tumorwachstum, wohingegen in Zelllinien mit reduzierter Expression die Prognose ebenfalls schlecht ausfiel, da hier die Zellzykluskontrolle fehlte und Zellen mit DNA-Schäden ungehindert wachsen konnten<sup>109,118,119</sup>. Ein Anstieg des Expressionsniveaus von p21<sup>CIP1</sup> ließ sich über Tumoren unterschiedlicher Entität hinweg unter zytostatischer Therapie belegen. Die mit dem Expressionsanstieg einhergehende Resistenz gegenüber dem verwendeten Zytostatikum konnte durch eine Kombination mit einem p21<sup>CIP1</sup>-Inhibitor erfolgreich gesenkt werden, wodurch beispielsweise in Mamma-, Lungen-, Pleuramesotheliom- und Kolonkarzinom-zelllinien die Ansprechrate auf das Chemotherapeutikum deutlich verbessert werden konnte<sup>109,120,121</sup>.

#### 1.7.3 *BCL2L1* (BCLX)

BCLX ist ein vom BCL2L1 Gen codiertes Protein, welches als Mitglied der B cell lymphoma 2 (BCL2) family ausschlaggebend an der Regulation der intrinsischen Apoptose beteiligt ist. Mit seinen zwei Spleißvarianten, einer langen Apoptose-hemmenden Isoform (BCL-XL) und einer kurzen Apoptose-fördernden Isoform (BCL-XS)<sup>122</sup>, ist BCLX in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wo es über die voltage-dependent anion channel porin (VDAC) modulierend auf das Membranpotential einwirkt und so die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) und die Freisetzung des Cytochrom C beeinflussen kann<sup>92,122–124</sup>. Die Mitglieder der BCL2-Familie können in drei Untergruppen aufgeteilt werden, den anti-apoptotischen Proteinen BCL2, BCL-XL, MCL1, BCLW und BFL1, den pro-apoptotischen Effektorproteinen BAK, BAX und BOK und den BH3-only Proteinen BID, BIM, BAD, NOXA, PUMA<sup>122,125</sup>. In gesunden Zellen wirken die anti-apoptotischen BCL2-Proteine einem Apoptose-induziertem Zelltod durch Blockierung der pro-apoptotischen Effektorproteine BAX und BAK entgegen. Zellschädigende Stimuli, wie beispielsweise Chemotherapeutika oder Bestrahlung, heben durch BH3-only Proteine vermittelt diese Inhibition auf, woraufhin BAX/BAK über eine mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) Cytochrom C-vermittelt die Caspasen-Kaskade aktiviert und damit den Zelltod einleitet<sup>125</sup>.

Die Überexpression der anti-apoptotischen BCL2-Proteine in Tumorzellen ist ein häufig beobachtetes Phänomen<sup>122,123,125</sup> und korreliert mit der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika<sup>122,123</sup>. Als Ursache für die fehlende Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der cytotoxischen Behandlung konnte in einigen Fällen die BCL2/BCL-XL-vermittelte Blockade der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien, als Folge der Hemmung der VDAC und einer Neutralisation der BH3-*only* Proteine ausgemacht werden<sup>125</sup>. Entsprechend wurde nach der isolierten Herunterregulation von BCL-XL beispielsweise in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 ein Anstieg der Apoptoserate verzeichnet<sup>123,126,127</sup>.

Studien zu BCL-XL legen den Verdacht nahe, dass es in soliden Tumorzellen deutlich öfter überexprimiert wird als BCL-2<sup>125,128</sup>, welches bisher als am häufigsten überexprimierter Vertreter der anti-apoptotischen BCL2-Familie in malignen Zellen galt. In einigen UC ist das *BCL2L1* Gen amplifiziert<sup>24</sup>.

#### 1.7.4 CXCL8 (IL8)

Interleukin 8 (IL8; CXC8) ist ein inflammatorisches Zytokin aus der Familie der CXC-Chemokine, welches von T-Lymphozyten, Neutrophilen, Macrophagen und den Epithelbzw. Endothelzellen gebildet werden kann<sup>129–132</sup>. Auslösende Faktoren sind neben entzündlichen Signalen (TNFα, IL1β) auch chemische Einflüsse (Chemotherapeutika, Hypoxie) und Steroidhormone (Androgene, Östrogene und Dexamethason)<sup>130,131</sup>. Tumorzellen exprimieren häufig selbst CXCR1 und CXCR2 Rezeptoren mit den dazu gehörigen CXC-Chemokinen und schaffen sich dadurch in ihrer direkten Umgebung ein eigenes Mikromilieu mit optimalen Bedingungen für ihr Wachstum und die Zellaussaat<sup>129,133–136</sup>. Tumorzellen können über eine IL8-vermittelte Migration neutrophiler Granulozyten und myeloider Suppressorzellen (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) in ihr Mikroumfeld die gegen sie gerichtete Immunantworten abschwächen. Die IL8-induzierte Angiogenese nutzen sie für die optimale, dem intensiven Stoffwechsel des Tumors angepasste Vaskularisation<sup>129,137,138</sup>. Das selbst produzierte IL8 ermöglicht den epithelialen Tumorzellen darüber hinaus eine Transdifferenzierung in mesenchymale Zellen (Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)), wodurch sie ihre immunsuppressiven Fähigkeiten, die Fähigkeit zur Migration, also auch die Metastasierung, weiter vorantreiben<sup>137,138</sup>.

Interessanterweise ließ sich in vielen Tumorarten eine Korrelation zwischen der Höhe des im Serum gemessenen IL8 mit dem Tumorstadium, der Tumormasse und der Prognose belegen<sup>129</sup>. Shanmamed et al. wiesen dies beispielsweise für das Hepatozelluläre-, das

Nierenzell-, das nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und das Maligne Melanom nach, wobei das Gesamtüberleben indirekt proportional zur IL8-Serumkonzentration war<sup>139</sup>. Für das Maligne Melanom, das Mamma-, Ovarial-, Kolon- und das Prostatakarzinom konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des Serum-IL8 und dem Tumorprogress nachgewiesen werden<sup>129</sup>.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der IL8-CXCR1/2-Signalachse eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung, der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika und der Tumorprogression zukommt, vor allem, da die Überexpression von IL8 ein weitverbreitetes Phänomen in Tumoren unterschiedlichster Ausgangsgewebe darstellt<sup>129,137</sup>.

## 1.7.5 XIAP (XIAP) und BIRC5 (Survivin)

Der X-linked inhibitor of apoptosis, kurz X-linked IAP oder XIAP, wird durch ein auf dem X-Chromosom liegendes Gen (XIAP) kodiert, welches genauso wie das auf Chromosom 17 liegende *baculoviral IAP repeat containing 5* Gen, kurz *BIRC5*, zur Familie der Apoptose-Suppressor Gene (IAP) gehört. Allen Mitglieder dieser Familie gemein ist, dass sie Proteine codieren, welche ein bis drei *baculoviral IAP repeat* (BIR)-Domänen beinhalten, die es ihnen ermöglichen, über eine Suppression der Caspase-Aktivität die Apoptose zu blockieren<sup>140</sup>.

XIAP ist der stärkste Inhibitor seiner Klasse. Mit insgesamt drei BIR-Domänen ist es in der Lage, neben den Effektorcaspasen 3 und 7, auch die Initiatorcaspase 9 über eine direkte Bindung zu inhibieren. Über eine RING-Domäne auf seinem C-Terminus verfügt es zudem über eine E3-Ubiquitinligase-Aktivität<sup>140,141</sup>.

Aufgrund seiner effektiven Apoptose-Inhibition stellte sich die Frage, ob das Expressionsniveau von XIAP eine Ursache für die hohe Apoptose-Resistenz von Tumoren gegenüber bisherigen konservativen Therapiekonzepten sein könnte. Yang et al. gelang es, XIAP in Nierenzellkarzinomzellen herunter zu regulieren und damit für die Apoptose zu sensitivieren<sup>141</sup>. Evans et al. konnten nachweisen, dass ein hohes XIAP-Expressionsniveau in unmittelbarem Zusammenhang mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose bei Patentinnen mit inflammatorischem Brustkrebs steht. Weiterhin stellten sie fest, dass XIAP über eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs und seiner Zielgene die Tumorprogression fördert<sup>142</sup>.

Das *baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5*) Gen codiert insgesamt 6 Isoformen des Survivins. Als kleinster Vertreter der IAP-Familie mit einer einzelnen *baculoviral IAP repeat* (BIR)-Domäne und einer  $\alpha$ -Helix anstelle der RING-Domäne<sup>143,144</sup> ist Survivin bei fehlender

*caspase activation and recruitment domain* (CARD) nicht in der Lage, selbst Caspasen zu binden und zu inhibieren. Stattdessen interagiert es mit Adaptermolekülen und Cofaktoren. Über eine Interaktion mit XIAP stärkt es beispielsweise dessen Stabilität, wirkt über eine Sequestrierung von SMAC/DIABLO einer Hemmung von XIAP entgegen und verstärkt dessen anti-apoptotische Wirkung. Daneben ist Survivin in die Regulation des Zellzyklus involviert<sup>144</sup>.

Viele Untersuchungen konnten eine konsistente Überexpression aller Survivin-Isoformen in nahezu jedem malignen Tumor nachweisen. Die Höhe des Expressionsniveaus korrelierte dabei mit den verminderten Apoptoseraten der Malignomzellen, einer verminderten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und einem erhöhten, aggressiven Tumorwachstum. Vor dem Hintergrund, dass Survivin in normalem, ausdifferenziertem Gewebe gar nicht, oder nur in sehr geringer Maße vorkommt, stellt Survivin ein vielversprechendes Zielmolekül für neue Therapiekonzepte dar<sup>143,144</sup> und wird zudem als Biomarker diskutiert.

## 1.8 Ziele der Arbeit

Die Arbeitshypothese dieser Dissertation schließt sich an die Ergebnisse von Niegisch et al. [2013] an, wonach bestimmte Urothelkarzinomzelllinien unter der Behandlung mit dem Pan-HDAC-Inhibitor SAHA nicht, wie erwartet, effizient die Apoptose einleiteten, sondern im Zellzyklusarrest akkumulierten. Neben einer leicht erhöhten sub-G1-Fraktion fiel vor allem ein deutlich erhöhter Anteil an Zellen im G2/M-Arrest auf. Zeitgleich konnte die Arbeitsgruppe eine Induktion der Proteine p21<sup>CIP1</sup> (Gen *CDKN1A*), BCL-XL (Gen *BCL2L1*) und – trotz G2/M-Anstieg – von Cyclin D1 (Gen *CCND1*) nachweisen, welche bekannter Weise durch den NF-κB-Signalweg induziert werden. Es stellte sich daher die Frage, ob es unter der Behandlung mit dem Pan-HDACi SAHA zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalweges kommt, welche die Induktion der Apoptose durch SAHA limitiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu überprüfen, ob die Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit SAHA zu einer nachweisbaren Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs führt und ob sich durch die Kombination von HDAC- mit NF-κB-Inhibition neue Therapieoptionen für das invasive Urothelkarzinom ergeben.

Hierfür sollte zunächst die Wirkung von SAHA auf zentrale Proteine des klassischen NF-κB-Signalwegs, IκBα und RelA (p65), mittels Western Blot analysiert werden. Zur weiteren Überprüfung unserer Annahme wurden die beiden Untereinheiten des häufigsten Transkriptionsfaktors des klassischen NF-κB-Signalwegs, RelA (p65) und NFκB1 (p50), immuncytochemisch angefärbt und nach einer HDACi-induzierten Translokation der beiden Monomere vom Zytoplasma in den Zellkern gesucht.

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR sollte eine Induktion der Genexpression der NF- $\kappa$ B-Zielgene *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CCND1* (Cyclin D1), *BCL2L1* (BCLX), *CXCL8* (IL8), *XIAP* (XIAP) und *BIRC5* (Survivin) auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Im Vergleich zur SAHA-Behandlung sollten die Auswirkung einer Aktivierung des klassischen Signalwegs über den starken Induktor TNF $\alpha$  bzw. die Blockade dieses Signalwegs mittels BAY11-7082 erhoben werden. Darüber hinaus wurde die Wirkung der Kombination von HDAC- mit NF- $\kappa$ B-Inhibition auf die Expression der Zielgene analysiert.

Die Sensitivität der Urothelkarzinomzelllinien gegenüber einer NF-κB-Inhibition oder einer Kombination aus SAHA und Bay11-7082 sollte über etablierte Zellvitalitäts-Assays bestimmt werden. Erweitert wurde diese Versuchsreihe um den Proteasominhibitor Bortezomib, welcher über die Blockade des 26S-Proteasoms in die Signalkaskade des klassischen NF-κB-Signalwegs eingreift, indem es den Abbau des polyubiquitinierten IκBα blockiert. Es wirkt dabei weniger spezifisch als die Bay-Inhibitoren, da es auch den Abbau vieler anderer, vor allem kurzlebiger, Proteine blockiert. Neben der Einzelbehandlung sollten auch die Auswirkungen einer Kombination mit SAHA auf die Zellvitalität erfasst werden.

# 2 Material

## 2.1 Zelllinien

**Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Zelllinien.** Ersichtlich sind, soweit bekannt, das Tumorstadium mit dem Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, die Herkunft, das Alter und Geschlecht des Spenders (m: männlich, w: weiblich), die Morphologie sowie die Literaturreferenz

Name	TNM	Herkunft	Geschlecht	Morphologie	Literaturreferenz
			& Alter		
5637	TCC, G2	Primärtumor,	m, 68 J	epithelial	Williams et al., 1980
		Harnblase			
BFTC-905	pTa, G3	Primärtumor,	w, 51 J	epithelial	Tzeng et al., 1996
		Harnblase			
J82	pT3, G3	Primärtumor,	m, 58 J	E/M	O´Toole et al., 1978
		Harnblase			
RT112	(papillär),	Primärtumor,	W	epithelial	Masters et al., 2000
	G2	Harnblase			
T24	TCC, G3	Primärtumor,	w, 81 J	mesenchymal	Williams et al., 1980
		Harnblase			
TERT-		Normales	unbekannt	epithelial	Chapman EJ, Kelly G,
NHUC		Urothel,			Knowles MA, 2008
		Telomerase			
		immortalisiert			
UP220		Normales	w, 46 J	epithelial	Swiatkowski S., 2003
		Urothel,			
		Nierenbecken			
UP226		Normales	W, 75 J	epithelial	Swiatkowski S., 2003
		Urothel,			
		Harnleiter			
VM-Cub1	TCC, G2	Primärtumor,	m, 53 J	E/M	Williams et al.,1980;
		Harnblase			Earl et al, 2013

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

Die Urothelialen Primärkulturen (UP) wurden aus dem Harnleiter bzw. dem Nierenbecken von Nephrektomiepräparaten entsprechend der von Southgate et al.<sup>145</sup> beschriebenen Methode gewonnen und kultiviert. Zur Verfügung gestellt wurden die Präparate von der

Urologischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten. Das zugehörige Ethikvotum trägt die Studien-Nr. 1788.

## 2.2 Medien und Zusätze

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Medien und Zusätze.

Zelllinie	Medium	Zusätze	Antibiotikum
T24, VM-Cub1, RT112,	DMEM GlutaMax	10% FCS	
5637, BFTC-905, J82	(Gibco, Karlsruhe)		
UP226	Keratinocyte SFM	BPE, EGF	1% Penicillin
	(Gibco, Karlsruhe)		1% Streptomycin
TERT-NHUC (Telomerase	Keratinocyte SFM	BPE, EGF, I-T-S,	
immortalisiert)	(Gibco, Karlsruhe)	(-) N-Epinephrin,	
		Hydrokortison	

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Substanz	Hersteller
SAHA	Cayman, Michigan (USA)
PBS-Lösung	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum	Biowest, Nuaillé (Frankreich)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Bortezomib	Selleck Chemicals, München
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Collagen IV-Lyophilisat	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Essigsäure 0,1%	Merck, Darmstadt
Trypsin-Inhibitor	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Formaldehyd 3,7%	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
BSA	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Penicillin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
BPE	Gibco, Karlsruhe
EGF	Gibco, Karlsruhe

(-) N-Epinephrin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
I-T-S (Insulin, Transferrin, Selenit)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien (USA)
Hydrokortison	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau (0,25%)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Bay11-7082/-85	Calbiochem <sup>®</sup> , Nottingham (UK)
Bortezomib	Selleck Chemicals, München
Ethanol	Merck; Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
SDS ultra pure	Roth; Karlsruhe
Tween 20	Serva; Heidelberg
Glycin	Merck; Darmstadt
HCI 37%	Merck; Darmstadt
NP-40	Thermo Scientific, Waltham,
	Massachusetts (USA)
Phosphatase inhibitoren-Cocktail	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
β-Mercapthoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham,
	Massachusetts (USA)
Annexin V FITC markiert	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New
	Jersey (USA)
10x Annexin Binding Buffer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New
	Jersey (USA)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
ΤΝFα	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch
	Gladbach
SyBr Green	Qiagen, Hilden
Lipofectamine RNAiMax Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
Stealth™ RNAi Negative Control Duplexes	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Prolabo (VWR), Radnor, Pennsylvania (USA)

## 2.4 Puffer

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Puffer. Ersichtlich sind die zur Herstellung verwendeten Substanzen.

Puffer	Substanzen
Milder Stripping-Buffer (pH 2,2)	1,5% Glycerin 0,1% SDS 1% Tween 20
Protein-Lysis-Puffer: "Ripa-Art" (pH 7,6)	150 mM NaCl 1% NP-40 0,5% DOC 0,1% SDS 1 mM EDTA 50 mM Tris (pH 7,6) ad 100 ml Aqua destillata unmittelbar vor Verwendung 10 μl Protease- Inhibitor-Cocktail pro 1 ml Puffer hinzufügen
TBS-Puffer (pH 7,4)	8,77 g NaCl 1,21 g Tris ad 1000 ml Aqua destillata
TBS-T-Puffer	8,77 g NaCl 1,21 g Tris 0,1% Tween 20 ad 1000 ml Aqua destillata
6-fach Laemmli-Puffer	<ul> <li>350 mM Tris, pH 6,8</li> <li>350 mM SDS</li> <li>30% Glycerol</li> <li>3,3% DTT</li> <li>1,2 mg Bromphenolblau</li> <li>β-Mercapthoethanol 1:20 unmittelbar vor Verwendung zusetzen</li> </ul>
SDS-Laufpuffer (Thermo Scientific)	100 mM Tris 100 mM Hepes 3 mM SDS, pH 8
5-fach Western Blotting-Puffer	34 g Tris 144 g Glycin ad 2000 ml Aqua destillata, pH 8,3
Western Blotting-Puffer	200 ml 5-fach WB-Puffer 100 Methanol (100%) ad 1000 ml Aqua destillata
Nicoletti-Puffer	0,1% Natriumcitrat 0,1% Triton X-100 50 μg/ml Propidiumiodid

## 2.5 Verwendete Kits

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Kits.

BCA™ Protein Assay	Pierce, Bonn
Blotting Detection Kit Femto	Thermo Scientific, USA
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Belgien

## 2.6 Programme

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Programme.

NIS-Elements D2-30
SPSS
OriginPro 9G

## 2.7 Primer

**Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Primer.** Ersichtlich sind die einzelnen Sequenzen in 5'-3' Richtung und die Temperatur des Schmelzpunktes (Tm). Fwd: Forward, Rev: Reverse, °C: Temperatur

Gen	Sequenz 5`-3`	Annealing Tm
BCL-XL	Fwd: AGACCCCCAGTGCCATCAAT	55 °C
	Rev: CCCTCAGCGCTTGCTTTACT	
BIRC4	Fwd: ACGAATGGGGTTCAGTTTCAAG	55 °C
	Rev: TGCAACCAGAACCTCAAGTGATT	
BIRC5	Fwd: CTCAAGGACCACCGCATCT	58 °C
	Rev: TCGTTCTCAGTGGGGCAGT	
CCND1	Fwd: CGCAAACACGCGCAGACCT	58 °C
	Rev: GGAGGGCGGATTGGAAATG	
IL8	Fwd: TGCAGCTCTGTGTGAAGGTG	58 °C
	Rev: TGGTCCACTCTCAATCACTCTC	
p21	Fwd: GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	55 °C
	Rev: GGAAGACCATGTGGACCTGT	
ТВР	Fwd: GAATAGGCTGTGGGGGTCAGT	55 °C
	Rev: ACAACAGCCTGCCACCTTA	
# 2.8 Antikörper

#### 2.8.1 Antikörper Western Blot

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Western Blot Antikörper. Ersichtlich sind der Wirt, die Verwendung,die Blockierung und der Hersteller. AK: Antikörper, TBS-T: Tris-buffered saline with Tween20,RT: Raumtemperatur

Primär-AK	Wirt	Verwendung	Blockierung	Hersteller
α-Tubulin	Maus	1:50.000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1 h bei RT	5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT	Sigma Aldrich
Anti-NF-кВ p65	Maus	1:500 in 1% Magermilch in 0,1% TBS-T, über Nacht bei 4 °C	5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT	BD Biosciences
ΙκΒ-α(C21):sc-371	Kaninchen	1:1000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, über Nacht bei 4 °C	5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT	Santa Cruz
NF-ĸB p105/50	Kaninchen	1:1000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, über Nacht bei 4 °C	5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT	Cell signaling
ТВР	Maus	1:2000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1 h bei RT	5% Magermilchpulver in TBS-T für 1 h bei RT	
Sekundär-AK	Wirt	Verwendung		Hersteller
goat anti mouse	Ziege	1:100.000 bis 1:200.000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1 h bei RT		Invitrogen
goat anti rabbit	Ziege	1:200.000 in 1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1 h bei RT		Invitrogen

#### 2.8.2 Antikorper Immuncytochemie

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Antikörper bei der Immuncytochemie. Ersichtlich sind die Spezifität, der Wirt, die Verwendung, die Blockierung und der Hersteller. AK: Antikörper, BSA: Bovines-Serum-Albumin, RT: Raumtemperatur

Primär-AK	Wirt	Verwendung	Blocken	Hersteller
Anti-NF-kB p65	Maus	1:100 in 1% BSA, 2 h bei RT	1% BSA in PBS	BD Transduction Laboratories
NFkB p105/50	Kaninchen	1:100 in 1% BSA, 2 h bei RT	1% BSA in PBS	Cell signaling
Sekundär-AK	Wirt	Verwendung		Hersteller
goat anti mouse, Alexa Fluor 488	Ziege	1:500 in 1% BSA, 1 h bei RT		Invitrogen
goat anti rabbit, Alexa Fluor 488	Ziege	1:500 in 1% BSA, 1 h bei RT		Invitrogen

### 2.9 Geräte

Tabelle 2.10: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Victor 1420 Multilabel	Wallac, Turku (Finnland)
Mikroskop Nikon Eclipse 400	Nikon, Düsseldorf
Zellkulturwerkbank	Gelaire, Meckenheim
Zentrifuge Avanti™30	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien (USA)
Zentrifuge Allegra 21R	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien (USA)
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Dialux 22EB	Leitz, Wetzlar
Brutschrank, Typ B5061	Heraeus, Hanau
ELISA Easy Reader	SLT-Labinstruments, Österreich
Multipipette/Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington (USA)
FACS Scan (Fluorescence Activated Cell	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New
Sorting)	Jersey (USA)
Curix 60, Filmentwickler	AGFA, Köln
ABI 7500HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Light Cycler 96	Roche, Basel (Schweiz)
Blotkammer	Biorad, München
Elektrophoresekammer	Biorad, Biometra, München, Göttingen
SDS-Page, Gelelektrophoreseapparatur	Whatman, Maidstone (UK)
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen

# 3 Methoden

# 3.1 Zellkultivierung und Passagierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in mittelgroßen Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei Inkubationsbedingungen von 37 °C, 100% Wasserdampfsättigung und 5% CO<sub>2</sub>. Die Zelllinie TERT-NHUC und normale Urothelzellen (UP) wurden in kleinen, mit Collagen IV beschichteten Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) bei ansonsten identischen Inkubationsbedingungen kultiviert.

Bei allen Urothelkarzinomzelllinien diente *DMEM GlutaMax* (Gibco, Karlsruhe) als Kulturmedium, welchem 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugegeben wurde. Die UPs wurden in *Keratinocyte SFM* versetzt mit BPE, EGF und je 1% Penicillin und 1% Streptomycin kultiviert. Zur Kultivierung der TERT-NHUC diente *Keratinocyte SFM* supplementiert mit BPE, EGF, I-T-S, (-) N-Epinephrin und Hydrokortison.

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei 70-80% Zellkonfluenz. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (Sigma) (2 ml bei Verwendung einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bzw. 1 ml bei einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Je nach Zelllinie und Zellkonfluenz war hierfür eine Inkubation für 1-4 min bei 37 °C notwendig. Durch die Zugabe von neuem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension anschließend in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt, um danach bei 1000 rpm über 5 min zentrifugiert zu werden. Das entstandene Zellpellet wurde, nach Abnahme des Überstands, in neues Medium überführt und entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit anteilig neu ausgesät.

Für Zellen, die für ihre Kultivierung Collagen IV beschichtete Zellkulturflaschen benötigten, wurde zunächst eine neue 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 2 ml einer 0,1%-igen Essigsäure und 100 μl gelöstem *Collagen IV-Lyophilisat* (Sigma) für 30 min bei RT inkubiert. Vor Hinzugabe der passagierten Zellen wurde die Lösung abgenommen und das angehaftete Kollagen zweimal mit PBS gewaschen.

# 3.2 Darstellung morphologischer Veränderungen nach Behandlung der Urothelkarzinomzellen mit SAHA und Bay11-7082/-85

Die Aussaat der Zellen erfolgte ca. 24 h vor der Behandlung in 6-Well-Zellkulturplatten zu je 100.000 Zellen pro Well. Die verwendeten Substanzen wurden aus den Stocklösungen mit Kulturmedium auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt, wobei für jede Konzentration Doppelproben angesetzt wurden. SAHA wurde in Konzentrationen von 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M verwendet, Bay11-7082/-85 in 1  $\mu$ M und 2,5  $\mu$ M eingesetzt. Um mögliche zytotoxische Effekte des DMSOs, welches in den Stocklösungen als Lösungsmittel verwendet wurde, zu berücksichtigen, wurden je 2 Kontrollproben mit der für die Testsubstanzen verwendeten Höchstkonzentration angesetzt, mindestens jedoch 1:1000. Die Dokumentation der morphologischen Zellveränderungen erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h mittels Mikroskop und der zugehörigen Software.

# 3.3 Zellproliferationsmessung mittels CellTiterGlow® Luminescent Cell Viability Assay

Bei dieser Methode wird die Anzahl vitaler, metabolisch aktiver Zellen anhand ihres ATP-Gehaltes ermittelt. Das durch Zelllyse freigesetzte ATP reagiert in einer Luciferase-abhängigen Reaktion mit Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Lumineszenz entsteht. Das Lumineszenzsignal ist proportional zum Gesamt-ATP-Gehalt, welches wiederum unter den meisten Umständen direkt proportional zur Zellzahl ist.

Für diese Messung wurden die Zellen 24 h vor Behandlung in 50 µl ihres jeweiligen Kulturmediums in weißen 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Um eine einheitliche Konfluenz zwischen den verschiedenen Zelllinien zu erhalten, wurden sie, entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, in unterschiedlicher Ausgangszellzahl ausgesät (T24: 1x10<sup>3</sup>, VM-Cub1 und RT112: 2x10<sup>3</sup>, TERT-NHUC: 3x10<sup>3</sup> Zellen/Well). Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte nach vollständigem Anwachsen der Zellen. Hierzu wurde die jeweilige Substanz mit entsprechendem Medium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen, wurde DMSO anteilig zugesetzt, um eine einheitliche Konzentration über alle Verdünnungsreihen zu erhalten. Bei Messungen der Zellproliferation nach Behandlung mit Einzelsubstanzen wurden je Stoffkonzentration 4 Wells, bei Kombinationstherapien je 3 Wells pro Stoffkonzentration behandelt. Zum Ausschluss eines zytotoxischen Effekts des DMSOs auf die Zellproliferation wurden bei jeder durchgeführten Messung je 4 Wells mit einer Kombination aus Medium und DMSO versetzt, wobei die eingesetzte DMSO-Menge immer der höchsten verwendeten Konzentration entsprach, mindestens jedoch 1:1000. Um das Hintergrundsignal des Mediums herausrechnen zu können, wurden 4 Wells nur mit Medium befüllt (Blank).

Bei der Monotherapie mit dem Pan-HADCi SAHA, sowie dem selektiven IKK-Inhibitor Bay11-7082 bzw. Bay11-7085 wurden Konzentrationen von 0,5  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M verwendet. Der Proteasominhibitor Bortezomib wurde in Konzentrationen von 5 nM bis 20 mM verwendet. In Kombinationstherapien in denen Bay11-7082 verwendet wurde, wurde dies unter Berücksichtigung der Wirklatenz 60 min vor Zugabe der zweiten Substanz auf die Zellen gegeben. Im Rahmen der Kombinationsbehandlungen wurden die Konzentrationen von SAHA von 0,1  $\mu$ M bis 5  $\mu$ M variiert.

Nach Ablauf der angesetzten Inkubationszeit von 72 h wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl PBS sowie 100 µl einer 1:1 Lösung aus *CellTiter-Glo®* Substrat und *CellTiter-Glo®* Puffer je Well hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf der Rüttelplatte bei RT, welche zur Einleitung der Zelllyse und zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals diente, erfolgte die Auswertung im Victor Counter mit der Testwellenlänge von 570 nm und der Referenzwellenlänge von 630 nm.

#### 3.4 Immuncytochemie

Mit Hilfe der Immuncytochemie ist es möglich, die intrazelluläre Lokalisation spezieller Proteine zu bestimmen. Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das Epitop des gesuchten Proteins durch einen spezifischen Primärantikörper gebunden wird, welcher wiederum selbst durch den Sekundärantikörper nachgewiesen wird. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, über den die Bindung im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

#### 3.4.1 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden zunächst mit einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät, welche zuvor mit je 3 autoklavierten Deckgläschen bestückt worden waren. Nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht konnte am nächsten Morgen das Medium abgesaugt und die Zellen, nach einer einmaligen Waschung mittels PBS, fixiert werden.

In der Versuchsreihe mit vorbehandelten Zellen erfolgte bei adhärentem Zellwachstum zunächst die Behandlung. Die hierbei verwendeten Substanzen wurden unter Zuhilfenahme des Mediums auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt. Für die SAHA-Behandlung wurden die Zellen für 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h mit einer Konzentration von 2  $\mu$ M behandelt.

In der Kombinationstherapie mit Bay11-7082 und TNF $\alpha$  wurden die Zellen zunächst für 60 min mit 10  $\mu$ M Bay11-7082 inkubiert und nach Mediumwechsel für weitere 30 min mit 1000 U/ml TNF $\alpha$  inkubiert. Die zeitversetzte Behandlung sollte sicherstellen, dass die irreversible Hemmung von IKK $\alpha$  bereits vollständig eingetreten war, bevor TNF $\alpha$  hinzugegeben wurde. Als Positivkontrolle diente TNF $\alpha$  (1000 U/ml für 10 min), als Negativkontrolle wurde DMSO (1:1000) verwendet. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen fixiert.

Die Fixierung erfolgte mit 3,7% Formaldehyd, welches für 10 min bei Raumtemperatur einwirken musste. Nach anschließender Waschung mit PBS wurden die Deckgläschen in eine 12-Well-Platte (1 Deckgläschen/Well) überführt und zur Permeabilisierung der Zellmembran für 10 min mit je 500  $\mu$ l einer 0,5% Triton-X100 Lösung bedeckt.

Nach erneuter 3-maliger Waschung wurde, zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen, jedes Deckglas mit 1 ml einer 1% BSA Lösung bedeckt und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte die Antikörperfärbung.

Hierzu wurden die Zellen zunächst für 2 h mit dem Primärantikörper und anschließend 1 h lang mit dem Sekundärantikörper (abgedunkelt) bei RT inkubiert. Die Entfernung ungebundener Primärantikörper mittels 3-facher PBS-Waschung erfolgte als Zwischenschritt. Die Zellfärbung wurde mit der Gegenfärbung mittels DAPI (0,5 mg/ml, 1:1000 in PBS abgedunkelt für 10 min) vervollständigt. Vor dem Eindeckeln mittels Mounting medium (Vectashield Vector) wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Nikon Eclipse 400 mit dem Fluoreszenzfilter GFP (R)-LP/HQ-FITC- LP (EX 400-500, DM 505, BA 510) und dem DAPI Filter UV-2E/C (EX340-380, DM400, BA 435-485). Es wurde die Software NIS-Elements D2-30 verwendet.

#### 3.5 Proteinanalyse

#### 3.5.1 Herstellung des Protein-Lysats

Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen in 6-Well-Platten erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80% die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren. Nach abgeschlossener Inkubation wurde zunächst das Medium-Inhibitor-Gemisch abgenommen und in je ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Das zur nachfolgenden Zellwaschung verwendete PBS wurde ebenfalls in das entsprechenden Greiner-Röhrchen überführt und die Suspension für 7 min bei 300 g zentrifugiert.

Zur Ablösung der gereinigten Zellen von den Böden der Zellkulturflaschen wurden je Well 50  $\mu$ l Protein-Lysis-Puffer "Ripa-Art" incl. 10  $\mu$ l/ml *Proteaseinhibitor-Cocktail* (Sigma-Aldrich) und 10  $\mu$ l/ml *Phosphataseinhibitoren-Cocktail 3* (Sigma-Aldrich) verwendet und alles auf Eis gelagert. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Diesem Reagenzgefäß wurde dann das entsprechende Zellpellet aus den Greiner-Röhrchen hinzugegeben. Die folgende 30-minütige Inkubation auf Eis diente der Zelllyse. Zur Homogenisierung des Proteinlysates folgte die Überführung auf eine *Qiashredder Mini spin Säule* (Qiagen) mit nachfolgender kurzer Zentrifugierung bei maximaler Geschwindigkeit. Das homogenisierte Lysat wurde bei -70 °C gelagert.

#### 3.5.2 Fraktionierte Proteinlysate

Die Herstellung fraktionierter Proteinlysate erfolgte durch Frau Dr. Annette Schlösser nach dem in Lang et al. [2019]<sup>146</sup> beschriebenen Protokoll.

#### 3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte unter Verwendung des  $BCA^{TM}$  Protein Assay Kit von Pierce. Als Standard diente BSA, welches im Rahmen einer Standardreihe von 2 mg/ml (Maximalkonzentration) mittels Ripa-Puffer in Verdünnungsschritten von 1:2 bis auf 32 µg/ml verdünnt wurde. Zur Messung wurden 10 µl jeder Probe und Standardreihe als Doppelwert in eine Mikropipettierplatte gegeben. Die Proben wurden hierfür im Verhältnis 1:5 mit Ripa verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 200 µl Farbreagenz im Verhältnis 1:50 von Reagenz B zu Reagenz A. Als Blank wurden 4 Wells mit je 10 µl Ripa Puffer verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des ELISA Reader bei einer Absorption von 570 nm gemessen.

#### 3.6 Western Blot

#### 3.6.1 Gel-Elektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 15  $\mu$ g Protein je Probe verwendet, welche mit Ripa-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend im Verhältnis 1:1 mit 6x Lämmli-Puffer versetzt wurden. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 5 min. Bei den verwendeten Gelen handelte es sich um *AnykD* Fertiggele der Firma *BioRad*; der *SDS-PAGE* Laufpuffer stammte von der Firma *Thermo Scientific*. Als Größenmarker dienten 10  $\mu$ l des *Prestained Protein Ladder* des Herstellers *Thermo Scientific*. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte eisgekühlt bei 150-160 V für ca. 90 min.

#### 3.6.2 Blotting und Detektion

Die im Rahmen der Gel-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines elektrischen Feldes (bei 180 mA) unter Eiskühlung auf eine PVDF-Membran transferiert, deren Bindungsstellen zuvor durch Inkubation in reinem Methanol aktiviert worden waren. Der Vorgang dauerte ca. 90 min. Freie Bindungsstellen für unspezifische Proteine wurden mit 5% Magermilchpulver gelöst in 0,1% TBS-T geblockt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers. Um nach abgeschlossener Inkubationszeit noch freie, ungebundene Antikörper zu entfernen, erfolgte vor Zugabe des Sekundär-Antikörpers eine 30-minütige Waschung der Membran in 0,1% TBS-T, wobei die Lösung alle 10 Minuten erneuert wurde. Dieser Schritt wurde auch nach abgeschlossener Inkubationszeit des Sekundärantikörpers wiederholt.

Zur Detektion wurde das *Super Signal West Femto Trial Kit* des Herstellers *Thermo Scientific* verwendet. Die Entwicklung und Fixierung erfolgte mit Hilfe des Curix 60 Filmentwicklers der Firma AGFA.

#### 3.7 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des *RNeasy*<sup>®</sup> *Mini Kit* von *Qiagen* durchgeführt. Lysiert wurden die Zellen nach Behandlung und PBS-Aufreinigung mittels 350 μl *RLT-Buffer* (inkl. 10 μl β-Mercapthoethanol pro ml) je 6-Well. Es folgte die Überführung auf *QiaShredder-Säulen* mit anschließender Zentrifugierung für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit. Dem so homogenisierten Lysat wurden 350 μl 70% Ethanol zugesetzt und die Mischung anschließend zur RNA-Aufreinigung auf *QiaRNeasy-Säulen* gegeben. Die Aufreinigung erfolgte in drei Zentrifugationsschritten unter Verwendung von 700 μl RW1- und insgesamt 1000 μl (2x 500 μl) RPE-Puffer. Nach Elution der aufgereinigten RNA mit Hilfe von je 30 μl RNase-freiem Wasser wurde die Konzentration und die Qualität mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -70 °C gelagert.

#### 3.8 RT-PCR

#### 3.8.1 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (reversen Transkriptasen) eine der eingesetzten RNA komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) gebildet.

Die cDNA-Synthese erfolgte in unserem Fall unter Verwendung des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* von *Qiagen*. Hierzu wurde 1 µg RNA zunächst mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und anschließend 2 µl des *DNA Wipeout Buffer* zugesetzt. Es folgte die Denaturierung bei 42 °C für 2 min. Auf Eis gelagert wurden den Proben je 6 µl des Mastermixes zugegeben und anschließend zur cDNA-Synthese bei 42 °C für 15 Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch eine 3-minütige Inkubation bei 95 °C. Zur weiteren Verarbeitung wurden 1:20 Verdünnungen hergestellt, welche bei -20 °C gelagert wurden.

### 3.8.2 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR (qPCR) ermöglicht neben der reinen Amplifikation auch die Quantifizierung der gebildeten DNA. Die Quantifizierung erfolgt fluoreszenzgestützt während der exponentiellen Phase eines Zyklus, gemessen in Echtzeit. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff *SyBrGreen* interkaliert in die doppelsträngige DNA und erhöht dadurch sein Fluoreszenzsignal. Die Menge des Amplifikats ist proportional zu der gemessenen Fluoreszenz. Um die vorhandenen Templates bestimmen zu können, wurden die Zyklen ermittelt, die es zum Erreichen des Ct-Werts *(cycle threshold)* benötigte. Für eine relative Quantifizierung wurde *TBP* als Referenz-Gen gemessen. Für die Messung wurde das *QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit* von *Qiagen* verwendet und in den Programmen des ABI7500 oder Lightcyclers ausgewertet. Je Probe wurden 2 µl cDNA mit 18 µl des Mastermixes eingesetzt.

Mastermix	Volumen
2fach QuantiTect SyBr Green	10 µl
Primer forward	1 μl (100 pmol/ml)
Primer reverse	1 μl (100 pmol/ml)
Aqua ad inj.	6 μΙ
cDNA 1:20	2 μΙ
Gesamtvolumen	20 μl

Table 3.1: Übersicht des Mastermixes.

# 3.9 Durchflusszytometrie

Mir der Durchflusszytometrie (FACS) lassen sich mit Hilfe von Streustrahlung und Fluoreszenz qualitative Aussagen über einzelne Zellen machen. Das Zellvolumen kann mittels Vorwärtsstreulicht (FCS = *Forward Scatter*), die interzellulären Bestandteile, wie Granula und Zellkern, mittels Seitwärtsstreulicht (SSC= *Side scatter*) ermittelt werden. Um Aussagen über Zellzyklus, Apoptose und Nekrose machen zu können, muss mit fluoreszierenden Markern gefärbt werden.

In Vorbereitung auf die Messung wurden die Zelllinien in 25-cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und für 48 h mit 5  $\mu$ M SAHA bzw. 2  $\mu$ M Bay117082/-85 behandelt. Als Kontrolle diente 0,1% DMSO. Für jede Konzentration wurden Doppelproben angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und mit dem zuvor zur Zellwaschung verwendeten PBS in 15-ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Trypsinierung der Zellen erfolgte mit Hilfe von 1 ml Trypsin-EDTA, welches mit dem zuvor abgenommenen Medium

inaktiviert wurde. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 300 rpm. An deren Ende wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1000  $\mu$ l PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen an der Gesamtzellzahl wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l 1x Annexin Binding-Buffer resuspendiert, welchem zuvor 1  $\mu$ l/ml Propidiumiodid und 5  $\mu$ l FITC markiertes Annexin V zugesetzt worden war. Nach Durchmischung mittels Vortexen wurden die Proben für 10 min abgedunkelt inkubiert. Je Probe wurden 10<sup>4</sup> Zellen ausgewertet.

# 4 Ergebnisse

# 4.1 Reproduktion der SAHA-induzierten Effekte auf ausgewählte Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit sollten zunächst wichtige Experimente von Niegisch et al.<sup>147</sup> zu den Effekten von SAHA auf unsere ausgewählten Urothelkarzinomzelllinien wiederholt werden.

# 4.1.2 Auswirkungen von SAHA auf die Zellvitalität

Zunächst wurden die Effekte von SAHA auf die Zellvitalität der Urothelkarzinomzelllinien VM-Cub1, T24 und RT112 gemessen. Die Behandlung mit dem Inhibitor erfolgte dabei über einen Zeitraum von 72 h. Zur Kontrolle wurde die benigne Urothelzelllinie TERT-NHUC mitgeführt. Der Versuch wurde 4-fach wiederholt, für TERT-NHUC einmal. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb. 4.1: Zellvitalitäsassay zur Beurteilung der Auswirkungen von SAHA auf die Viabilität der Zelllinien VM-Cub1 (A), T24 (B), RT112 (C), TERT-NHUC (D). Die Zellen wurden einmalig mit SAHA behandelt und nach 72-stündiger Inkubation ausgewertet. SAHA wurde in den Konzentrationen 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Signifikante Unterschiede laut T-Test sind mit einem Sternchen markiert, \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001. Die Messungen wurden jeweils mit Vierfachwerten durchgeführt, aus denen das arithmetische Mittel errechnet wurde.

Wie erwartet, führt SAHA in allen vier Zelllinien mit steigender Konzentration zu einer Reduktion der Zellvitalität. Am sensitivsten, mit einem  $IC_{50}$  unter 2 µM, reagierte die benigne Zelllinie TERT-NHUC, welche auch schon in niedrigen Konzentrationen deutlich auf SAHA ansprach. Die malignen Zelllinien sprachen dagegen nur schlecht auf geringe Dosen SAHA (0,5 µM, 1 µM) an (T24), oder reagierten sogar mit einer leichten Zunahme der Zellzahl. Am wenigsten sensitiv war die VM-Cub1, welche bei 1 µM SAHA zudem deutlich mehr vitale Zellen als die Kontrollprobe aufwies. Erst ab 5 µM kam es in allen Zelllinien zu ausgeprägten zytotoxischen Effekten. Von den malignen Zelllinien stellte sich die T24 am empfindlichsten mit einem berechneten  $IC_{50}$  von 3,48 µM heraus.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass SAHA erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen zu zytotoxischen Effekten bei den malignen Zelllinien führte. Niedrige Dosen könnten dagegen zelllinienabhängig sogar einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum haben.

#### 4.1.3 Morphologische Veränderungen unter Einfachbehandlung mit SAHA

Zur Dokumentation morphologischer Veränderung unter der Behandlung mit SAHA wurden drei Urothelkarzinomzelllinien sowie eine urotheliale Primärkultur (UP) mit Konzentrationen von 2  $\mu$ M und 10  $\mu$ M SAHA behandelt und nach 24 h und 48 h mittels Lichtmikroskop ausgewertet.



В т24



**Abb. 4.2:** Morphologische Veränderungen der Zelllinien VM-Cub1 (A), T24 (B), RT112 (C) und UP220 (D) unter SAHA-Einfachbehandlung. Die Zellen wurden einmalig mit 2 μM bzw. 10 μM SAHA behandelt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. 100-fache Vergrößerung.

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, nahm in allen vier Zelllinien in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit die Zellzahl stark ab. Nach 48 h waren über alle Zelllinien hinweg bei 10 µM SAHA nur noch sehr wenige vitale Zellen nachweisbar. Die Zelllinie VM-Cub1 zeigte bereits nach 24-stündiger Behandlung, unabhängig von der Konzentration, morphologische Veränderungen in Form von langen schlanken Zellausläufern; im weiteren Verlauf entwickelten die Zellen verstärkt Granula und Vakuolen und begannen sich abzulösen. In der RT112 erkennt man nach 48-stündiger Inkubation mit 10 µM SAHA neu aufgetretene zytoplasmatische, dem Nukleus angelagerte Granula und ebenfalls verstärkt Zellausläufer. Eindeutige Apoptose-Morphologien waren selten. Die urotheliale Primärkultur (UP220) und die T24 zeigten wenige morphologische Veränderungen.

#### 4.1.4 Induktion von Apoptose/Nekrose durch Behandlung mit SAHA

Um zu differenzieren durch welchen Mechanismus der Zelltod unter der SAHA-Behandlung eingeleitet wird, wurde eine FACS-Analyse nach Färbung mit Propidium-Iodid und Annexin-V durchgeführt. Die ausgewählte SAHA-Konzentration lag bei 5 µM. Aufgrund des zytotoxischen Effekts dieser Konzentration und der damit zu erwartenden geringen Zellzahl wurde die Behandlungszeit auf 48 h reduziert.



Abb. 4.3: FACS-Analyse zur Bestimmung des Anteils von Apoptose und Nekrose in Urothelkarzinomzellen (VM-Cub1, T24, RT112) unter SAHA-Einfachbehandlung. Die Zellen wurden einmalig mit 5  $\mu$ M SAHA behandelt und nach 48 h mit Propidiumiodid und Annexin-V angefärbt und ausgewertet. DMSO diente zur Lösungsmittelkontrolle. apoptotische Zellen: hellgrau, nekrotische Zellen: dunkelgrau, vitale Zellen: schwarz.

In allen Zelllinien stieg unter der Behandlung sowohl der Anteil von apoptotischen als auch nekrotischen Zellen an (Abbildung 4.3). Ferner zeichnet sich eine Korrelation zwischen der SAHA-Sensitivität und dem Anteil der apoptotischen Zellen ab. Je empfindlicher die Zelllinie auf SAHA reagierte, desto mehr Zellen starben durch Apoptose. Am deutlichsten ist dies bei der T24 zu sehen. Nach 48 h sind 70% der Zellen abgestorben, davon 52% durch Apoptose. Bei der RT112 beträgt der Anteil toter Zellen 54%, mit einem apoptotischen Anteil von 30%. Die VM-Cub1 zeigt mit 63% vitaler Zellen nach 48 h die geringste Sensitivität. Die Zellen sind hier zu gleichen Teilen durch Apoptose und Nekrose zu Grunde gegangen.

# 4.2 Hinweise auf die NF-κB-Aktivierung auf Proteinebene

Um eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs durch SAHA auf Proteinebene nachweisen zu können, wurden Western Blot-Analysen der zentralen Proteine des klassischen NF-κB-Signalwegs, IκBα und RelA (p65), unter SAHA-Behandlung durchgeführt. Des Weiteren sollte mittels Immuncytochemie eine SAHA-induzierte Translokation der NF-κB-Proteine RelA (p65) und NF-κB1 (p50) in den Zellkern sichtbar gemacht werden.

# 4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der Proteine RelA und p50 in Urothelkarzinomzelllinien

Zunächst sollte anhand von unbehandelten Zellen die intrazelluläre Lokalisation der Proteine RelA und p50 bestimmt werden. Hierzu wurden die Zelllinien VM-Cub1, T24 und RT112 in nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen fraktioniert und die daraus gewonnenen Proteinextrakte anschließend geblottet.



**Abb. 4.4: Western Blot zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation der NF-κB-Monomere RelA und p50 in unbehandelten Urothelkarzinomzelllinien.** Verwendet wurden die Zelllinien T24, RT112 und VM-Cub1. Als Ladekontrolle dienten α-Tubulin (zytoplasmatisch (z)) und TBP (nukleär (n)).

Aus der Abbildung 4.4 wird deutlich, dass bereits im unbehandelten Zustand Unterschiede zwischen den Zelllinien in der intrazellulären Lokalisation von RelA und p50 bestehen. RelA und p50 kommen in der Zelllinie RT112 rein zytoplasmatisch vor, wohingegen bei der T24 beide Proteine in beiden Zellkompartimenten nachweisbar sind. Die Zelllinie VM-Cub1 weist RelA rein zytoplasmatisch auf, p50 konnte in beiden Zellkompartimenten detektiert werden. In der Zelllinie T24 sind allerdings nukleär Reste von  $\alpha$ -Tubulin nachweisbar.

# 4.2.2 Effekte von SAHA auf die Expression von IκBα und ReIA in Urothelkarzinomzelllinien

Um eine mögliche Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch SAHA über die Zeit zu verfolgen, wurden die drei Zelllinien je für 30 min, 60 min, 90 min und 5 h mit 10  $\mu$ M SAHA behandelt. Als Positivkontrolle diente der Hauptinduktor des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, TNF $\alpha$ , in einer Konzentration von 1000 U/ml.



Abb. 4.5: Western Blot zur Bestimmung der I $\kappa$ B $\alpha$ - und RelA-Expression in den malignen Zelllinien VM-Cub1 (A), T24 (B) und RT112 (C) nach Exposition mit SAHA. Als Positivkontrolle diente TNF $\alpha$ . SAHA wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M und TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 1000 U/ml eingesetzt. Für die Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO.

Wie in der Abbildung 4.5A zu sehen ist, führt die Behandlung der Zelllinie VM-Cub1 mit TNF $\alpha$  wie erwartet zu einer initialen Abnahme der IkB $\alpha$ -Expression mit vollständigem Fehlen nach 30 min und anschließender langsamer Zunahme der Proteinmenge über die Behandlungsdauer. Das Maximum ist nach 90 min erreicht, danach sinkt die Expression wieder ab. Dieser wellenförmige Verlauf ist in der Literatur bekannt und basiert auf dem Mechanismus der negativen Rückkopplung, bei dem unter anderem das Gen für IkBa durch RelA aktiviert wird. Unter Behandlung mit SAHA kommt es nach 30 min zu einer deutlichen Zunahme von IkBa, welche in abgeschwächter Form auch nach 60 min weiter besteht. Nach 90-minütiger Behandlungszeit entspricht die Proteinmenge der Kontrolle; die 5-stündige SAHA-Behandlung führte zu einer Abnahme der IkBa-Expression. Im Vergleich zur TNFa-Behandlung erscheint der Verlauf gegenläufig. Im Gegensatz zu IkBa veränderte sich die Menge an RelA bei beiden Behandlungen kaum.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der Zelllinie VM-Cub1 die erwartete Abnahme der IκBα-Expression als Zeichen der Induktion des NF-κB-Signalweges durch SAHA nur nach 5 h nachweisbar war. Kürzere Behandlungszeiten zeigen dagegen eine Zunahme der Expression und legen damit die Vermutung nahe, dass SAHA in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer aktivierend oder inhibierend auf den NF-κB-Signalweg einzuwirken scheint. Die Gesamtmenge an RelA veränderte sich in keinem Fall.

In der Zelllinie T24 (Abb. 4.5B) verhält sich das Expressionsniveau von IκBα unter Behandlung mit TNFα ähnlich zu dem in der VM-Cub1. Nach initial nicht nachweisbarem IκBα unter 30-minütiger Behandlung mit TNFα nimmt die Proteinmenge über die Behandlungsdauer wieder zu und erreicht ihr Maximum nach 90 Minuten. Anschließend sinkt der Proteingehalt wieder ab. Anders als bei der VM-Cub1 kann in allen Proben dieser Zelllinie eine geringe Zunahme der RelA-Expression detektiert werden. Ein direkter Zusammenhang mit der IκBα-Expression besteht allerdings nicht.

In den mit SAHA behandelten Proben fällt eine Abnahme der IκBα-Expression nach 30-, 60und 90-minütiger Behandlungsdauer mit einer dazu korrelierenden Zunahme der RelA-Expression auf. Die Probe nach 5-stündiger Behandlung zeigt keinerlei Expressionsveränderung, wohingegen die Ergebnisse der Positivkontrolle für die IκBα-Expression den Werten der Zelllinie VM-Cub1 entsprechen.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann in dieser Zelllinie von einer SAHA-bedingten Induktion des NF-κB-Signalwegs mit Abnahme von IκBα über eine Behandlungsdauer von 30 bis 90 Minuten ausgegangen werden, wobei das Maximum bei 60 und 90 Minuten lag. Korrelierend dazu stieg die RelA-Expression an.

Die TNFα-Behandlung führte bei der RT112 (Abb. 4.5C), wie in den beiden vorherigen Zelllinien, zu einer eindeutigen Veränderung im IκBα-Expressionsniveau, wobei der Wiederanstieg der Proteinkonzentration in dieser Zelllinie nicht, wie bei den vorherigen

Zelllinien gesehen, wellenförmig über die Behandlungszeit verläuft, sondern eher langsam und kontinuierlich zunehmend. Die RelA-Expression blieb unter TNFα unverändert. Die Behandlung der Zellen mit SAHA führte ausschließlich nach 5 h zu einer Änderung der IκBα-Expression, welche sich in Form einer verminderten Proteinmenge detektieren ließ. Auch unter SAHA kam es zu keinerlei Veränderung des RelA-Expressionsniveaus.

Zusammenfassend führte SAHA ausschließlich nach 5-stündiger Behandlung zu einer nachweisbaren Induktion des NF-κB-Signalwegs mit Abnahme der IκBα-Expression, wobei keine korrelierende Änderungen der ReIA-Expression nachweisbar waren.

Betrachtet man die Ergebnisse für alle Zelllinien übergreifend, lässt sich festhalten, dass sich die Ergebnisse nach Behandlung mit TNFα ähneln. Die Abnahme von IκBα ist in allen Fällen nach 30 Minuten maximal, in der Zelllinie RT112 scheint die Wiederherstellung des Basalzustandes jedoch verzögert gegenüber den beiden anderen Linien. Die Reaktion auf SAHA ist zwischen den Zelllinien jedoch unterschiedlich. Während SAHA in der Zelllinie T24 zu einer Induktion des NF-κB-Signalwegs mit maximaler Abnahme des IκBα nach 60 und 90 Minuten mit dazu korrelierendem Anstieg der RelA-Expression führte, kam es in den beiden anderen Zelllinien erst nach 5-stündiger Inkubation mit SAHA zu einer Induktion des NF-κB-Signalwegs mit reduziertem IκBα-Expressionsniveau. Ein korrelierender RelA-Anstieg blieb aus.

#### 4.3 Immunfluoreszenz

Ein weiterer Ansatz, um die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs nachweisen zu können, war die Immunfluoreszenz. Dabei wurde die Lokalisation von RelA innerhalb unbehandelter Zelllinien und unter Behandlung mit TNFα und SAHA mit Hilfe immuncytochemischer Anfärbung bestimmt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Aktivierung dieses Signalwegs unabhängig von RelA erfolgen würde, wurde NF-κB1 (p50), welches an RelA gekoppelt den am häufigsten vorkommenden dimeren Transkriptionsfaktor des klassischen NF-κB-Signalwegs darstellt, ergänzend immuncyto-chemisch angefärbt.

#### 4.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von RelA in unbehandelten Zelllinien

Um die intrazelluläre Lokalisation von RelA in unbehandelten Zelllinien zu charakterisieren, wurde dieses in verschiedene Zelllinien immunzytochemisch angefärbt. Um Unterschiede zwischen normalen und malignen Zellen erfassen zu können, wurden zusätzlich zu den bisher verwendeten Zelllinien eine urotheliale Primärkultur (UP) sowie weitere Tumorzelllinien mitgeführt. Die UP wurden hierfür auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern kultiviert und nach 24 h mit dem spezifischen AK gefärbt.



Abb. 4.6: Immunzytochemische Färbung von RelA (FITC, grün) in den Zelllinien 5637, T24, J82, UP226, VM-Cub1 und BFTC905. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert (in den als Merged markierten Spalten zu sehen).

Die Färbungen lassen sich so interpretieren, dass in allen Zelllinien unabhängig von ihrer Dignität RelA überwiegend bis rein zytoplasmatisch lokalisiert ist.

# 4.3.2 Effekte der SAHA-Behandlung auf die intrazelluläre Lokalisation von RelA und NF-κB1 (p50)

Zum Nachweis einer SAHA-induzierten Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalweges wurden die Zelllinien zunächst mit SAHA vorbehandelt und anschließend immuncytochemisch auf RelA und NF-κB1 (p50) gefärbt. Dabei wurden Behandlungszeiten von 30 min, 60 min, 90 min, 3 h, 4 h und 5 h ausgewählt.

Als Positivkontrolle für die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs diente TNFα; als weitere Kontrolle wurden die Zellen vor der Zugabe von TNFα mit dem IKK-Inhibitor Bay11-7082 behandelt. Dieses Experiment diente zugleich als molekularer Wirknachweis für diesen Inhibitor.

### RelA



Abb. 4.7: Immunzytochemische Färbung von RelA (FITC, grün) in der Urothelkarzinomzelllinie T24 (A) im Vergleich mit der urothelialen Primärkultur UP226 (B) nach Behandlung mit TNF $\alpha$  und SAHA. Die Zellen wurden mit 2  $\mu$ M SAHA für 30 min, 60 min und 120 min inkubiert. Als Positivkontrolle diente TNF $\alpha$ , als Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert (in den als Merged markierten Spalten zu sehen).

In der Zelllinie T24 und der urothelialen Primärkultur (UP226) ließ sich mit Hilfe von TNFα die Translokation von RelA in den Zellkern auslösen. Hervorzuheben ist, dass TNFα in der T24 über alle Zellen hinweg zu einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen zytoplasmatischer und intranukleärer RelA-Konzentration führte, wohingegen es in der urothelialen Primärkultur zu einer deutlichen Verschiebung zu Gunsten des Zellkerns kam.

Die mit SAHA vorbehandelten Zellen der Zelllinie T24 zeigten nach 30 min und 60 min eine Translokation des zytoplasmatischen RelA in den Zellkern, anders als bei TNFα war dieser Effekt jedoch nicht über alle Zellen hinweg erkennbar. Zu allen späteren Zeitpunkten war RelA nicht mehr im Zellkern zu erkennen.

In der mit SAHA behandelten UP226 konnte nach 30 min und 120 min ein vermehrtes nukleäres Signal detektiert werden, welches, wie in der Zellinie T24, nur für einen Teil der angefärbten Zellen deutlich erkennbar war.



p50

Abb. 4.8: Immunzytochemische Färbung von p50 (FITC, grün) in der Urothelzelllinie T24 (A) im Vergleich mit der urothelialen Primärkultur UP226 (B) nach Behandlung mit TNF $\alpha$  und SAHA. Die Zellen wurden mit 2  $\mu$ M SAHA für 30 min, 60 min und 120 min inkubiert. Als Positivkontrolle diente TNF  $\alpha$ , als Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert (in den als Merged markierten Spalten zu sehen).

Wie die Abbildung 4.8 zeigt, ließ sich durch TNFα in allen Zellen der Zelllinie T24 eine Translokation des zytoplasmatischen p50 in den Nukleus mit ausgeglichenem Verhältnis zwischen intranukleärer und zytoplasmatischer Konzentration auslösen. Bei der urothelialen Primärkultur (UP226) war p50 bereits im unbehandelten Zustand in den beiden Zellkompartimenten detektierbar, jedoch ohne einheitliche Verteilung zu Gunsten eines bestimmten Kompartimentes. Die Vorbehandlung mit TNFα veränderte die p50-Verteilung in der urothelialen Primärkultur nicht erkennbar.

Über alle Behandlungszeiten hinweg konnte mittels SAHA eine Translokation des p50 in den Nukleus der Zellen der Zelllinie T24 ausgelöst werden, wobei dieser Effekt nicht einheitlich in allen Zellen erkennbar war. Neben Zellen mit ausgeglichenem p50-Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma konnten auch immer wieder vereinzelte Zellen mit überwiegend intranukleärem p50 detektieren werden.

Bei der urothelialen Primärkultur (UP226) ließ sich durch die 120-minütige Vorbehandlung mit SAHA in allen Zellen eine Translokation des p50 in den Zellkern auslösen. Zu allen anderen Expositionszeiten nahm SAHA keinen erkennbaren Einfluss auf die p50-Verteilung.

Zur Vervollständigung dieser Versuchsreihe wurden die Versuche ebenfalls mit der Zelllinie VM-Cub1 durchgeführt. Da hierbei weder eine Veränderung der RelA- noch der p50-Lokalisation unter SAHA-Exposition zu detektieren war, wurde auf eine Abbildung der Ergebnisse verzichtet. Dr. Margaretha Skowron wiederholte, unabhängig von meinen Versuchen, die Immuncytochemie zur Zelllinie VM-Cub1 mit gleichen Ergebnissen. Die hier abgebildeten Fotos stammen aus meinem Experiment.

### 4.3.3 Molekularer Wirknachweis von Bay11-7082

Um eine wirksame Blockierung der TNFα-induzierten Translokation von RelA bzw. p50 in den Zellkern durch Bay11-7082 nachzuweisen, wurden die Zellen der Zelllinie T24 zunächst für 60 min mit dem Inhibitor behandelt und anschließend für weitere 30 min mit TNFα inkubiert.



Abb. 4.9: Immunzytochemische Färbung von RelA (A) und p50 (B) in der Urothelkarzinomzelllinie T24 zum Nachweis der Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Bay11-7082. Die Zellen wurden hierfür zunächst mit 10  $\mu$ M Bay11-7082 für 60 min vorbehandelt und anschließend für weitere 10 min mit 1000 U/ml TNF $\alpha$  inkubiert. Als Positivkontrolle diente TNF $\alpha$  in gleicher Konzentration, als Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert (in den als Merged markierten Spalten zu sehen).

Wie aus der Abbildung 4.9 ersichtlich, verhinderte Bay11-7082 erwartungsgemäß die Induktion der nukleären Translokation von RelA und p50 durch TNFα.

### 4.4 RT-PCR Analyse der Expression von NF-κB-Zielgenen

Zur Messung der SAHA-vermittelten Effekte auf die Expression der Zielgene *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CCND1* (Cyclin D1), *BCL2L1* (BCL-XL), *CXCL8* (IL8), *XIAP* (XIAP), *BIRC5* (Survivin) des NF-κB-Signalwegs wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden in Zusammenschau mit den bisherigen Versuchsergebnissen die Zelllinien VM-Cub1 vom epithelialen Phänotyp und T24 vom mesenchymalen Phänotyp ausgewählt.

Um neben dem Einfluss unterschiedlicher SAHA-Konzentrationen auch den Einfluss der Expositionszeit auf die Genexpression abbilden zu können, wurden die Zellen für jeweils 5 h und 24 h mit SAHA inkubiert. Dabei wurde eine Konzentration nahe des errechneten  $IC_{50}$  beider Zelllinien (2  $\mu$ M nach 72 h Inkubation) sowie die deutlich darüber liegende Konzentration von 10  $\mu$ M ausgewählt, um auch nach kurzer Inkubationszeit von 5 h messbare Effekt zu erzielen. Die Inkubationszeiten wurden aufgrund eines Pilotexperiments ausgewählt, das hier nicht gezeigt wird.

Die Kombination von SAHA mit Bay11-7082 sollte die Frage klären, ob die Substanz als selektiver und irreversibler Inhibitor der TNFα-induzierten Phosphorylierung von IκBα zuverlässig den unter SAHA-Exposition erwarteten Anstieg der Zielgen-Expression verhindern kann. Zur Kontrolle wurde Bay11-7082 als Einfachbehandlung mitgeführt; TNFα-Behandlung diente als Positivkontrolle für die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs.







Abb. 4.10: Vergleichende Darstellung des relativen Expressionsniveaus der Gene A: *CDKN1A* ( $p21^{CIP1}$ ), B: *CCND1* (Cyclin D1), C: *BCL2L1* (BCL-XL), D: *CXCL8* (IL8), E: *XIAP* (XIAP), F: *BIRC5* (Survivin) in der Zelllinie T24 nach 5 h bzw. 24 h Inkubation mit SAHA (2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Bay11-7082 (5  $\mu$ M) als Monosubstanz sowie einer Kombinationsapplikation beider Inhibitoren (in gleicher Konzentration wie in der jeweiligen Einfachbehandlung) (A1-F1) oder nach 2 h, 5 h und 24 h Inkubation mit TNF $\alpha$  (A2-F2). Die Normierung erfolgte mit TBP als Referenzgen. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Signifikante Unterschiede laut MWU-Test sind mit einem Sternchen markiert, p<0,05.

**p21<sup>CIP1</sup>:** Nach Behandlung mit TNFα stieg das p21<sup>CIP1</sup>-Expressionsniveau zu allen Zeitpunkten signifikant an. Passend dazu führte die Inkubation mit Bay11-7082 über 24 h zu einem signifikanten Absinken von p21<sup>CIP1</sup>. Nach 5 h ließ sich keine Expressionsveränderung detektieren.

Die Behandlung mit SAHA führte mit beiden Konzentrationen und über alle Zeitpunkte hinweg zu einem signifikanten Anstieg des Expressionsniveaus. Auch unter kombinierter Behandlung mit Bay11-7082 kam es zu einer signifikanten Induktion der Genexpression nach 5 und 24 h, wobei hier die Kombination mit 10  $\mu$ M SAHA hervorstach.

**Cyclin D1:** Betrachtet man zuerst die Positivkontrolle für den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg, TNF $\alpha$ , so führt die Aktivierung dieses Signalwegs nach 2 h und 24 h zu einer signifikanten

Veränderung des Cyclin D1-Expressionsniveaus mit einem Abfall nach 2 h und einem Anstieg nach 24 h. Eine entsprechende Erhöhung durch die Bay11-7082-Behandlung war nicht detektierbar.

Die Exposition mit SAHA führte nach 5 h zu einer signifikanten Expressionsminderung von Cyclin D1 unter beiden Konzentrationen, die Kombination von 2  $\mu$ M SAHA mit 5  $\mu$ M Bay11-7082 ließ das Expressionsniveau signifikant ansteigen. In den nach 24 h ausgewerteten Proben führte SAHA in der 2  $\mu$ M-Konzentration zu einem signifikanten Expressionsanstieg, wohingegen die Konzentration von 10  $\mu$ M in der Einzelbehandlung, wie auch in der Kombination mit Bay11-7082, zu einer signifikanten Abnahme gegenüber der Kontrollprobe führte.

**BCL-XL:** Wie in den Diagrammen C1 und C2 ersichtlich, nimmt weder die Aktivierung noch die Inhibition des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs modulierenden Einfluss auf die Expression von BCL-XL. SAHA führte in beiden Dosierungen zu einer signifikanten Abnahme des BCL-XL nach 5 h, induzierte jedoch über 24 h einen Anstieg der Genexpression. Dieser Anstieg war unter 2  $\mu$ M SAHA, aber nicht unter 10  $\mu$ M SAHA statistisch signifikanten. Die Kombination aus Bay11-7082 mit 10  $\mu$ M SAHA führte nach 24 h zu einer signifikanten Verminderung der BCL-XL Genexpression.

**IL8:** TNF $\alpha$  induzierte nach 5 und 24 h einen signifikanten Anstieg der IL8-Genexpression. Überraschenderweise führte auch die Behandlung mit Bay11-7082 zu einem Anstieg der Genexpression, welche allerdings nur nach 24 h einen signifikanten Wert erreichte. Unter 2  $\mu$ M SAHA stieg die Expression nach 5 h signifikant an, fiel jedoch nach gleicher Inkubationszeit unter der Kombinationstherapie mit Bay11-7082 signifikant ab. Nach 24 h kam es über alle Behandlungen hinweg zu einem signifikanten Anstieg des Expressionsniveaus von IL8.

**XIAP**: Ähnlich wie bei Cyclin D1 induzierte TNFα eine signifikante Verminderung der XIAP-Expression nach 2-stündiger Inkubation und einen signifikanten Anstieg nach 24 h. Bay11-7082 führte jedoch zu keinem entsprechenden Abfall nach 24 h, verminderte aber die Expression von XIAP nach 5 h signifikant.

Nach 5 h nahm das Expressionsniveau von XIAP unter beiden SAHA-Konzentrationen und unter der Kombination aus niedriger SAHA-Konzentration mit Bay11-7082 signifikant ab. Nach 24 h war ein signifikanter Abfall der Expression unter 10 μM SAHA und unter beiden Kombinationstherapien mit Bay11-7082 zu verzeichnen.

**Survivin:** Bei der Expressionsanalyse von Survivin fällt auf, dass weder TNF $\alpha$  noch SAHA und Bay11-7082 nach 5 h signifikanten Einfluss auf die Genexpression genommen haben. Ausschließlich die Kombination beider Inhibitoren löste einen signifikanten Anstieg von Survivin aus. Die 24-stündige Versuchsreihe zeigte einen signifikanten Expressionsabfall unter SAHA 10 µM, Bay11-7082 und beiden Kombinationstherapien.



#### Zelllinie VM-Cub1



Abb. 4.11: Vergleichende Darstellung des relativen Expressionsniveaus der Gene A: *CDKN1A* ( $p21^{CIP1}$ ), B: *CCND1* (Cyclin D1), C: *BCL2L1* (BCL-XL), D: *CXCL8* (IL8), E: *XIAP* (XIAP), F: *BIRC5* (Survivin) in der Zelllinie VM-CUB1 nach 5 h bzw. 24 h Inkubation mit SAHA (2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) und Bay11-7082 (5 $\mu$ M) als Monotherapie sowie einer Kombinationstherapie beider Inhibitoren (in gleicher Konzentration wie in der jeweiligen Einfachbehandlung) (A1-F1) oder nach 2 h, 5 h und 24 h Inkubation mit TNF $\alpha$  (A2-F2). Die Normierung erfolgte mit TBP als Referenzgen. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Signifikante Unterschiede laut MWU-Test sind mit einem Sternchen markiert, p<0,05.

**p21<sup>CIP1</sup>:** Die Expression von p21<sup>CIP1</sup> wurde durch TNFα in der Zelllinie VM-Cub1 signifikant über alle erhobenen Zeiten hinweg verändert. Während sich unter der 2-stündigen und 5-stündigen Behandlung mit TNFα ein Anstieg, im Sinne einer Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs, nachweisen ließ, führte die Inkubation über 24 h zu einer im Vergleich mit der Kontrollprobe niedrigeren Genexpression. Die Inhibition des NF-κB-Signalwegs auf der Stufe von IKKα durch Bay11-7082 ergab entsprechend signifikante Verminderungen der Expression.

Entsprechend der Erwartungen konnte unter der Behandlung mit SAHA ein signifikanter Anstieg des Expressionsniveaus für beide Konzentrationen und Zeiten detektiert werden. Dieser Anstieg wurde durch die Kombination von SAHA mit Bay11-7082 nicht verhindert.

**Cyclin D1:** Bei der Expressionsanalyse von Cyclin D1 fällt auf, dass die Inkubation der Zelllinie VM-Cub1 mit TNFα zu jeweils signifikanten Veränderungen der Genexpression mit Abfall nach 5 h und Anstieg nach 24 h führte. Entgegen der Erwartung führte die Behandlung mit Bay11-7082 hier zu gleichgerichteten Veränderungen.

Die Behandlung mit SAHA, wie auch die Kombination mit Bay11-7082, verminderten die Genexpression von Cyclin D1 signifikant, unabhängig von der Inkubationszeit.

**BCL-XL:** Wie aus den Diagrammen ersichtlich, löste TNFα, unabhängig von der Inkubationszeit, einen signifikanten Anstieg der Genexpression von BCL-XL aus.

Alle weiteren Behandlungen veränderten die Expression von BCL-XL gegenüber den Kontrollproben nach 5 h nicht signifikant. Allein die 24-stündige Monotherapie mit SAHA führte in der Konzentration von 2  $\mu$ M zu einem signifikanten Anstieg des BCL-XL-Expressionsniveaus, während 10  $\mu$ M SAHA bei gleicher Inkubationszeit zu einem gegenläufigen Ergebnis, also einem signifikantem Abfall der Expression führte. Alle weiteren Mono- und Kombinationsbehandlungen mit 24-stündiger Inkubation hatten keinen relevanten Effekt auf die BCL-XL-Expression. Selbst der nach positivem Ansprechen auf TNF $\alpha$  zu erwartende Abfall der Genexpression unter Bay11-7082 blieb aus.

**IL8:** In der Expressionsanalyse von IL8 fielen die hochsignifikanten, von der Inkubationszeit unabhängigen Anstiege des Expressionsniveaus unter TNFα auf, wobei die dazu korrelierende Reduktion der Genexpression unter Bay11-7082 nach 5 und 24 h ausblieb. Nach 5-stündiger Inhibition des klassischen Signalwegs konnte sogar eine signifikante Zunahme der Proteinmenge nachgewiesen werden. SAHA führte, wie im Vorfeld vermutet, zu einem signifikanten Anstieg des IL8-Expressionsniveaus über beide Behandlungszeiten hinweg.

Die Kombinationsbehandlung mit SAHA und Bay11-7082 ergab, trotz des unter beiden Einzelbehandlungen detektierten Expressionsanstiegs, nach 5 h keine relevante Veränderung des IL8-Expressionsniveaus. Erst nach 24-stündiger Behandlung der Zellen konnte ein signifikanter Anstieg unter beiden Konzentrationskombinationen detektiert werden.

**XIAP:** TNF $\alpha$  induzierte die Expression von XIAP nach 24-stündiger Inkubation signifikant. Alle Einzelbehandlungen mit Bay11-7082 und SAHA verminderten die Genexpression im Vergleich mit den Kontrollproben, jedoch nicht statistisch signifikant. Nur die 24-stündigen Inkubation mit der Kombination aus Bay11-7082 und 10  $\mu$ M SAHA bedingte ein signifikantes Absinken des Expressionsniveaus.

**Survivin:** Die Behandlung mit TNF $\alpha$  führte nach 24 h zu einer signifikant erhöhten Expression von Survivin mit dazu korrelierendem Abfall unter 5 µM Bay11-7082 über die gleiche Behandlungsdauer. SAHA induzierte dagegen nicht, sondern verminderte tendenziell die Genexpression mit Signifikanz nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µM des Inhibitors. Die Kombinationstherapie aus 2 µM und 10 µM SAHA mit Bay11-7082 ergab ebenfalls einen signifikanten Abfall des Expressionsniveaus nach 24-stündiger Behandlungsdauer. Nach 5 h zeigten sich keine relevanten Veränderungen der Survivin-Expression gegenüber der Kontrollprobe.

Fasst man die Ergebnisse aus beiden Zelllinien zusammen, so lassen sich die Ergebnisse dahingehen deuten, dass der NF-κB-Signalweg in Urothelkarzinomzelllinien unter basalen Wachstumsbedingungen wenig aktiv ist. Durch TNFα lässt sich eine deutliche Aktivierung erzielen; allerdings ist die Wirkung auf die Expression der kanonischen Zielgene unterschiedlich (vgl. Diskussion, Abschnitt 5.2). Die Auswirkungen der SAHA-Behandlung auf den Signalweg sind demgegenüber sehr begrenzt und zudem nicht einheitlich in den beiden untersuchten Zelllinien.

# 4.5 Wirkung der Behandlung von Urothelkarzinomzelllinien mit Bay11-7082 und Bay11-7085

#### 4.5.1 Effekte von IKK-Inhibitoren auf die Vitalität der Urothelkarzinomzelllinien

Um die Frage beantworten zu können, welchen Effekt die Inhibition des klassischen NF-κB-Signalwegs auf die Vitalität der Urothelkarzinomzelllinien hat, wurde der Signalweg auf Höhe von IκBα blockiert und 72 h später die Zellvitalität bestimmt. Als Inhibitoren dienten Bay11-7082 und Bay11-7085, welche selektiv und irreversibel die Phosphorylierung der Serinreste des IκBα über eine Blockierung der IκB-Kinase verhindern. Sie unterbinden darüber die Polyubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von IκBα.

Das Experiment wurde mit den drei bisher durchgängig verwendeten Urothelkarzinomzelllinien (VM-Cub1, T24, RT112) sowie der urothelialen Normalzelllinie TERT-NHUC durchgeführt. Die Behandlung erfolgte einmalig über 72 h.



Abb. 4.12: Zellvitalitätsassay zur Beurteilung des Effekts der selektiven IKK-Inhibition auf die Viabilität der Zelllinien VM-Cub1 (A), T24 (B), RT112 (C), TERT-NHUC (D). Die Zellen wurden einmalig mit Bay11-7085 (dunkelgrau) bzw. Bay11-7082 (hellgrau) in den Konzentrationen 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M behandelt und anschließend für 72 h inkubiert. Die Messungen wurden jeweils in Vierfachwerten durchgeführt aus denen das arithmetische Mittel errechnet wurde. Als Kontrolle diente DMSO. Signifikante Unterschiede laut T-Test sind mit einem Sternchen markiert, \*\*: p<0,01., \*\*\*: p<0,001.

Wie aus der Abbildung 4.12 ersichtlich, führte die Blockierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in den malignen Zelllinien durchweg zu einer Abnahme der Zellzahl. Am sensitivsten reagierte die VM-Cub1 mit berechneten IC<sub>50</sub>-Werten von etwa 0,86  $\mu$ M (Bay11-7082) bzw. 0,95  $\mu$ M (Bay11-7085), gefolgt von der T24 mit IC<sub>50</sub>-Werten von 1,4  $\mu$ M (Bay11-7082) bzw. 1,98  $\mu$ M (Bay11-7085). Die benigne Zelllinie TERT-NHUC zeigte bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen (0,5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M) zunächst einen deutlichen Anstieg der Zellvitalität. Erst bei 2,5  $\mu$ M traten ausgeprägte zytotoxische Effekte auf.

# 4.5.2 Morphologische Veränderungen der Urothelkarzinomzelllinien unter der Therapie mit dem selektiven NF-κB-Inhibitor Bay11-7082

Parallel zur Zellvitalitätsanalyse wurden die Zellen, die 24 h, 48 h oder 72 h lang mit Bay11-7082 behandelt worden waren, auf morphologische Veränderungen hin lichtmikroskopisch ausgewertet.



**B** T24



Abb. 4.13: Morphologische Veränderungen der Zelllinien VM-Cub1 (A), T24 (B), RT112 (C) unter Bay11-7082 Einfachbehandlung. Die Zellen wurden einmalig mit 1  $\mu$ M bzw. 2,5  $\mu$ M des selektiven IKK-Inhibitors behandelt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. 100-fache Vergrößerung.

Die Zelllinie RT112 zeigte in der hohen Konzentration (2,5 µM) bereits nach 48 h, sowie in beiden Konzentrationen nach 72 h eine ausgeprägte Vakuolenbildung, welche die betroffenen Zellen auf ein Vielfaches ihrer Ausgangsgröße anwachsen ließ und als Zeichen der eingeleiteten Apoptose zu werten sind. In den Zelllinien T24 und VM-Cub1 vielen die morphologischen Veränderungen weniger deutlich aus. Über die Zeit hinweg schien die Zellzahl eher abzunehmen und die Anzahl von abgelösten Zellen mit Apoptosezeichen anzusteigen. Zelllinienunabhängig nahm unter steigender Konzentration und Dauer der Behandlung die Zellzahl ab; allerdings fielen die Effekte insgesamt gering aus.

# 4.5.3 Bestimmung der Apoptoserate durch Durchflusszytometrie nach IKK-Inhibition

Um die Wirkung von Bay11-7082 auf die Apoptose zu analysieren, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration von 2  $\mu$ M wurde anhand des zuvor ermittelten IC<sub>50</sub> festgelegt.



**Abb. 4.14: FACS-Analyse zur Bestimmung des Anteils von Apoptose und Nekrose in Urothelkarzinomzellen (VM-Cub1, T24, RT112) unter Bay11-7082-Behandlung.** Die Zellen wurden einmalig mit 2 μM Bay11-7082 behandelt und nach 48 h mit Propidiumiodid und Annexin-V angefärbt und ausgewertet. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. apoptotische Zellen: hellgrau, nekrotische Zellen: dunkelgrau, vitale Zellen: schwarz

Wie die Abbildung 4.14 zeigt, stieg der Anteil der apoptotischen Zellen in allen Zelllinien unter der Inhibition des kanonischen NF-κB-Signalwegs an, allerdings fielen die Effekte nur schwach aus. Der Anteil der nekrotischen Zellen nahm ausschließlich bei der T24 zu, wobei diese insgesamt auch am sensitivsten auf die Behandlung reagierte, mit 24% toten Zellen nach 48 h.

# 4.6 Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit einer Kombination aus SAHA und Bay11-7082

Um die Auswirkungen der Kombination von HDAC-Inhibition durch SAHA und der Inhibition des NF-κB-Signalwegs durch Bay11-7082 auf die Vitalität der Zellen quantitativ zu bestimmen, wurden *CellTiter-Glo®* Assays für jede der drei UCC durchgeführt.



### 4.6.1 Dosiswirkungskurve der Kombinationstherapie mit SAHA und Bay11-7082

Abb. 4.15: Bestimmung der Zellviabilität der Zelllinien VM-CUB1 (A), T24 (B), RT112 (C) nach Behandlung mit SAHA und Bay11-7082 mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Assay. Die Zellen wurden einmalig mit der Wirkstoffkombination behandelt und nach einer Inkubationszeit von 72 h ausgewertet. SAHA wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M eingesetzt, Bay11-7082 in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. (1) Darstellung der Ergebnisse in Form eines Kurvendiagramms. (2) Zur Verdeutlichung der Kombinationseffekte wurde zusätzlich jeweils ein Isobologramm erstellt.

Bei Betrachtung der Diagramme A und B lässt sich festhalten, dass die Hinzunahme von Bay11-7082 zu den mit SAHA behandelten Zellen zu keiner relevanten Reduktion der Zellzahlen im Sinne eines additiven Effektes oder gar eines Synergismus führte. Allein in der Zellinie RT112 (Diagramme C) könnte marginal ein synergistischer Effekt vorliegen.

# 4.7 Behandlung der Urothelkarzinomzelllinien mit dem Proteasominhibitor Bortezomib

Um die Wirkung eines weiteren Inhibitors des NF-κB-Signalwegs auf die Zellvitalität der Urothelkarzinomzellinien zu testen, wurde der Proteasominhibitor Bortezomib ausgewählt. Dieser greift in die Signalkaskade des klassischen NF-κB-Signalwegs ein, indem es das 26S-Proteasom inhibiert und so den Abbau des polyubiquitinierten IκBα blockiert und damit der Freisetzung der Transkriptionsfaktoren entgegenwirkt. Bortezomib wirkt dabei weniger spezifisch als die IKK-Inhibitoren, da es auch den Abbau vieler anderer, vor allem kurzlebiger Proteine blockiert.

### 4.7.1 Effekte der Bortezomib-Behandlung auf die Zellvitalität

Zunächst sollte der Effekt der reinen Bortezomib-Behandlung auf die malignen Zelllinien gemessen werden. Dies erfolgte mittels eines Zellviabillitiassays.





Abb. 4.16: Zellvitalitätsassay zur Beurteilung der Auswirkungen von Bortezomib auf die Viabilität der Zellinien VM-Cub1 (A), T24 (B) und RT112 (C). Die Zellen wurden einmalig mit Bortezomib in den Konzentrationen 5 nM, 10 nM und 20 nM behandelt. Die Auswertung erfolgte nach 72 h. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Signifikante Unterschiede laut T-Test sind mit einem Sternchen markiert, \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.

Wie aus der Abbildung 4.16 ersichtlich wird, führte die Behandlung mit Bortezomib zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellzahl. Am sensitivsten reagierte die RT112, gefolgt von der T24.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuchs mit der Zellvitalitätsmessung nach Einfachbehandlung mit Bay11-7082 bzw. Bay11-7085, so fällt auf, dass nicht wie erwartet die VM-Cub1, welche unter der Bay-Behandlung den niedrigsten IC<sub>50</sub> aufwies, auch hier am sensitivsten reagierte, sondern dass gerade bei dieser Zelllinie erst die höchste Bortezomib-Konzentration zu zytotoxischen Effekte führte. Am sensitivsten reagierte vielmehr die Zelllinie RT112, gefolgt von T24. Die geringste Bortezomib-Konzentration von 5 nM nahm über alle drei Zelllinien hinweg keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellvitalität.

#### 4.7.2 Dosiswirkungskurve der Kombinationstherapie mit SAHA und Bortezomib

Um die Auswirkungen der Kombination von HDAC-Inhibition durch SAHA und der Inhibition des NF-κB-Signalwegs durch Bortezomib, an Stelle von Bay11-7082, auf die Vitalität der Zellen quantitativ zu bestimmen, wurden *CellTiter-Glo®* Assays für jede der drei UCC durchgeführt.





Abb. 4.17: Bestimmung der Zellviabilität der Zelllinien VM-CUB1 (A), T24 (B), RT112 (C) nach Behandlung mit SAHA und Bortezomib mittels CellTiter-Glo<sup>®</sup> Assay. Die Zellen wurden einmalig mit der Wirkstoffkombination behandelt und nach einer Inkubationszeit von 72 h ausgewertet. SAHA wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M eingesetzt, Bortezomib in den Konzentrationen 5 nM, 10 nM und 20 nM. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. (1) Darstellung der Ergebnisse in Form eines Kurvendiagramms, (2) Isobologramm.

In Betrachtung der Diagramme fällt, entsprechend den Untersuchungen zur Kombinationstherapie von SAHA mit Bay11-7082, auf, dass auch die Kombination mit Bortezomib nicht den erhofften Effekt in Form einer synergistischen Verminderung der Zellzahl in allen drei UCC zeigte.
# 5 Diskussion

## 5.1 Wirkung von SAHA

Das Urothelkarzinom weist im Vergleich mit anderen Malignomen eine besonders hohe Rate an somatischen Mutationen auf<sup>148</sup>, von denen epigenetische Regulatorproteine besonders häufig betroffen sind<sup>22,149,150</sup>. Dies gilt auch für Histonacetyltransferasen (HATs), nur selten für ihre Gegenspieler, die HDACs, die vielmehr häufig dereguliert sind. Daraus ergibt sich eine Hemmung von HDACs als möglicher therapeutischer Ansatz. Diese Möglichkeit ist in einer Reihe von Arbeiten im Urologischen Forschungslabor der HHU untersucht worden (Übersicht in<sup>147</sup>). In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, in welchem Maße die Wirkung von HDAC-Inhibitoren durch eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs limitiert sein könnte.

Eine regelhafte Hyperacetylierung von RelA ist in mehreren Arbeiten, welche sich mit den molekularen Wirkmechanismen der HDAC-Hemmung beschäftigen, nachgewiesen worden. In Abhängigkeit der modifizierten Lysinreste kann die Genexpression positiv oder negativ beeinflusst werden, wobei sich die Acetylierung auf die Transkriptionskapazität, die Fähigkeit der Promoterbindung oder die Dauer des ausgelösten Transkriptionssignals auswirken kann<sup>60,151</sup>. Neben der Hyperacetylierung von RelA konnten weitere Auswirkungen einer HDACi auf den NF-KB-Signalweg nachgewiesen werden. So regulierte SAHA beispielsweise in NSCLC-Zelllinien (non small cell lung carcinoma) den TNFa-Rezeptor 1 massiv herunter, wodurch die Aktivität der nachgeschalteten Signalwege reduziert und die Genexpression supprimiert wurde<sup>152</sup>. In Malignen Myelom-Zellen führte SAHA dagegen zu einer IKK-abhängigen Phosphorylierung von RelA (Ser-536), was zum einen zu einer verstärkten Translokation in den Zellkern mit dortiger Akkumulation führte und zum anderen die Acetylierung von RelA hochregulierte. In beiden Fällen wurde die DNA-Bindung und die Genexpression verstärkt, bei gleichzeitig herabgesetzter Interaktion mit I $\kappa$ B $\alpha^{153}$ . Die Auswirkungen einer HDAC-Inhibition auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg können also unterschiedlich ausfallen und lassen sich nicht ohne weiteres generell vorhersagen.

Die Frage, inwieweit SAHA zu einer Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in den von uns getesteten Urothelkarzinomzelllinien führte, konnte erst nach Auswertung der quantitativen RT-PCR Ergebnisse eindeutig beantwortet werden. Während die Ergebnisse der Immuncytochemie und des WB noch eher für eine Induktion des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch SAHA sprachen, zeigte die Auswertung der quantitativen RT-PCR, dass die HDACi zwar spezifische Zielgene wie *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CXCL8* (IL8) und *BCL2L1* (BCL-XL) induzierte, allerdings im Gegensatz zu TNF $\alpha$ , *XIAP* (XIAP), *CCND1* (Cyclin D1) und *BIRC5* (Survivin) signifikant reprimierte. Darüber hinaus hatte die Blockade des Signalwegs auf

Höhe von IκBα (durch Bay11-7082) keinerlei Auswirkungen auf die von SAHA induzierten Effekte. Dazu passt, dass die Kombinationsbehandlung von SAHA mit Bay11-7082 oder Bortezomib keine mehr als additiven Effekte auf die Vitalität der Zellen ausübte.

Dass Bay11-7082 im Prinzip in der Lage ist von SAHA induzierte Effekte auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg effektiv zu blockieren, wurde in der Zelllinie U937 gezeigt. Dabei inhibierte Bay11-7082 zuverlässig die durch SAHA-induzierte Gesamtexpression und Phosphorylierung von IKK $\beta/\alpha$  genauso, wie die IKK-Aktivität. Darüber hinaus reduzierte es die SAHAvermittelte Hyperacetylierung des RelA deutlich<sup>154</sup>.

### Effekte der HDACi auf die Expression von p21<sup>CIP1</sup> und Survivin

Die von uns unter Pan-HDACi detektierten Induktionen von CDKN1A (p21<sup>CIP1</sup>) und CXCL8 (IL8) sind nicht spezifisch für das UC, sondern ein häufig nachgewiesenes Phänomen in malignen Zellen, unabhängig von ihrer Entität. Durch detaillierte Untersuchungen zu selektiven Veränderungen der Genexpression unter HDACi ist belegt, dass SAHA über eine Kombination aus Histonmodifikationen und Veränderungen in dem mit dem Promoter assoziierten Proteinkomplex, bestehend aus HDAC1, HDAC2, p300, Sp1, Myc, GCN5, BAF155 und Brg-1, die Geninduktion von CDKN1A (p21<sup>CIP1</sup>) positiv beeinflusst. In ARP-1 Zellen induzierten Pan-HDACi eine Acetylierung und Methylierung der H3 und H4 Histone im Promoter von CDKN1A, verminderten HDAC1 und Myc innerhalb des Proteinkomplexes und verstärkten auf diese Weise die Rekrutierung der RNA-Polymerase II<sup>31,43</sup>. Interessanterweise stieg in der Urothelkarzinomzelllinie 5637 unter dem HDACi TSA der Proteingehalt von p21<sup>CIP1</sup> transkriptionsunabhängig (also bei konstantem mRNA-Niveau) an. Als ursächlich wurden Änderung in der Translation oder dem Proteinabbau unter HDACi vermutet. Weiterführende Untersuchungen fehlen allerdings<sup>155</sup>. Glaser et al. wiesen in einer Clusteranalyse zu den Genexpressionsmustern unter HDACi eine durch SAHA induzierte Hochregulation von 282 Genen gegenüber einer Reprimierung von 341 Genen in der UCC T24 nach<sup>156</sup>. Die 24-stündige Inkubation mit 5 μM SAHA führte zu einer deutlichen Hyperacetylierung von Histon H4 und einer Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> auf mRNA- und Proteinebene. Durch die Testung mit dem inaktiven strukturellen SAHA-Analogon, 812, konnte bestätigt werden, dass die veränderte Genexpression spezifisch auf der Enzyminhibition durch SAHA basierte. SAHA induzierte in der UCC T24 die Expression von p21<sup>CIP1</sup> dosisabhängig mit einer positiven Korrelation zwischen seiner Dosis und der detektierten Proteinmenge<sup>156</sup>. Richon et al. hatten bereits zuvor eine Hyperacetylierung der H3 und H4 Histone in der gesamten Promoterregion des CDKN1A Gens unter SAHA mit bis zu 9-facher Zunahme des mRNA- und Proteinsniveaus von p21<sup>CIP1</sup> in der gleichen Zelllinie nachgewiesen<sup>44</sup>.

In seiner Funktion als Schlüsselregulator des Zellzyklus<sup>108,110</sup> ist p21<sup>CIP1</sup> in der Lage, den Übertritt von der G1- in die S-Phase bzw. von der G2-Phase zur Mitose zu verhindern<sup>108,109</sup>. Seine Überexpression führt zur Arretierung des Zellzyklus, wobei Studien mit p21-/- Zellen nachwiesen, dass es nicht allein für den Zellzyklusarrest verantwortlich ist<sup>157,158</sup>. Qu et al. postulierten, dass in der T24 unter HDACi die Kombination aus Überexpression des p21<sup>CIP1</sup> mit herunter reguliertem Cyclin A den G1-Zellzyklusarrest bedingte<sup>158</sup>. Die Überexpression von Cyclin D1, einem essentiellen Regulator für den Durchgang durch die G1-Phase<sup>106,159</sup>, ist mit der Entwicklung und Progression vieler Malignome assoziiert<sup>92,94,96</sup> und entsprechend häufig im malignen Tumoren dysreguliert<sup>92,94,96,106</sup>. Seine mRNA wurde durch SAHA in unseren Versuchen zelllinienübergreifend reprimiert. Interessanterweise wiesen Wang et al. in der malignen Urothelzelllinien 5637 eine durch das 26S-Proteasom vermittelte Verminderung von Cyclin D1 unter HDACi nach<sup>155</sup>. Dies könnte mit Beobachtungen zusammenhängen, wonach SAHA u.a. zu einer Aktivierung von ΙΚΚα führt<sup>154</sup>, welche über eine direkte Phosphorylierung des Thr-286 die Degradation des Cyclin D1 bedingt<sup>61</sup>. Über welche intrazellulären Regulationssysteme SAHA die Expression dieses Cyclins auf mRNA-Ebene beeinflusst, ist m. W. bisher nicht im Einzelnen bekannt. Eine vollständige Inhibition der Genexpression verhindert in der Regel den Übertritt der Zelle in die S-Phase<sup>159</sup>. Eine Genrepression, wie in unseren Zellen detektiert, sollte daher mit einem G1-Arrest einhergehen, zumal sich die Überexpression des p21<sup>CIP1</sup> ebenfalls negativ auf die Zellzyklusprogression auswirkt. Die von Niegisch et al. 2013 veröffentlichten Ergebnisse, wonach SAHA in UCC zu keinem relevanten Anstieg der Zellfraktion in der G1-Phase führte<sup>147</sup>, lassen sich damit nicht erklären. Vielmehr induzierte die HDAC-Inhibition in verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien einen Anstieg der Zellpopulation in der G2/M-Phase<sup>147,160,161</sup>.

Auch aufgrund des Anstiegs der Zellpopulation in der G2/M-Phase schauten wir uns die Wirkung von SAHA auf die Expression von Survivin an. Zu den Hauptfunktionen von Survivin, dem kleinsten Vertreter der IAP-Familie gehört, neben der Apoptoseinhibition durch Caspaseninaktivierung, die Regulation der mitotischen Zellteilung in der G2/M-Phase<sup>160,162,163</sup>. Während es in ausdifferenzierten Geweben normalerweise nicht nachweisbar ist, sind all seine Isoformen in nahezu jedem malignen Tumor konsistent überexprimiert. Im UC, wie in vielen anderen Tumoren, kann Survivin als molekularer, krebsspezifischer Biomarker genutzt werden<sup>143,144,160,164</sup>. Seine siRNA-vermittelte Herunterregulation führte in verschiedenen UCC neben einem G2/M-Arrest zu einer Reduktion der Zellzahl und einer Induktion der Apoptose<sup>161</sup>. Während durch den *knockdown* für UCC, wie 5637 und J82, eine Reduktion der Survivin-mRNA und des -Proteins um mindestens 50% bis 99% erreicht werden konnte, zeigte die

Herunterregulation in der UCC RT112 interessanterweise keinen wirksamen Effekt<sup>165</sup>. Takizawa et al. untersuchten den Einfluss des Survivin siRNA-vermittelten *knockdowns* auf T24-Zellen und fanden neben einem G2/M-Arrest, vermindertem Zellwachstum und einer verstärkten Cytochrom c Freisetzung in einer Microarray-Analyse heraus, dass 14 von 144 apoptotischen Genen durch die effektive Herunterregulation des Survivins in ihrer Expression moduliert wurden. Hierzu gehörten unter anderem die TNF-Rezeptoren TNFR1, DR3 und LTBR, fünf BCL2-verwandte Gene, die Proteinkinasen AKT sowie die Initiatorcaspasen CASP-2 und CASP-8<sup>161</sup>. Hervorzuheben ist, dass der siRNA *knockdown* von Survivin in den ersten 48 h die Expression zu Gunsten einer pro-apoptotischen Wirkung veränderte, während danach die anti-apoptotischen Proteine dominierten<sup>161</sup>.

Mittels qRT-PCR wiesen wir zelllinienübergreifend eine Repression von Survivin durch SAHA nach. Hervorzuheben ist, dass die Expression dieses Proteins in keiner unserer UCC durch TNF $\alpha$  zu induzieren war. Unseren Ergebnissen stehen die Ergebnisse von Cui et al. gegenüber, wonach TNF $\alpha$  Survivin in der T24-Zelllinie induzierte und zudem eine effektive Repression durch Bay11-7082 erreicht werden konnte<sup>160</sup> – diese Frage wird im Abschnitt 5.2 weitergehend besprochen.

Die Genrepression von Survivin passt in jedem Fall gut zu dem unter HDAC-Inhibition in den UCC beschriebenen G2/M-Arrest und könnte selbst dazu beitragen.

#### Effekte der HDACi auf die Expression von IL8, BCL-XL und XIAP

Die niedrigen Apoptoseraten der UCC unter SAHA legten den Verdacht nahe, dass die Inhibition der HDACs zu einer NF-κB-vermittelten Induktion weiterer anti-apototischer Proteine, wie BCL-XL und XIAP, sowie dem in Tumoren pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirkenden Interleukin 8 führen könnte. Wir ergänzten daher unsere Versuchsreihe um diese NF-κB-Zielgene.

Interleukin 8 ist im Blasenkarzinom als urinbasierter prognostischer Marker für das Auftreten bzw. rezidivierende Urothelkarzinom verstärkt untersucht worden, beispielsweise durch Gogalic et al.<sup>166</sup>. Welche funktionelle Rolle es bei der Entstehung des Urothelkarzinoms spielt, ist demgegenüber bisher nicht geklärt. Seine Genexpression wird von NF-kB, einem der potentesten Regulatoren der Expression von Zytokingenen insgesamt, kontrolliert<sup>167</sup> und gehört wie p21<sup>CIP1</sup> zu den häufig unter HDAC-Inhibition Genen<sup>168,169</sup>. In HeLa-Zellen überexprimierten konnte beispielsweise eine Hyperacetylierung des IL8-Promoters als Ursache der von TSA ausgelösten Hochregulation der IL8-Expression nachgewiesen werden<sup>169</sup>. Zelllinienübergreifend und zu allen Messzeitpunkten induzierte SAHA in unserer Versuchsreihe eine signifikante Überexpression von IL8, ähnlich wie TNFα. Interessanterweise übte die Inhibition des

NF-κB-Signalwegs mittels Bay11-7082 keinen reprimierenden Einfluss auf die SAHAinduzierte Genexpression aus. Hier wäre es wichtig gewesen den Einfluss von Bay11-7082 auf die Wirkung von TNFα nachvollziehen zu können, um unsere Ergebnisse klar einordnen zu können. Auf diese weitere Kontrolle wurde in dieser Dissertation jedoch verzichtet, um den Versuchsaufbau praktisch und finanziell handhabbar zu halten.

Selektive Untersuchungen zu HDACi-vermittelten Modifikationen der Genexpression von NF-κB-Zielgenen, wie oben für p21<sup>CIP1</sup> beschrieben, sind im Urothelkarzinom kaum erfolgt. Überexpression oder Repression wurden beschrieben, die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht im Detail geklärt, so auch für die Induktion von BCL-XL, welches in malignen Urothelzellen bereits regelhaft überexprimiert ist<sup>170,171</sup>. Lebedeva et al. gelang es nachzuweisen, dass die stabile Überexpression von BCL-XL in der Zelllinie T24 zu einer Desensibilisierung der malignen Zellen gegenüber cytotoxischen Substanzen führte<sup>172</sup>. Damit übereinstimmend belegten mehrere Studien, dass die erhöhte BCL-XL-Expression mitverantwortlich für die Chemoresistenz, beispielsweise gegenüber Cisplatin<sup>170</sup>, ist. Eine Herunterregulation von mRNA und Protein dieses anti-apoptotischen Mitglieds der BCL2-Familie durch spezifische Antisense-Oligonukleotide oder *small interfering* RNAs (siRNA) erhöhte die Empfindlichkeit von malignen Urothelzellen (T24, 5637) gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika<sup>170</sup>. El-Zawahry et al. beschrieben eine Herunterregulation von BCL-XL durch TSA speziell für die UCC T24<sup>173</sup>, wohingegen SAHA eine effektive Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins im Malignen Melanom bewirkte<sup>174</sup>.

Korrelierend zu den Ergebnissen publizierter Studien, welche sich mit der Auswirkung der HDACi auf die Genexpression von BCL-XL beschäftigten, fanden wir eine zelllinienübergreifende Überexpression von BCL-XL unter SAHA. Vrana et al. zeigten in U937 Zellen, dass überexprimiertes BCL-XL einen effektiven Gegenspieler der SAHA-vermittelten Apoptose darstellt, mit vollständiger Blockierung der HDACi-vermittelten Apoptoseinduktion<sup>175</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass die geringen Apoptoseraten der UCC unter SAHA, zumindest anteilsweise, durch die Induktion der Expression von BCL-XL bedingt sind.

Die Testung eines weiteren anti-apoptotischen Proteins, XIAP, welches als potentester Vertreter der IAP-Familie in der Lage ist die Initiatorkaspase 9 sowie die beiden Effektorkaspasen Casp-3 und Casp-7 zu inhibieren<sup>141,176–180</sup>, wurde in unserer Versuchsreihe zelllinienübergreifend und zu allen Messzeitpunkten auf mRNA-Ebene durch SAHA signifikant reprimiert. Welche Auswirkungen die HDACi auf die Expression dieses Gens im Urothelkarzinom nehmen, ist meines Wissens bisher noch nicht untersucht worden. Ausführliche Erkenntnisse liegen dagegen zur HDAC-Inhibition in malignen hämatologischen Erkrankungen vor. So reprimiert SAHA beispielsweise in CLL-Zellen die XIAP-Expression auf mRNA-Ebene signifikant<sup>181</sup>. In den Brustkrebszelllinien MCF7 und MDA-MB-231 verminderte SAHA das Expressionsniveau von XIAP und destabilisierte über eine veränderte Expression und Aktivität des 26S-Proteasoms und des Chaperons HSP90 das vorhandene Protein<sup>182</sup>. Unsere Ergebnisse zur XIAP-Expression unter SAHA im UC passen zu diesen und weiteren Beobachtungen. Dass niedrige XIAP-Expressionsniveaus mit einer erhöhten Sensitivität zur Apoptosinduktion einhergehen, wiesen Yang et al. in Nierenzellkarzinomzelllinien<sup>141</sup> und Bilim et al. in der UCC T24 nach<sup>183</sup>. Die Herunterregulation des basal überexprimierten XIAPs in der T24 durch Antisense Phosphorothioate-Oligodeoxynucleotide sensitivierte die Zellen gegenüber Doxorubicin<sup>183</sup>. Niedrige XIAP-Expressionspiegel wirken proapoptotisch.

Zusammenfassend kann für die Wirkung des Pan-HDACi SAHA auf die Zielgene des NF-κB-Signalwegs festgehalten werden, dass SAHA zu keiner generellen Aktivierung des NF-κB-Signalwegs in den UCC führte. Interessanterweise induziert dieser Pan-HDACi gleichermaßen tumorhemmende wie tumorfördernde Gene. Während die Repression von *CCND1, CDKN1A* und *BIRC5* den Zellzyklus hemmt und die Suppression von *XIAP* für die Apoptoseinduktion sensitivieren, sollte die Induktion von *CDKN1A, CXCL8* und *BCL2L1* antiapoptotisch wirken. Wenn die selektive Inhibition einzelner HDACs zu weniger gegenläufigen Effekten führen sollte, könnte sie eine vielversprechende Alternative zur Pan-HDAC-Inhibition im UCC darstellen.

#### *Effekte der NF-κB-Inhibition auf die UCC allein und in Kombination mit SAHA*

Bemerkenswerterweise wirkte Bay11-7082 als Einzelsubstanz in gleicher Weise wie TNFα – nur in schwächerer Ausprägung – auf die Expression mehrerer Zielgene ein. Zelllinienunabhängig induzierte es beispielsweise die Expression von *CXCL8*. Für die Einordnung dieser Effekte wäre es wichtig gewesen, die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung aus Bay11-7082 mit TNFα untersucht zu haben. Aus den bereits erörterten Gründen musste in dieser Doktorarbeit auf die Erweiterung des Versuchsaufbaus verzichtet werden. Warum die Inhibition des NF-κB-Signalwegs zu einer Induktion von *CXCL8* führte, bleibt unklar. Zu untersuchen wären hierzu die Aktivitätszustände der Komponenten entlang der Signaltransduktionskette im kanonischen und idealerweise auch im nicht-kanonischen NF-κB-Signalweg.

Bortezomib, ein weiterer Inhibitior des NF-κB-Signalwegs, welcher über das 26S-Proteasom die Proteolyse des IκBα hemmt, erhöht in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren die Neigung der Tumorzellen zur Apoptoseinduktion<sup>85,88</sup>. In Tumorzellen, welche resistent gegenüber Chemo-, Radio- oder endokrinen Therapien waren, hob die NF-κB-Inhibition

über das 26S-Proteasom die Resistenz insoweit auf, dass in Kombination mit einer Chemotherapie oder Radiotherapie wieder erhöhte Apoptoseraten erreicht werden konnten<sup>89,184,185</sup>. Solche Ergebnisse ließen sich in der Kombination mit SAHA in den von uns untersuchten UCC nicht erzielen. Wie bereits bei der NF-κB-Inhibition mit Bay11-7082 beobachtet, zeigte sich auch in der Kombination aus SAHA mit Bortezomib weder ein additiver Effekt noch ein deutlicherer Synergismus. Dies bestätigte indirekt die unter Bay11-7082 Behandlung detektierten Ergebnisse.

#### Effekte der HDACi auf Proteinebene

Eher als die Ergebnisse der mRNA-Messungen wiesen – wie bereits zum Anfang dieser Diskussion erwähnt – die Ergebnisse aus der Immuncytochemie und der Western Blot-Analyse auf eine Induktion des NF-κB-Signalwegs durch SAHA hin; sie sollen an dieser Stelle nochmals einzeln diskutiert werden.

In der immuncytochemischen Färbung von RelA konnte in T24-Zellen und einer urothelialen Primärkultur gleichermaßen eine nukleäre Translokation unter SAHA nachgewiesen werden; allein die Zeitpunkte der nukleären Translokation wichen voneinander ab. Interessanterweise ließ sich unter der Stimulation mit SAHA die Zunahme des nukleären Signals nicht einheitlich in allen Zellen detektieren. Passend hierzu wiesen Sung et al. 186 nach, dass transiente Stimuli keine synchrone Reizantwort in Zellen einer Zellpopulation auslösen. In Einzelzellversuchen zur Langzeitdynamik des RelAs nach TNFQ-Stimulation beobachteten sie, dass RelA in manchen Zellen für 1-2 Zyklen in den Kern translozierte, in anderen Zellen mit Oszillationen von 6-7 Zyklen reagierten und einige wenige Zellen sogar nur eine monophasische Translokation des Proteins in den Zellkern aufwiesen<sup>186</sup>. Dass TNFa in unseren Versuchen zu einem scheinbar einheitlichen Effekt in allen abgebildeten Zellen führte, mag zum einen in einer, im Vergleich mit SAHA, stärkeren Induktion des Signalwegs liegen, zum anderen sei angemerkt, dass die von uns verwendete Mikroskopanalytik nicht die ausreichende Auflösung hatte, um solch feine Unterschiede, wie oben beschrieben, abzubilden. Es ist denkbar, dass die im Rahmen der Oszillationen auftretenden späteren und in ihrer Amplitude gedämpften Peaks<sup>186</sup>, eine Translokation von RelA induzierten, welche von uns nicht detektiert werden konnte.

Da der häufigste Transkriptionsfaktor des klassischen NF-κB-Signalwegs sich aus den NF-κB-Untereinheiten RelA und p50 zusammensetzt, untersuchten wir auch die Auswirkungen von SAHA und TNFα auf die intrazelluläre Lokalisation des p50.

Während in der malignen Zelllinie T24 unter basalen Bedingungen keine erhöhte Aktivität des NF-κB-Signalwegs zu detektieren war und TNFα die Translokation des p50 in den

Zellkern mit ausgeglichenen Verhältnis zwischen Kern und Plasma bedingte, wies die urotheliale Primärkultur bereits basal nukleäres p50 auf mit ausgeglichenem Verhältnis zum Zytoplasma. Bemerkenswerterweise nahm die Behandlung mit TNFα keinen erkennbaren Einfluss auf die Verteilung des p50. Eine mögliche Erklärung könnte in einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen zytoplasmatisch-nukleärer Translokation von p50 und seinem nukleären Export bzw. Abbau zu finden sein. Da TNFα nicht nur zur IKK-vermittelten Phosphorylierung des IκBα mit Freisetzung der p50/RelA-Transkriptionsfaktoren führt, sondern darüber hinaus auch die Phosphorylierung des NF-κB1 (p105)-Vorläuferproteins induziert<sup>187</sup>, welches p50/p50 Homodimere inaktiv im Zytoplasma zurück hält<sup>187–189</sup>, wäre auch ein Anstieg der p50-Konzentration im Nukleus erwartbar gewesen.

SAHA induzierte in beiden Zellarten, T24 wie auch UP226, die Translokation des p50 in den Zellkern. Die Zugabe von Bay11-7082 vor TNFα verhinderte zuverlässig den Übertritt von p50 in den Nukleus. Die Kombination aus SAHA mit Bay11-7082 wurde leider nicht getestet. Unter der Annahme, dass die Kombinationstherapie von SAHA mit Bay11-7082 die p50 Translokation in den Nukleus, entsprechend der Ergebnisse aus der quantitativen RT-PCR, nicht verhindert hätte, wären wir mit diesem Versuch gegebenenfalls in der Lage gewesen eine durch HDAC-Inhibition induzierte, vom NF-κB-Signalweg unabhängige Aktivierung des p50 nachzuweisen.

Korrelierend zu den Ergebnissen der Immuncytochemie, konnte auch auf Proteinebene zelllinienübergreifend eine durch SAHA ausgelöste Abnahme der IκBα-Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte die VM-Cub1 eine Zunahme von IκBα 30 Minuten nach SAHA Zugabe, welche nach den Ergebnissen anderer Arbeiten weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene durch TNFα so kurz nach Stimulationsbeginn zu detektieren war<sup>190,191</sup>. Da die Histone in den κB-Stellen innerhalb des Promoter des IκBα-Gens bereits basal stark acetyliert und somit frei zugänglich für NF-κB sind<sup>63,192</sup>, stellt die Chromatin-Remodellierung nicht den geschwindigkeits-limitierenden Schritt in der Geninduktion des IκBαs dar. Die Ursache könnte daher eher in der, für maligne Zellen unter HDAC-Inhibition vorbeschriebenen Hyperacetylierung des ReIA und einer damit verbundenen positiven Beeinflussung der Bindungsaffinität oder Transkriptionsaktivierung zu finden sein.

### 5.2 Aktivität des NF-ĸB-Signalwegs im Urothelkarzinom

Die NF-κB-Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Tumoren, ihrer Progression und der Ausbildung von Resistenzen. In Tumoren unterschiedlicher Entität wurde eine konstitutive NF-κB-Aktivität beobachtet, die zum Wachstum, Überleben und Interaktion der Tumorzellen mit dem Stroma beitragen kann<sup>193–195</sup>.

Da über den NF-κB-Signalweg im Urothelkarzinom bisher nur wenig bekannt ist, musste zu Beginn dieser Arbeit zunächst die Frage geklärt werden, in wieweit der Signalweg basal aktiv ist und ob seine Aktivierung über TNFα überhaupt zu den erwarteten Effekten mit Induktion seiner typischen Zielgene führte.

#### Aktivität des NF-κB-Signalwegs in UCC basal und nach Induktion mit TNFα

Für die Bestimmung der NF-KB-Aktivität in den UCC wurde mittels immunzytochemischer Färbung die Lokalisation des wichtigsten Transkriptionsfaktors dieses Signalwegs, RelA, unter basalen Bedingungen ausgewertet. In allen Zelllinien, unabhängig von ihrer Dignität, dem Wachstumsverhalten (oberflächlich, invasiv) und ihrer Morphologie (epithelial bzw. mesennchymal) lag RelA zytoplasmatisch vor. In den wenigen bisherig publizierten Arbeiten zum Thema ist beschrieben, dass die basale Aktivität des NF-kB-Signalwegs zwischen UCC teils deutlich variiert. Während demnach in den meisten malignen urothelialen Zelllinien und Geweben RelA zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert ist, weist ein nicht unwesentlicher Anteil RelA rein nukleär oder rein zytoplasmatisch exprimiert auf<sup>196,197</sup>. Levidou et al. publizierten beispielsweise für 18% der untersuchten UCC und Gewebe eine rein zytoplasmatische und für 15% eine rein nukleäre ReIA Lokalisation. Die Menge des nukleär detektierten RelA korrelierte dabei positiv mit steigendem Malignitätsgrad und Tumorgröße und negativ mit dem Gesamtüberleben<sup>196</sup>. Vor diesem Hintergrund wäre zumindest bei invasiv wachsenden und schlecht differenzierten UCC wie J82 ein nukleäres Signal zu erwarten gewesen. Der fehlende Nachweis könnte der verwendeten Mikroskoptechnik geschuldet sein, da sie nicht die ausreichende Auflösung hatte, um eine schwache nukleäre Lokalisation abzubilden. Da sich die Aktivität des Signalwegs aus dem Anteil des nukleären RelA ergibt, kann für die von uns getesteten Zelllinien eine geringe basale Aktivität des NF-κB-Signalwegs postuliert werden.

TNFα induzierte in allen Zelllinien erwartungsgemäß die Translokation von RelA in den Zellkern. Allerdings unterschied sich der Anteil des nukleär lokalisierten RelA zwischen der normalen Primärkultur mit starkem, hauptsächlich nukleären RelA von der UCC T24 mit ausgeglichenem Verteilungsmuster zwischen Zellkern und Zytoplasma. Eine mögliche

Erklärung für die Ergebnisse in der malignen UCC könnte in der von Inoue et al. für das Urothelkarzinom beschriebenen Überexpression von phosphoryliertem RelA (Ser-536) liegen<sup>197</sup>. TNFα gilt als Induktor dieser posttranslationalen Modifikation, welche über die IKK-vermittelte Phosphorylierung des innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD) liegenden Serinrestes 536 zu einer verstärkten CBP/p300 Bindung mit Acetylierung des K310 führt, in Folge dessen die Genexpression der NF-κB-Zielgene gesteigert wird<sup>198,199</sup>. Ein weiterer passender Effekt dieser RelA-Modifikation liegt in der reduzierten Bindungsaffinität gegenüber neusynthetisiertem IKBa. Normalerweise limitiert IKBa die Dauer des Transkriptionssignals, indem es die Transkriptionsfaktoren von der DNA löst nachdem die NF-kB-Bindung an den Promoter zuvor durch eine von p300- oder PCAFvermittelte Acetylierung des Lysins 122 und 123 destabilisiert wurde<sup>74</sup> und vermittelt den nukleären Export. Durch die Phosphorylierung des RelA entzieht sich dieses der Kontrolle durch IKBa, wodurch zum einen die Limitierung der Genexpression wegfällt und zum anderen eine Verstärkung der Genexpression resultiert, aufgrund der Akkumulation der Transkriptionsfaktoren im Zellkern bei gleichzeitig erhöhter zytoplasmatisch-nukleärer Translokation bei fehlender zytosolischen IκBα-Inhibition<sup>72,198,200,201</sup>. Das würde den von Sasaki et al. beschriebenen fehlenden Einfluss von IKBa auf die p-RelA-induzierte IL8-Genexpression in HeLa-Zellen erklären<sup>200</sup>. Im Urothelkarzinom könnte eine IL8-Überexpression als Folge einer RelA-Phosphorylierung zu der positiven Korrelation zwischen p-RelA-Expressionsstärke, Tumorprogression und Entdifferenzierung beitragen<sup>197</sup>.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass TNFα in den UCC zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalwegs mit unterschiedlich hohem Anteil des "nativen" RelA im Zellkern führt.

#### Effekte der TNFα-Stimulation auf die Expression von ΙκΒα und RelA

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Immuncytochemie konnte auch auf Proteinebene in allen UCC eine TNFα vermittelte Induktion des klassischen NF-κB-Signalwegs erzielt werden. Dies zeigte sich in einem wellenförmigen Expressionsmuster des IκBα, wie es bekanntermaßen unter andauernder TNFα-Stimulation auftritt und auf dem Kreislauf aus IKK-vermittelter Degradation und NF-κB-induzierter Resynthese beruht<sup>74,186,190,191</sup>. In Mausembryofibroblasten (MEF) wiesen Kearns et al. einen relevanten Anstieg des IκBα-mRNA-Spiegels bereits 30 Minuten nach Beginn der kontinuierlichen TNFα-Stimulation nach, deren Spitzenwert nach circa einer Stunde erreicht war und danach langsam über Stunden absank<sup>190</sup>. Hoffmann et al. hatten zuvor in den gleichen Zellen den Nachweis erbringen können, dass der Proteinspiegel von IκBα nach initialem rapidem Abfall ca. 60 Minuten nach Beginn der TNFα-Stimulation wieder anstieg<sup>191</sup>, womit beide Studien zu übereinstimmenden Ergebnissen kamen. Es kann also festgehalten werden, dass wir mit der Bestimmung des IκBα-Proteinspiegels nicht nur die TNFα-vermittelte Induktion des NF-κB-Signalwegs mit erfolgreicher Zielgen Expression in den UCC belegen konnten, darüber hinaus deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass der zeitliche Ablauf von der Aktivierung des Signalwegs bis zur abgeschlossenen Neusynthese des IκBα ähnlich wie in den MEFs erfolgt.

In der Westen Blot-Analyse veränderte TNFα in zwei UCC die Proteinmenge von RelA nicht. Dies schließt eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren nicht aus, da hier die Gesamtexpression des Proteins bestimmt wurde ohne Berücksichtigung der zellulären Lokalisation. Zudem wären auch hier posttranslationale Modifikationen denkbar, wie sie bei malignen Zellen häufig nach Aktivierung des NF-KB-Signalwegs in Form von Acetylierungen oder Phosphorylierungen beobachtet werden<sup>60,61</sup>. In der Zelllinie T24, welche von den UCC bisher die stärksten durch TNFa induzierten Effekte aufwies, konnte eine inverse Korrelation zwischen der Höhe der RelA- und ΙκΒα-Expression detektiert werden. Die Zunahme des RelA-Expressionsniveaus vermag dabei durch Phosphatasen vermittelt zu werden. Phosphorylierungen modulieren in entscheidender Weise die Transkriptions-antwort, indem sie die Wechselwirkungen zwischen RelA und Transkriptions-Cofaktoren beeinflussen<sup>63</sup>. Beispielsweise wirkt die von TNF $\alpha$  induzierte und MSK1-vermittelte Phosphorylierung des Serin 276 transkriptionsverstärkend<sup>202</sup>. Die Übertragung einer Phosphatgruppe auf den Serinrest 276 (PKA<sub>c</sub><sup>203</sup> oder MSK1<sup>202</sup> vermittelt) oder den Serinrest 311 (PKCζ vermittelt<sup>204</sup>) führt zu einer verbesserten Interaktion des RelA mit CBP und p300<sup>205</sup>, in Folge dessen transkriptionsreprimierende HDAC-Komplexe, besonders p50/HDAC1, effektiver von den κB-sites der Zielgene verdrängt werden können<sup>63,206</sup>. Darüber hinaus hemmt phosphoryliertes RelA die Interaktion mit IκBα (s.o)<sup>200</sup>. Huang et al. machten auf die Dephosphorylierung des RelA als einen wichtigen limitierenden Schritt der NF-KB-Aktivierung in Hinblick auf eine erneute Aktivierung des Signalwegs aufmerksam<sup>60</sup>. Neben der PP2A (Protein Phosphatase 2A) konnte in mehreren Studien auch für die WIP1-Phosphatase eine transkriptionshemmende Wirkung gegenüber RelA nachgewiesen werden. Während die PP2A-vermittelte Dephosphorylierung des RelA die Genexpression direkt supprimiert<sup>207</sup>, vermindert WIP1 über die Entfernung der Phosphatgruppe des Serin 536 die Interaktion von RelA mit p300 und in Folge dessen die Transkription der NF-κB-Zielgene<sup>60,208</sup>. Beide Phosphatasen erhöhen den Anteil des "nativen" RelA.

Eine weitere denkbare Erklärung für den Anstieg von RelA nach Aktivierung des Signalwegs könnte in der durch HDAC3 vermittelten Limitierung der NF-κB-Antwort in Vorbereitung auf eine erneute Stimulation des Signalwegs liegen. Dabei katalysiert HDAC3, in vitro wie auch in vivo, die Entfernung der Acetylgruppe an den Lysinen 218 und 221 in Folge dessen die Bindungsaffinität zum IκBα deutlich erhöht wird und ReIA schnell, durch CRM1 vermittelt, zurück ins Zytoplasma exportiert wird um den "Pool" an NF-κB/IκBα-Komplexen für eine erneute Aktivierung aufzufüllen<sup>63,75,76,209</sup>. Studien zu Expression des HDAC3 im Urothelkarzinom bilden ein inhomogenes Expressionsmuster ab. Während manche Arbeiten über eine regelhafte Überexpression berichten<sup>210,211</sup>, beschreiben andere eine variable Expression in malignen Urothelgeweben<sup>148,149</sup>. Pinkerneil et al. fielen daüberhinaus erhöhte Expressionniveaus von HDAC3 in den benigen Kontrollproben auf<sup>149</sup>.

#### Effekte der Aktivierung des NF-кB-Signalwegs auf die Genexpression

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurden die Effekte der Signalweginduktion auf die Expression der Gene *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), *CCND1* (Cyclin D1), *BCL2L1* (BCL-XL), *CXCL8* (IL8), *XIAP* (XIAP) und *BIRC5* (Survivin) bestimmt. TNFα induzierte in beiden Zelllinien (T24 und VM-Cub1) die Genexpression von *CXCL8* (IL8) und *CDKN1A* (p21<sup>CIP1</sup>), nahm keinen Einfluss auf die Genexpression von *BIRC5* (Survivin) und führte bei *CCND1* (Cyclin D1) und *XIAP* (XIAP) in Abhängigkeit von der Expositionsdauer zu einer Repression oder Induktion der Genexpression. Die Expression von BCL-XL unterschied sich zwischen den Zelllinien, mit einem Anstieg in der VM-Cub1 und fehlendem Effekt in der T24.

Diese Ergebnisse sind insofern nicht einfach einzuordnen, als dass es nur eine sehr überschaubare Anzahl publizierter Studien zum NF-κB-Signalweg im UCC gibt und bisher wenig über die Kinetik der Induktion der NF-κB-Zielgene im Einzelnen bekannt ist. Tian et al. publizierten als erste Arbeitsgruppe eine systematische Analyse zur Kinetik von 74 NF-κB-Zielgenen<sup>212</sup>. Demnach führt NF-κB zu einer stufenartigen Induktion verschiedener Zielgen-Gruppen, nämlich frühe (1 h), mittlere (3 h) und späte (6 h), deren Expression in separaten Wellen erfolgte und interessanterweise gruppenabhängig bestimmte zelluläre Prozesse steuert. Zytokine und negative Regulatoren des IKK-NF-κB-Signalwegs werden beispielsweise von Genen aus der frühen Gruppe kodiert, während Zelloberflächenrezeptoren, Adaptorproteine und Adhäsionsmoleküle von späten Genen verschlüsselt werden<sup>212</sup>.

Es sei daher vorweg bemerkt, dass die von uns gewählten Messzeitpunkte anhand von Ergebnissen SAHA-induzierter Effekte auf die malignen Urothelzelllinien ausgewählt wurden. Die Aktivitätsmuster von NF- $\kappa$ B und die Kinetik der Zielgene nach TNF $\alpha$ -Stimulation wurden nicht separat untersucht. Mit unseren Messzeiten nach 2 h, 5 h und 24 h würden, wenn die Ergebnisse von Tian et al.<sup>212</sup> auf Urothelzellen übertragbar sind, Effekte der sehr transienten (frühen) Signalwegstimulation nur im Abklingen erfasst.

Bei der Diskussion unserer qRT-PCR Ergebnisse ist zu bedenken, dass es zwei unterschiedliche Aktivitätsverläufe der Aktivierung von NF-KB gibt. Neben einem monophasischen Aktivitätsmuster, welches durch einen transienten, ≤ 60 Minuten andauernden TNF<sub>α</sub>-Impuls ausgelöst wird, induziert ein kontinuierlicher TNF<sub>α</sub>-Stimulus die Ausbildung einer oszillierenden NF-kB-Aktivität<sup>191,212</sup>. Diese Oszillationen entstehen, wenn unter anhaltender TNFα-Stimulation IkBα durch eine dauerhafte IKK-Aktivität kontinuierlich abgebaut wird und damit ein Kreislauf aus zytoplasmatisch-nukleärer Translokation mit Resynthese des IκBαs und nukleärem Export von NF-κB aufrechterhalten wird<sup>190,191,212,213</sup>. Bei diesem Aktivitätsmuster handelt es sich nicht um eine harmonische, ungedämpfte Schwingung, sondern um eine initale, stimulussynchrone Schwingung auf die asynchrone, gedämpfte Schwingungen folgen<sup>191,212</sup>. Kearns et al. belegten, dass die Dämpfung IκBε-vermittelt erfolgt, welches durch NF-κB selbst, 45 Minuten nach der Expression des IκBα, in seinen mRNA-Spiegel ansteigt und den nukleären, IκBα-induzierten Schwingungen von NF- $\kappa$ B entgegenwirkt<sup>190</sup>. Dies stellt eine weitere, zum I $\kappa$ B $\alpha$  gegenläufige, negative Rückkopplung dar, deren Funktion in einer Modulation der NF-KB-Aktivität zu liegen scheint<sup>190,214</sup>. Weniger gut bekannt ist, welche Rolle den beiden Aktivitätsmustern des NF-κBs bei der Induktion der Zielgene zukommt.

Die Datenauswertung unserer qRT-PCR Ergebnisse wies für mehrere Zielgene eine Induktion nach 5- und 24-stündiger kontinuierlicher TNFα-Stimulation auf. Eine mögliche Erklärung könnte in den nukleären Oszillationen des NF-κB liegen, da für verschiedene Zelllinien ein zweiphasiges Bindungsmuster von NF-KB an die KB-Bindestellen im Verlauf der nukleären NF-KB-Schwingungen publiziert wurde<sup>212,215,216</sup>. Die Geninduktion nach 24 h lässt sich gut mit der von Ladner et al. beobachteten zweiten Welle der NF-KB1/RelA-DNA-Bindung erklären, welche über mehr als 24 h anhielt und mit einer Geninduktion einherging<sup>215</sup>. Der Anstieg des mRNA-Niveaus nach 5 h ist vereinbar mit den von Tian et al. publizierten Ergebnissen zur Kinetik der "späten" NF-kB-Zielgene. Zwar waren, bis auf IL8, keines unserer Gene Gegenstand dieser Studie, doch wurden für BIRC2 und BID mittlere Ansprechraten nachgewiesen<sup>212</sup>, so dass man zumindest für die Mitglieder der IAP- wie auch BCL2-Familie, XIAP und BCL-XL, eine ähnliche Kinetik vermuten darf. Die Kombination aus einer initialen späten Geninduktion, mehreren Stunden nach Beginn des Stimulus, in Kombination mit einer erneuten, zweiten Bindung der Transkriptionsfaktoren im Verlauf ist meines Wissens bisher noch nicht publiziert worden. In den oben erwähnten Studien handelte es sich bei der ersten NF-kB-Bindung an die kB-Bindungsstellen um eine Geninduktion unter transientem Impuls mit daran anschließender erneuter DNA-Bindung im Verlauf, wobei die Versuchsreihen, bis auf Ladner et al., keine Zeiten über mehr als 6 h nach initialem Stimulus untersucht haben. Eine erneute Geninduktion der "späten" Gene wäre also in vielen Arbeiten gar nicht erfasst worden.

CCND1 (Cyclin D1) und XIAP (XIAP) zeigten in Abhängigkeit von der Länge der TNF $\alpha$ -Exposition ein zueinander gegenläufiges Expressionsniveau mit Repression 5 h nach Stimulationsbeginn, welche als Folge eines Gegenregulationsmechanismus oder limitierenden Schrittes im Anschluss an eine frühere Geninduktion, wie sie beispielsweise nach transientem Impuls auftritt, erklärt werden kann. Das Expressionsniveau von IL8, welches von Tian et al. der Gruppe der frühen Gene zugeordnet wurde, sank beispielsweise drei Stunden nach initialem Reiz auf Kontrollwerte ab, obwohl anzunehmen ist, dass NF-κB1/RelA weiterhin fest an die κB-Stellen bindet, wie in der Literatur mittels EMSA und ChIP-Assay nachgewiesen wurde<sup>212</sup>. Die von uns, weitere zwei Stunden später detektierte Repression könnte eine Fortführung dieser Gegenregulation darstellen. Die Ursache des Expressionsabfalls unter gleichbleibender Bindung von NF-κB1/RelA an die Genpromotoren ist bisher nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer, durch NF-KB selbst ausgelösten, Hochregulierung negativer Regulatoren des Signalwegs, wie A20 und CYLD, zu finden sein<sup>194,217,218</sup> oder durch einen crosstalk mit anderen Transkriptionfaktoren bedingt sein. Es ist eine Vielzahl möglicher Ursachen denkbar und weitere Untersuchungen wären sinnvoll, um die Kinetik der Zielgenexpression des NF-kB-Signalwegs in normalen und transformierten Urothelzellen zu verstehen.

Zelllinienübergreifend wiesen wir eine Geninduktion von *CXCL8* (IL8) nach 5 und 24 h nach TNFα-Stimulation nach. Eine Erklärung der scheinbar steten Genaktivität des IL8 könnte in einer Dysregulation des NF-κB-Signalwegs liegen. In Urothelkarzinomzelllinien wurde eine erhöhte Expression der Methyltransferase SEDT6 nachgewiesen, welche mit der konstitutiven Aktivität des NF-κB-Signalwegs, einer Überexpression von RelA, einer erhöhen Aktivität von IKKβ und signifikant erhöhtem phosphorylierten RelA (Ser-536) einherging, bei gleichzeitig abgesenkter IκBα-Expression<sup>73</sup>. Wie bereits zuvor beschrieben, entzieht sich phosphoryliertes RelA der IκBα-Kontrolle und hat insbesondere auf die p-RelA-induzierte IL8-Genexpression kaum Einfluss<sup>200</sup>. Allerdings sprechen außer der IL8-Induktion keine unserer Ergebnisse für eine generell verstärkte Aktivität des Signalwegs in den untersuchten Urothelkarzinomzellen.

Survivin ist in vielen Studien als NF- $\kappa$ B-Zielgen beschrieben<sup>160,219–221</sup>. Seine Expression wurde in unserer Versuchsreihe weder in der T24 noch in der VM-Cub1 durch TNF $\alpha$  verändert, jedoch durch Bay11-7082 vermindert. Demnach scheint TNF $\alpha$  nicht den richtigen "Impulsgeber" für die Geninduktion von Survivin darzustellen.

Trotz der Vielzahl der Publikationen zur Überexpression von Survivin in Tumoren, und speziell im Urothelkarzinom, sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>144</sup>. Die einzige mir bekannte Studie zur Survivinexpression im Urothelkarzinom in Abhängigkeit von der NF-κB-Aktivität wurde von Cui et al.<sup>160</sup> publiziert. In der Zelllinie T24 wurde Survivin-Protein durch TNFa induziert und durch Bay11-7082 supprimiert. Mittels Luciferase-Reporterassay wiesen die Autoren die Wirkung von TNFa auf den Survivin-Promoter nach, die durch knockdown von RelA mittels siRNA verhindert wurde. Demnach kann man von einer durch TNFα induzierten und von RelA vermittelten Geninduktion des Survivins ausgehen<sup>160</sup>. Warum unsere Ergebnisse in der gleichen Zelllinie bezüglich der Genexpression des Survivins unter TNFα von diesen Ergebnissen von Cui et al. abwichen, ist unklar, zumal auch wir eine signifikante Repression des Survivins auf mRNA-Ebene durch Bay11-7082 detektieren konnten. Eine mögliche Erklärung könnte in der bereits unter basalen Bedingungen hohen Aktivität des NF-KB-Signalwegs in der von Cui et al. verwendeten Zelllinie liegen, mit erheblichem Anteil nukleären RelAs<sup>160</sup>. Dies deckte sich weder mit unseren Ergebnissen aus der Immuncytochemie noch aus der Zellfraktionierung, welche eine geringe nukleäre Aktivität des NF-kB-Signalwegs nahelegen. Allerdings verwendeten Cui et al. eine 5-fach höhere TNFa-Konzentration in ihren Versuchen. Eine genaue Abklärung bedürfte weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich für unsere Versuchsreihe in Bezug auf die Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalwegs im UC festhalten, dass TNF $\alpha$  die Expression aller Zielgene, ausgenommen von Survivin, beeinflusste; dies steht zumeist im Einklang mit der aktuellen Literatur zu anderen Zelltypen.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. T. Grasser. Basiswissen Urologie, 6th ed.; Springer-Lehrbuch; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- D. Jaworski, Ł. Szylberg, A. Gzil, et al. Diagnostic difficulties in cases of papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, urothelial proliferation of uncertain malignant potential, urothelial dysplasia and urothelial papilloma: A review of current literature. *Ann. Diagn. Pathol.* 2017, 40, 182–188.
- 3. K. Kraywinkel, J. Fiebig, G.B. Schulz. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Onkologe* 2018, 24 (1), 6–13.
- M.G.K. Cumberbatch, B. Foerster, J.W.F. Catto, et al. Repeat transurethral resection in non–muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur. Urol.* 73 (6), 925– 933.
- 5. Y. Kakehi, Y. Hirao, W.-J. Kim, et al. Bladder cancer working group report. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2010, 40 Suppl 1, i57-64.
- 6. J.A. Witjes, T. Lebret, E.M. Compérat, et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscleinvasive and metastatic bladder cancer. *Eur. Urol.* 2017, 71 (3), 462–475.
- 7. S. Antoni, J. Ferlay, I. Soerjomataram, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur. Urol.* 2017, 71 (1), 96–108.
- N.D. Freedman, D.T. Silverman, A.R. Hollenbeck, A. Schatzkin, C.C. Abnet. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011, 306 (7), 737–745.
- 9. C. Murta-Nascimento, B.J. Schmitz-Dräger, M.P. Zeegers, et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol* 2007, 25 (3), 285–295.
- 10. F.H. van Osch, S.H. Jochems, F.-J. van Schooten, R.T. Bryan, M.P. Zeegers. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a metaanalysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol* 2016, 45 (3), 857–870.
- 11. M. Burger, J.W.F. Catto, G. Dalbagni, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur. Urol.* 2013, 63 (2), 234–241.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Kurzversion 1.1, 2016. AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL, http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html, (Stand: 18.04.2018).
- 13. D.S. Kaufman, W.U. Shipley, A.S. Feldman. Bladder cancer. *Lancet* 2009, 374 (9685), 239–249.

- Urologie Online-Lehrbuch https://www.urologielehrbuch.de/ (accessed Jun 12, 2018).
- 15. U. Zwergel. Facharztprüfung Urologie; Urban & Fischer Verlag/Elsevier, 2008.
- 16. E.M. Compérat, M. Burger, P. Gontero, et al. Grading of urothelial carcinoma and the new "world health organisation classification of tumours of the urinary system and male genital organs 2016." *Eur Urol Focus* 2018, 5 (3), 457–466.
- 17. M. Kurtoglu, N.N. Davarpanah, R. Qin, et al. Elevating the horizon: Emerging molecular and genomic targets in the treatment of advanced urothelial carcinoma. *Clin. Genitourin. Cancer* 2015, 13 (5), 410–420.
- 18. E. Compérat, J. Varinot, J. Moroch, C. Eymerit-Morin, F. Brimo. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat. Rev. Urol.* 2018, 15 (3), 143–154.
- A. Karl, T. Grimm, F. Jokisch, N.T. Gaisa, C.G. Stief. Nichtmuskelinvasives Harnblasenkarzinom: Aktuelles zu Diagnoseverfahren, lokalen Therapieoptionen und zum Update der WHO-Klassifikation 2016. *Urologe* 2016, 55 (9), 1247–1258.
- 20. H.-U. Schmelz, C. Sparwasser, W. Weidner. Facharztwissen Urologie, 3rd ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
- 21. A. Suraweera, K.J. O'Byrne, D.J. Richard. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front. Oncol.* 2018, 8, 92.
- 22. G. Niegisch, M.J. Hoffmann, E.A. Koutsogiannouli, W.A. Schulz. [Epigenetics in urothelial cancer: Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options]. *Urologe A* 2015, 54 (4), 526–532.
- 23. W.A. Schulz, E.A. Koutsogiannouli, G. Niegisch, M.J. Hoffmann. Epigenetics of urothelial carcinoma. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1238, 183–215.
- 24. A.G. Robertson, J. Kim, H. Al-Ahmadie, et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 2017, 171 (3), 540-556.e25.
- 25. U. Kreimer, W.A. Schulz, A. Koch, G. Niegisch, W. Goering. HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma. *Front Oncol* 2013, 3, 255.
- 26. H. Rikiishi. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 2011, 830260.
- P.A. Marks, M. Dokmanovic. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2005, 14 (12), 1497– 1511.
- 28. J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5 (9), 769–784.

- A.J.M. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B.P. van Kuilenburg. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem* J 2003, 370 (Pt 3), 737–749.
- 30. S. Thiagalingam, K.-H. Cheng, H.J. Lee, et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003, 983 (1), 84–100.
- 31. W.S. Xu, R.B. Parmigiani, P.A. Marks. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007, 26 (37), 5541–5552.
- L. Gao, M.A. Cueto, F. Asselbergs, P. Atadja. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (28), 25748–25755.
- 33. K.W. Beekman, D. Bradley, M. Hussain. New molecular targets and novel agents in the treatment of advanced urothelial cancer. *Semin. Oncol.* 2007, 34 (2), 154–164.
- 34. S. Minucci, P.G. Pelicci. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6 (1), 38–51.
- 35. A.A. Lane, B.A. Chabner. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27 (32), 5459–5468.
- 36. P.A. Marks, W.-S. Xu. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J. Cell. Biochem.* 2009, 107 (4), 600–608.
- 37. W. Weichert, C. Denkert, A. Noske, et al. Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia* 2008, 10 (9), 1021–1027.
- 38. W. Weichert, A. Röske, V. Gekeler, et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2008, 9 (2), 139–148.
- 39. I. Oehme, H.E. Deubzer, D. Wegener, et al. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15 (1), 91–99.
- 40. S. Mithraprabhu, A. Kalff, A. Chow, T. Khong, A. Spencer. Dysregulated Class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics* 2014, 9 (11), 1511–1520.
- M.S. Finnin, J.R. Donigian, A. Cohen, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999, 401 (6749), 188– 193.
- 42. L. Zhang, J. Zhang, Q. Jiang, L. Zhang, W. Song. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018, 33 (1), 714–721.
- 43. C.-Y. Gui, L. Ngo, W.S. Xu, V.M. Richon, P.A. Marks. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101 (5), 1241–1246.

- V.M. Richon, T.W. Sandhoff, R.A. Rifkind, P.A. Marks. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *PNAS* 2000, 97 (18), 10014–10019.
- 45. P. Bose, Y. Dai, S. Grant. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacol. Ther.* 2014, 143 (3), 323–336.
- Y. Zhao, J. Tan, L. Zhuang, et al. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *PNAS* 2005, 102 (44), 16090–16095.
- 47. Y. Zhang, M. Adachi, R. Kawamura, K. Imai. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2006, 13 (1), 129–140.
- 48. W. Xu, L. Ngo, G. Perez, M. Dokmanovic, P.A. Marks. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103 (42), 15540–15545.
- X.D. Zhang, S.K. Gillespie, J.M. Borrow, P. Hersey. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3 (4), 425–435.
- 50. A.A. Ruefli, M.J. Ausserlechner, D. Bernhard, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a celldeath pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *PNAS* 2001, 98 (19), 10833–10838.
- A. Insinga, S. Monestiroli, S. Ronzoni, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005, 11 (1), 71–76.
- 52. P.A. Marks, R.A. Rifkind, V.M. Richon, et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2001, 1 (3), 194–202.
- 53. E.A. Olsen, Y.H. Kim, T.M. Kuzel, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25 (21), 3109–3115.
- 54. Y. Zhang, N. Li, C. Caron, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 2003, 22 (5), 1168–1179.
- 55. W. Gu, R.G. Roeder. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 1997, 90 (4), 595–606.
- J.J. Kovacs, P.J.M. Murphy, S. Gaillard, et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 2005, 18 (5), 601–607.
- 57. A.K. Bubna. Vorinostat—an overview. *Indian J Dermatol* 2015, 60 (4), 419.

- 58. PubChem. Vorinostat https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311 (accessed Aug 12, 2019).
- 59. B.S. Mann, J.R. Johnson, M.H. Cohen, R. Justice, R. Pazdur. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 2007, 12 (10), 1247–1252.
- B. Huang, X.-D. Yang, A. Lamb, L.-F. Chen. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell. Signal.* 2010, 22 (9), 1282–1290.
- 61. N.D. Perkins. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8 (1), 49–62.
- 62. M. Karin, Y. Yamamoto, Q.M. Wang. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3 (1), 17–26.
- 63. L.-F. Chen, W.C. Greene. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 392–401.
- 64. S.-C. Sun. The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17 (9), 545–558.
- 65. T.T. Huang, N. Kudo, M. Yoshida, S. Miyamoto. A nuclear export signal in the Nterminal regulatory domain of IκBα controls cytoplasmic localization of inactive NFκB/IκBα complexes. *PNAS* 2000, 97 (3), 1014–1019.
- O.V. Savinova, A. Hoffmann, G. Ghosh. The NFkB1 and NFkB2 Proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell* 2009, 34 (5), 591–602.
- 67. E.N. Hatada, A. Nieters, F.G. Wulczyn, et al. The ankyrin repeat domains of the NFkappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NFkappa B DNA binding. *PNAS* 1992, 89 (6), 2489–2493.
- 68. M.S. Hayden, S. Ghosh. Signaling to NF-κB. *Genes Dev.* 2004, 18 (18), 2195–2224.
- 69. Q. Zhang, M.J. Lenardo, D. Baltimore. 30 years of NF-κB: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell* 2017, 168 (1–2), 37–57.
- 70. chemie.de Das Chemie Fachportal vom Labor bis zum Prozess http://www.chemie.de/ (accessed Jan 13, 2019).
- 71. S. Youssef, L. Steinman. At once harmful and beneficial: the dual properties of NF-kappaB. *Nat. Immunol.* 2006, 7 (9), 901–902.
- 72. F. Wan, M.J. Lenardo. Specification of DNA binding activity of NF-κB proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1 (4).
- N. Mukherjee, E. Cardenas, R. Bedolla, R. Ghosh. SETD6 regulates NF-κB signaling in urothelial cell survival: Implications for bladder cancer. *Oncotarget* 2017, 8 (9), 15114–15125.

- R. Kiernan, V. Brès, R.W.M. Ng, et al. Post-activation turn-off of NF-kappa Bdependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.* 2003, 278 (4), 2758–2766.
- 75. L. Chen, W. Fischle, E. Verdin, W.C. Greene. Duration of nuclear NF-κB action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001, 293 (5535), 1653–1657.
- 76. L. Chen, Y. Mu, W.C. Greene. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 2002, 21 (23), 6539–6548.
- Y. Liu, P.W. Smith, D.R. Jones. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Functions as a Corepressor by Enhancing Histone Deacetylase 1-Mediated Deacetylation of RelA/p65 and Promoting Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 2006, 26 (23), 8683–8696.
- F. Yeung, J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004, 23 (12), 2369– 2380.
- F. Arenzana-Seisdedos, P. Turpin, M. Rodriguez, et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell. Sci.* 1997, 110 (Pt 3), 369–378.
- 80. F. Arenzana-Seisdedos, J. Thompson, M.S. Rodriguez, et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15 (5), 2689–2696.
- 81. J.W. Pierce, R. Schoenleber, G. Jesmok, et al. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997, 272 (34), 21096–21103.
- BAY 11-7082 CAS 19542-67-7 Calbiochem 196870
  https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/196870 (accessed Aug 14, 2019).
- A. Zanotto-Filho, A. Delgado-Cañedo, R. Schröder, et al. The pharmacological NFkappaB inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer Lett.* 2010, 288 (2), 192–203.
- B.M. Pickering, S. de Mel, M. Lee, et al. Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 2007, 26 (8), 1166–1177.
- 85. M. Mohan, A. Matin, F.E. Davies. Update on the optimal use of bortezomib in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Manag Res* 2017, 9, 51–63.
- 86. S. Jagannath, B. Barlogie, J.R. Berenson, et al. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2008, 143 (4), 537–540.

- P.G. Richardson, W. Xie, C. Mitsiades, et al. Single-agent bortezomib in previously untreated multiple myeloma: efficacy, characterization of peripheral neuropathy, and molecular correlations with response and neuropathy. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27 (21), 3518–3525.
- 88. B. Hambley, P.F. Caimi, B.M. William. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma: an update. *Ther Adv Hematol* 2016, 7 (4), 196–208.
- 89. S.H. Olejniczak, J. Blickwedehl, A. Belicha-Villanueva, et al. Distinct molecular mechanisms responsible for bortezomib-induced death of therapy-resistant versus sensitive B-NHL cells. *Blood* 2010, 116 (25), 5605–5614.
- 90. J. Adams. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004, 5 (5), 417–421.
- 91. C.J. Sherr, J.M. Roberts. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999, 13 (12), 1501–1512.
- 92. J.K. Kim, J.A. Diehl. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* 2009, 220 (2), 292–296.
- 93. E.A. Musgrove. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 2006, 24 (1), 13–19.
- 94. P. Ramos-García, J. Gil-Montoya, C. Scully, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis* 2017, 23 (7), 897–912.
- 95. S. Qie, J.A. Diehl. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med.* 2016, 94 (12), 1313–1326.
- 96. J.P. Alao. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 2007, 6, 24.
- 97. Y. Ma, B. Zhang, D. Wang, et al. HTLV-1 basic leucine zipper factor downregulates cyclin D1 expression via interactions with NF-κB. *Int. J. Mol. Med.* 2017, 39 (3), 764–770.
- 98. G.F. Draetta. Mammalian G1 cyclins. *Curr Opin Cell Biol* 1994, 6 (6), 842–846.
- 99. A.S. Lundberg, R.A. Weinberg. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18 (2), 753–761.
- K. Polyak, J.Y. Kato, M.J. Solomon, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994, 8 (1), 9–22.
- 101. D.M. Barnes, C.E. Gillett. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 52 (1–3), 1–15.

- G. Shan, T. Tang. Expression of cyclin D1 and cyclin E in urothelial bladder carcinoma detected in tissue chips using a quantum dot immunofluorescence technique. *Oncol Lett* 2015, 10 (3), 1271–1276.
- 103. F. Bertoni, A. Rinaldi, E. Zucca, F. Cavalli. Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2006, 24 (1), 22–27.
- O. Gautschi, D. Ratschiller, M. Gugger, D.C. Betticher, J. Heighway. Cyclin D1 in nonsmall cell lung cancer: a key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* 2007, 55 (1), 1–14.
- 105. A. Shamma, Y. Doki, H. Shiozaki, et al. Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 2000, 16 (2), 261–266.
- 106. R.R. John, N. Malathi, C. Ravindran, S. Anandan. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior. *Indian J Dent Res* 2017, 28 (2), 187–192.
- 107. E.A. Musgrove, C.S. Lee, M.F. Buckley, R.L. Sutherland. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91 (17), 8022–8026.
- A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* 2016, 42, 63– 71.
- 109. J. Cmielová, M. Rezáčová. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J. Cell. Biochem.* 2011, 112 (12), 3502–3506.
- 110. N.G. Starostina, E.T. Kipreos. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2012, 22 (1), 33–41.
- 111. N.A. Warfel, W.S. El-Deiry. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol* 2013, 25 (1), 52–58.
- S. Liu, W.R. Bishop, M. Liu. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist. Updat.* 2003, 6 (4), 183–195.
- 113. A.L. Gartel, A.L. Tyner. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* 1999, 246 (2), 280–289.
- 114. A.M. Abukhdeir, B.H. Park. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008, 10, e19.
- 115. S. Lee, D.M. Helfman. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (3), 1885–1891.
- 116. A. Suzuki, Y. Tsutomi, M. Miura, K. Akahane. Caspase 3 inactivation to suppress Fasmediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* 1999, 18 (5), 1239–1244.

- 117. G.P. Dotto. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1471 (1), M43-56.
- 118. Y. Liu, N. Yeh, X.-H. Zhu, et al. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *EMBO J.* 2007, 26 (22), 4683–4693.
- 119. T. Abbas, A. Dutta. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9 (6), 400–414.
- R. Lazzarini, S. Moretti, S. Orecchia, et al. Enhanced antitumor therapy by inhibition of p21waf1 in human malignant mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14 (16), 5099–5107.
- E. Crescenzi, G. Palumbo, J. de Boer, H.J.M. Brady. Ataxia telangiectasia mutated and p21CIP1 modulate cell survival of drug-induced senescent tumor cells: implications for chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14 (6), 1877–1887.
- 122. J. Cui, W.J. Placzek. Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic BCL2 family members. *Int J Mol Sci* 2018, 19 (1).
- 123. S. Gurumurthy, K.M. Vasudevan, V.M. Rangnekar. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2001, 20 (3–4), 225–243.
- 124. BCL2L1 Gene GeneCards | B2CL1 Protein | B2CL1 Antibody https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2L1&keywords=bclxl (accessed Aug 18, 2019).
- 125. S. Yang, Y. Mao, H. Zhang, et al. The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years. *Eur J Med Chem* 2019, 177, 63–75.
- I. Lebedeva, R. Rando, J. Ojwang, P. Cossum, C.A. Stein. Bcl-xL in prostate cancer cells: Effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res* 2000, 60 (21), 6052–6060.
- 127. X. Li, M. Marani, R. Mannucci, et al. Overexpression of BCL-XL underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res* 2001, 61 (4), 1699–1706.
- 128. M. Vogler. Targeting BCL2-proteins for the treatment of solid tumours. *Adv Med* 2014, 2014, 14.
- 129. C. Alfaro, M.F. Sanmamed, M.E. Rodríguez-Ruiz, et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treat. Rev.* 2017, 60, 24–31.
- 130. C. Kunsch, C.A. Rosen. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 1993, 13 (10), 6137–6146.
- 131. D.J.J. Waugh, C. Wilson. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14 (21), 6735–6741.
- 132. M. Baggiolini, I. Clark-Lewis. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters* 1992, 307 (1), 97–101.

- 133. M.T. Chow, A.D. Luster. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res* 2014, 2 (12), 1125–1131.
- Y. Kitadai, K. Haruma, N. Mukaida, et al. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clin. Cancer Res.* 2000, 6 (7), 2735– 2740.
- S. Singh, K.C. Nannuru, A. Sadanandam, M.L. Varney, R.K. Singh. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *Br. J. Cancer* 2009, 100 (10), 1638–1646.
- C. Gabellini, D. Trisciuoglio, M. Desideri, et al. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur. J. Cancer* 2009, 45 (14), 2618–2627.
- 137. J.M. David, C. Dominguez, D.H. Hamilton, C. Palena. The IL-8/IL-8R Axis: A double agent in tumor immune resistance. *Vaccines (Basel)* 2016, 4 (3).
- X.-J. Li, L.-X. Peng, J.-Y. Shao, et al. As an independent unfavorable prognostic factor, IL-8 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. *Carcinogenesis* 2012, 33 (7), 1302–1309.
- M.F. Sanmamed, O. Carranza-Rua, C. Alfaro, et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clin. Cancer Res.* 2014, 20 (22), 5697–5707.
- 140. J.C. Wilkinson, E. Cepero, L.H. Boise, C.S. Duckett. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24 (16), 7003–7014.
- 141. W.Z. Yang, H. Zhou, Y. Yan. XIAP underlies apoptosis resistance of renal cell carcinoma cells. *Mol Med Rep* 2018, 17 (1), 125–130.
- M.K. Evans, M.C. Brown, J. Geradts, et al. XIAP Regulation by MNK Links MAPK and NFκB signaling to determine an aggressive breast cancer phenotype. *Cancer Res.* 2018, 78 (7), 1726–1738.
- 143. H. Garg, P. Suri, J.C. Gupta, G.P. Talwar, S. Dubey. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int.* 2016, 16, 49.
- 144. P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.* 2015, 141 (4), 389–397.
- J. Southgate, K.A. Hutton, D.F. Thomas, L.K. Trejdosiewicz. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab. Invest.* 1994, 71 (4), 583–594.
- 146. W.A. Schulz, A. Lang, J. Koch, A. Greife. The histone demethylase UTX/KDM6A in cancer: Progress and puzzles. *International Journal of Cancer* 2019, 145 (3), 614–620.

- G. Niegisch, J. Knievel, A. Koch, et al. Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urol. Oncol.* 2013, 31 (8), 1770–1779.
- A.F. Giannopoulou, A.D. Velentzas, E.G. Konstantakou, et al. Revisiting histone deacetylases in human tumorigenesis: The paradigm of urothelial bladder cancer. *Int J Mol Sci* 2019, 20 (6).
- M. Pinkerneil, M.J. Hoffmann, W.A. Schulz, G. Niegisch. HDACs and HDAC inhibitors in urothelial carcinoma - perspectives for an antineoplastic treatment. *Curr. Med. Chem.* 2017.
- 150. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014, 507 (7492), 315–322.
- 151. N.G.J. Leus, P.E. van der Wouden, T. van den Bosch, et al. HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF-κB p65 transcriptional activity. *Biochem. Pharmacol.* 2016, 108, 58–74.
- 152. G. Imre, V. Gekeler, A. Leja, T. Beckers, M. Boehm. Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation. *Cancer Res.* 2006, 66 (10), 5409–5418.
- 153. Y. Dai, S. Chen, L. Wang, et al. Disruption of IkappaB kinase (IKK)-mediated RelA serine 536 phosphorylation sensitizes human multiple myeloma cells to histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (39), 34036–34050.
- 154. Y. Dai, M. Rahmani, P. Dent, S. Grant. Blockade of histone deacetylase inhibitorinduced RelA/p65 acetylation and NF-κB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25 (13), 5429–5444.
- 155. S.-C. Wang, S.-T. Wang, H.-T. Liu, et al. Trichostatin A induces bladder cancer cell death via intrinsic apoptosis at the early phase and Sp1-survivin downregulation at the late phase of treatment. *Oncol. Rep.* 2017, 38 (3), 1587–1596.
- 156. K.B. Glaser, M.J. Staver, J.F. Waring, et al. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2003, 2 (2), 151–163.
- Y.B. Kim, S.W. Ki, M. Yoshida, S. Horinouchi. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J. Antibiot.* 2000, 53 (10), 1191–1200.
- W. Qu, Y.-D. Kang, M.-S. Zhou, et al. Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells. *Urol. Oncol.* 2010, 28 (6), 648–654.

- 159. V. Baldin, J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano, G. Draetta. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993, 7 (5), 812–821.
- 160. X. Cui, D. Shen, C. Kong, et al. NF-κB suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2017, 7, 40723.
- B.T. Takizawa, E.M. Uchio, J.J. Cohen, M.A. Wheeler, R.M. Weiss. Downregulation of survivin is associated with reductions in TNF receptors' mRNA and protein and alterations in nuclear factor kappa B signaling in urothelial cancer cells. *Cancer Invest.* 2007, 25 (8), 678–684.
- A.C. Mita, M.M. Mita, S.T. Nawrocki, F.J. Giles. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14 (16), 5000–5005.
- 163. D.C. Altieri. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001, 7 (12), 542–547.
- 164. G. Ambrosini, C. Adida, D.C. Altieri. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997, 3 (8), 917–921.
- 165. S. Ning, S. Fuessel, M. Kotzsch, et al. siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth. *Int. J. Oncol.* 2004, 25 (4), 1065–1071.
- 166. S. Gogalic, U. Sauer, S. Doppler, C. Preininger. Bladder cancer biomarker array to detect aberrant levels of proteins in urine. *Analyst* 2015, 140 (3), 724–735.
- 167. Y. Horiguchi, K. Kuroda, J. Nakashima, M. Murai, K. Umezawa. Antitumor effect of a novel nuclear factor-kappa B activation inhibitor in bladder cancer cells. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003, 3 (6), 793–798.
- H.R. Gatla, Y. Zou, M.M. Uddin, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition induces IκB Kinase (IKK)-dependent Interleukin-8/CXCL8 expression in ovarian cancer cells. J. Biol. Chem. 2017, 292 (12), 5043–5054.
- 169. B.P. Ashburner, S.D. Westerheide, A.S. Baldwin. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21 (20), 7065–7077.
- C. Rieger, D. Huebner, A. Temme, M.P. Wirth, S. Fuessel. Antisense- and siRNAmediated inhibition of the anti-apoptotic gene Bcl-xL for chemosensitization of bladder cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2015, 47 (3), 1121–1130.
- 171. E.J. Kirsh, D.A. Baunoch, W.M. Stadler. Expression of bcl-2 and bcl-X in bladder cancer. *J. Urol.* 1998, 159 (4), 1348–1353.
- 172. I. Lebedeva, A. Raffo, R. Rando, et al. Chemosensitization of bladder carcinoma cells by bcl-xL antisense oligonucleotides. *J. Urol.* 2001, 166 (2), 461–469.

- A. El-Zawahry, P. Lu, S.J. White, C. Voelkel-Johnson. In vitro efficacy of AdTRAIL gene therapy of bladder cancer is enhanced by trichostatin A-mediated restoration of CAR expression and downregulation of cFLIP and Bcl-X L. *Cancer Gene Ther* 2006, 13 (3), 281–289.
- 174. F. Facchetti, S. Previdi, M. Ballarini, et al. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004, 9 (5), 573–582.
- 175. J.A. Vrana, R.H. Decker, C.R. Johnson, et al. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. Oncogene 1999, 18 (50), 7016–7025.
- 176. S.J. Riedl, M. Renatus, R. Schwarzenbacher, et al. Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001, 104 (5), 791–800.
- 177. R. Takahashi, Q. Deveraux, I. Tamm, et al. A single BIR Domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 1998, 273 (14), 7787–7790.
- 178. C. Sun, M. Cai, A.H. Gunasekera, et al. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 1999, 401 (6755), 818–822.
- C. Sun, M. Cai, R.P. Meadows, et al. NMR structure and mutagenesis of the third Bir Domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 2000, 275 (43), 33777–33781.
- Q.L. Deveraux, E. Leo, H.R. Stennicke, et al. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO Journal* 1999, 18 (19), 5242–5251.
- A. Pérez-Perarnau, L. Coll-Mulet, C. Rubio-Patiño, et al. Analysis of apoptosis regulatory genes altered by histone deacetylase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia cells. *Epigenetics* 2011, 6 (10), 1228–1235.
- 182. J.Y.-C. Lee, C.-W. Kuo, S.-L. Tsai, et al. Inhibition of HDAC3- and HDAC6-promoted Survivin expression plays an important role in SAHA-induced autophagy and viability reduction in breast cancer cells. *Front. Pharmacol.* 2016, 7.
- 183. V. Bilim, T. Kasahara, N. Hara, K. Takahashi, Y. Tomita. Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro. *Int. J. Cancer* 2003, 103 (1), 29–37.
- 184. S.M. Russo, J.E. Tepper, A.S. Baldwin, et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: Implications for a role of NF-κB. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics* 2001, 50 (1), 183–193.
- 185. M. Maynadier, M. Maynadier, I. Basile, et al. Combination treatment with proteasome inhibitors and antiestrogens has a synergistic effect mediated by

p21WAF1 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncology Reports* 2016, 36 (2), 1127–1134.

- 186. M.-H. Sung, L. Salvatore, R. De Lorenzi, et al. Sustained oscillations of NF-κB produce distinct genome scanning and gene expression profiles. *PLoS One* 2009, 4 (9).
- 187. A. Salmerón, J. Janzen, Y. Soneji, et al. Direct phosphorylation of NF-κB1 p105 by the IκB Kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. J. Biol. Chem. 2001, 276 (25), 22215–22222.
- F. Mercurio, J.A. DiDonato, C. Rosette, M. Karin. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev.* 1993, 7 (4), 705–718.
- 189. A.K. Moorthy, G. Ghosh. p105·IκBγ and prototypical IκBs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcellular localization of NF-κB. J. Biol. Chem. 2003, 278 (1), 556–566.
- 190. J.D. Kearns, S. Basak, S.L. Werner, C.S. Huang, A. Hoffmann. IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. J. Cell Biol. 2006, 173 (5), 659–664.
- A. Hoffmann, A. Levchenko, M.L. Scott, D. Baltimore. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002, 298 (5596), 1241–1245.
- 192. S. Saccani, S. Pantano, G. Natoli. Two waves of Nuclear Factor κb recruitment to target promoters. *J Exp Med* 2001, 193 (12), 1351–1360.
- 193. S. Tilborghs, J. Corthouts, Y. Verhoeven, et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017, 120, 141–150.
- B. Hoesel, J.A. Schmid. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer 2013, 12 (1), 86.
- 195. F. Li, J. Zhang, F. Arfuso, et al. NF-κB in cancer therapy. *Arch. Toxicol.* 2015, 89 (5), 711–731.
- 196. G. Levidou, A.A. Saetta, P. Korkolopoulou, et al. Clinical significance of nuclear factor (NF)-kappaB levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch.* 2008, 452 (3), 295–304.
- 197. S. Inoue, H. Ide, T. Mizushima, et al. Nuclear Factor-κB promotes urothelial tumorigenesis and cancer progression via cooperation with androgen receptor signaling. *Mol. Cancer Ther.* 2018, 17 (6), 1303–1314.
- 198. F. Christian, E.L. Smith, R.J. Carmody. The regulation of NF-κB subunits by phosphorylation. *Cells* 2016, 5 (1).
- 199. L.-F. Chen, S.A. Williams, Y. Mu, et al. NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25 (18), 7966–7975.

- C.Y. Sasaki, T.J. Barberi, P. Ghosh, D.L. Longo. Phosphorylation of RelA/p65 on serine
  536 defines an IkBa-independent NF-kB pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (41),
  34538–34547.
- 201. J. Bohuslav, L.-F. Chen, H. Kwon, Y. Mu, W.C. Greene. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (25), 26115–26125.
- 202. L. Vermeulen, G. De Wilde, P. Van Damme, W. Vanden Berghe, G. Haegeman. Transcriptional activation of the NF-κB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *The EMBO Journal* 2003, 22 (6), 1313–1324.
- 203. H. Zhong, H. SuYang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. Ghosh. The transcriptional activity of NF-κB is regulated by the IκB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP–independent mechanism. *Cell* 1997, 89 (3), 413–424.
- 204. A. Duran, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by ζPKC in NF-κB transcriptional activation. *EMBO J.* 2003, 22 (15), 3910–3918.
- 205. H. Zhong, R.E. Voll, S. Ghosh. Phosphorylation of NF-κB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998, 1 (5), 661–671.
- H. Zhong, M.J. May, E. Jimi, S. Ghosh. The Phosphorylation Status of Nuclear NF-KB Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular Cell* 2002, 9 (3), 625–636.
- 207. J. Yang, G.-H. Fan, B.E. Wadzinski, H. Sakurai, A. Richmond. Protein Phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (51), 47828–47833.
- 208. J. Chew, S. Biswas, S. Shreeram, et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-κB signalling. *Nat Cell Biol* 2009, 11 (5), 659–666.
- 209. L.-F. Chen, W.C. Greene. Regulation of distinct biological activities of the NF-κB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med* 2003, 81 (9), 549–557.
- J.M. Buckwalter, W. Chan, L. Shuman, et al. Characterization of histone deacetylase expression within in vitro and in vivo bladder cancer model systems. *Int J Mol Sci* 2019, 20 (10).
- 211. C. Poyet, B. Jentsch, T. Hermanns, et al. Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer. *BMC Clin Pathol* 2014, 14 (1), 10.
- 212. B. Tian, D.E. Nowak, A.R. Brasier. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC Genomics* 2005, 6, 137.
- 213. D.E. Nelson, A.E.C. Ihekwaba, M. Elliott, et al. Oscillations in NF-κB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004, 306 (5696), 704–708.

- 214. D. Barken, C.J. Wang, J. Kearns, et al. Comment on "Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression." *Science* 2005, 308 (5718), 52; author reply 52.
- K.J. Ladner, M.A. Caligiuri, D.C. Guttridge. Tumor Necrosis Factor-regulated aiphasic activation of NF-κB is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. J. Biol. Chem. 2003, 278 (4), 2294–2303.
- Y. Han, A.R. Brasier. Mechanism for biphasic Rel A· NF-κB1 nuclear translocation in Tumor Necrosis Factor α-stimulated hepatocytes. J. Biol. Chem. 1997, 272 (15), 9825–9832.
- I.E. Wertz, K.M. O'Rourke, H. Zhou, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004, 430 (7000), 694– 699.
- E. Trompouki, E. Hatzivassiliou, T. Tsichritzis, et al. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 2003, 424 (6950), 793–796.
- 219. L. Tracey, A. Pérez-Rosado, M.J. Artiga, et al. Expression of the NF-κB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol* 2005, 206 (2), 123–134.
- 220. H. Kawakami, M. Tomita, T. Matsuda, et al. Transcriptional activation of survivin through the NF-κB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer* 2005, 115 (6), 967–974.
- 221. Y.-F. Jiang, B. He, N.-P. Li, et al. The oncogenic role of NS5A of hepatitis C virus is mediated by up-regulation of survivin gene expression in the hepatocellular cell through p53 and NF-κB pathways. *Cell Biol Int* 2011, 35 (12), 1225–1232.

## Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, für seine hervorragende Betreuung. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Darüber hinaus geht ein großer Dank an Priv.-Doz. Dr. Michèle Hoffmann, Dr. Margaretha Skowron und an Christiane Hader für ihre engagierte Unterstützung und die vielen hilfreichen Tipps und Kniffe.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Kollegen aus dem Labor bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, und bei Dr. Gudrun Totzke für den kleinen Einblick in die große Welt des NF-κB.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.