

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

Neue Kombinationstherapien mit Klasse-I-HDAC-Inhibitoren für das
Urothelkarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von
Alexander Sebastian Hölscher
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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hölscher, A. S., Schulz, W. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., Hoffmann, M. J., (2018), Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. *Clinical Epigenetics*, (10)1

Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom ist eine häufige Krebserkrankung des älteren Menschen. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Fernmetastasierung liegt unter 50% und die therapeutischen Möglichkeiten sind sehr beschränkt. Cisplatin-basierte Chemotherapien sind nur eine begrenzte Zeit lang wirksam und gleichzeitig mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Daher werden dringend neue Therapiemöglichkeiten für das metastasierte Urothelkarzinom benötigt.

Moderne Hochdurchsatzverfahren legen eine besondere Rolle von epigenetischen Regulatoren bei der Initiation und Progression von Urothelkarzinomen nahe. Auf dieser Grundlage forscht unsere Arbeitsgruppe seit einigen Jahren auf dem Gebiet der Histondeacetylasen (HDAC). HDAC sind Enzyme, die Acetyl-Gruppen von Lysin-Seitenketten der Histone abspalten können, „*epigenetic erasers*“. Ihnen entgegen steht die Aktivität der Histonacetyltransferasen (HAT), deren Aktivität in der Bindung von neuen Acetyl-Gruppen liegt, „*epigenetic writers*“. Durch Veränderung des Gleichgewichts von Deacetylierung hin zu Acetylierung lässt sich die Transkription vieler Gene verändern. Bei Krebszellen sind insbesondere die Re-Expression von Tumorsuppressoren sowie die Repression von Onkogenen häufig beobachtete Wirkungen HDAC-modulierender Experimente. Durch systematische Eingrenzung wurden die Klasse-I-HDAC als vielversprechende Zielmoleküle einer neuen antineoplastischen Therapie für das Urothelkarzinom identifiziert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu evaluieren, ob durch Kombination von Inhibitoren der Klasse-I-HDAC mit einem Inhibitor der BET (*bromodomains and extra terminal domain*)-Proteine synergistische antineoplastische Effekte auf Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) entstehen. Solche BET-Proteine enthalten Bromodomänen, welche die acetylierten Lysin-Seitenketten der Histone spezifisch binden können und dabei Regulatoren der Transkription als Bestandteile von Multi-Protein-Komplexen rekrutieren können, „*epigenetic readers*“. Die Inhibition der BET-Proteine kann zu einer Repression von Onkogenen führen. Ähnliche experimentelle Ansätze zur Kombination von HDAC- und BET-Inhibition haben bei anderen Tumorentitäten bereits vielversprechende Ergebnisse erbracht.

Die Kombinationsbehandlung wirkte sich synergistisch auf Viabilität und Klonogenität der UCC aus. Eine Kontroll-Zelllinie war dabei etwas weniger sensitiv gegenüber der Kombinationsbehandlung. Anhand des Zellzyklusprofils in der Durchflusszytometrie, einer Annexin-V-Färbung, der Spaltung von PARP und Caspase-3 im Western-Blot sowie der Umkehrung des apoptotischen Phänotyps durch den Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh wurde nachgewiesen, dass die Kombinationsbehandlung Apoptose auslöst. Das Ausmaß an Apoptose war dabei viel eindeutiger ausgeprägt als bei den Einzelbehandlungen.

Es wurden einige stark verändert exprimierte Proteine identifiziert, die jedes für sich allein genommen in Frage kämen, für die synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlung ursächlich zu sein. Ein Beispiel hierfür ist der stark induzierte CDK-Inhibitor p57^{KIP2}, der die Wirkung der Kombinationsbehandlung vermitteln könnte. Unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode wurden daher p57^{KIP2}-*Knockout*-Zellen generiert. Diese waren jedoch entgegen der Erwartungen und Ergebnisse einer anderen Studie an Pankreastumoren sensitiver gegenüber der Kombinationsbehandlung als die Wildtyp-Zellen.

Weiterhin stellten wir nach der Kombinationsbehandlung erhebliche Veränderungen bei der Histonacetylierung fest, welche die Wirkung der BET-Inhibition erheblich verstärken könnten. Schließlich könnten sich HDAC- und BET-Inhibition gut ergänzen, weil BET-Inhibition die Induktion von anti-apoptotischen Genen durch HDAC-Inhibition attenuieren kann.

Insgesamt erscheint die kombinierte HDAC- und BET-Inhibition für das Urothelkarzinom sehr vielversprechend. Deshalb sollte diese Arbeit bald durch Experimente *in vivo* ergänzt werden, um besser einschätzen zu können, ob auch klinische Studien lohnend sein könnten.

Abstract

Urothelial carcinoma of the urinary bladder is a common cancer of the elderly. In case of metastatic disease, the five-year survival is below 50% and therapeutic options are limited. Platinum-based chemotherapies are efficacious only for a limited time period and commonly cause severe adverse effects. Therefore, novel therapeutic options are urgently needed.

Modern high-throughput screenings have revealed the role of epigenetic regulators in the initiation and progression of urothelial carcinoma. Based on this insight, our group has been researching histone deacetylases (HDACs) over the past few years. HDACs are enzymes removing acetyl groups from lysine tails of histones, thus “epigenetic erasers”. The opposite reaction is carried out by histone acetyltransferases (HATs), thus “epigenetic writers”. By shifting the balance between continuous acetylation and deacetylation towards acetylation, transcription of many genes can be altered at the same time. In cancer cells this may lead to the re-expression of tumor suppressors and repression of oncogenes. Class-I HDACs were identified as the most promising targets for anti-cancer therapy by systematic investigations.

The aim of this thesis was to evaluate whether the combination of class-I-HDAC inhibition with the inhibition of BET (*bromodomains and extra terminal domain*) proteins exerts synergistic effects on urothelial carcinoma cell lines (UCCs). As “epigenetic readers”, BET proteins contain so called Bromodomains capable of binding to acetylated lysine residues of histones. In this fashion these proteins can recruit multi-protein complexes regulating the transcription of certain genes. Inhibition of BETs can evoke a repressed state of oncogenes. According experimental attempts in other cancer entities have yielded promising results.

The combination treatment acted synergistically on the viability and clonogenicity of UCCs, whereas a benign control cell line was less sensitive. Flow cytometric cell cycle analyses, western-blot analyses of PARP cleavage as well as Caspase-3 cleavage and the reversal of the apoptotic phenotype by the pan-Caspase inhibitor Q-VD-OPh confirmed the observed cell death to be apoptotic. Apoptosis was induced much more clearly by the combination treatment than by each single treatment.

Furthermore, we identified proteins whose expression was strongly altered by the combination treatment. Each of these could in principle have been responsible for the synergistic action of the combination treatment. A prominent candidate was the CDK inhibitor p57^{KIP2} which is strongly induced by the combination treatment. A CRISPR/Cas9 approach was therefore used to generate p57^{KIP2} knockout cells. Unexpectedly, whereas a similar combination treatment in pancreatic ductal adenocarcinoma reported the opposite, we observed increased instead of decreased sensitivity of these knockout cells to the combination treatment.

Finally, we observed more extensive changes in global histone acetylation by the combination treatment that could in turn explain the increased efficacy of BET inhibition. HDAC and BET inhibition may also complement one another, because BET inhibition is able to attenuate the induction of anti-apoptotic genes caused by HDAC inhibition.

In conclusion, combined inhibition of HDAC and BET proteins is a promising option for the treatment of urothelial carcinoma. *In vivo* studies should be carried out to evaluate whether clinical trials are worthwhile undergoing.

Abkürzungsverzeichnis

ABL	<i>Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1</i>
AKT1/2/3	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1/2/3</i>
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
AURKA/B	<i>Aurora-Kinase A/B</i>
BAH	<i>bromo-adjacent homology</i>
BAK	<i>BCL-2 Antagonist/Killer 1</i>
BAX	<i>BCL-2 Associated X</i>
BBC3	<i>BCL-2 Binding Component 3</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BET	<i>bromodomains and extra terminal domain</i>
BIM	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
BIRC5	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i>
BMF	<i>Bcl2 Modifying Factor</i>
bp	<i>Basenpaar</i>
BRD4	<i>Bromodomain-Containing Protein 4</i>
BRDT	<i>Bromodomain Testis Associated</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated 9</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCND1	<i>Cyclin D1 Gen</i>
CDK4/9	<i>Cyclin Dependent Kinase 4/9</i>
CDKN1C	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 1C</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>
CHD3	<i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3</i>
ChIP Seq	<i>Chromatin Immuno-Precipitation DNA-Sequencing</i>
CoREST	<i>Corepressor RE1 Silencing Transcription Factor</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTM	<i>C-terminal motif</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
E2F	<i>E2 Transcription Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EP300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
ERBB2/3	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2/3</i>
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
ET	<i>extra-terminal recruitment domain</i>
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
GATAD2A/B	<i>GATA Zinc Finger Domain Containing Protein 2A/B</i>
GLTSCR1	<i>Glioma tumor suppressor candidate region gene 1</i>
H1/H2A/H2B/H3/H4	<i>Histon H1/2A/2B/3/4</i>
HAT	<i>Histonacetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histondeacetylase</i>
HEXIM1	<i>Hexamethylene Bisacetamide Inducible 1</i>
HIF-1α	<i>Hypoxie-induzierter Faktor 1α</i>
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>
IC₅₀	<i>mittlere halbmaximal inhibitorische Konzentration</i>
JMJD6	<i>Jumonji Domain-Containing Protein 6</i>
KDM6A/C	<i>Lysine Demethylase 6A/C</i>

KIX	<i>KID-interacting</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KMT2A/C/D	<i>Lysine Methyltransferase 2A/C/D</i>
LSD1	<i>Lysine-specific Demethylase 1</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBD2/3	<i>Methyl-CpG-binding Domain Protein 2/3</i>
MCL1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIBC	<i>Muscle invasive bladder cancer</i>
MTA1/2/3	<i>Metastasis associated gene 1/2/3</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid</i>
NMIBC	<i>Non-muscle invasive bladder cancer</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NSD3	<i>Nuclear SET Domain-Containing Protein 3</i>
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</i>
NUT	<i>nuclear protein in testis</i>
p14^{ARF}	<i>p14 Alternative Reading Frame</i>
p16^{INK4A}	<i>p16 Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4A</i>
p21^{CIP1}	<i>p21 CDK-Interaction Protein 1</i>
p57^{KIP2}	<i>p57 kinase inhibitor protein 2</i>
PARP	<i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PHD	<i>plant homeodomain</i>
PI3-Kinase	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PMAIP1	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PTM	<i>posttranslationale Modifikation</i>
pRB	<i>Retinoblastomprotein</i>
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
Rb1	<i>RB Transcriptional Corepressor 1 gene</i>
RbAp46/48	<i>Rb-associated protein 46/48</i>
SAP18/30	<i>Sin3A Associated Protein 18/30</i>
SAPK/JNK	<i>Stress-activated protein kinase/c-Jun NH (2)-terminal kinase</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Sin3	<i>Switch independet 3</i>
Sin3A/B	<i>Sin3 transcription regulator family member A/B</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT	<i>Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog</i>
SKP2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand TRAIL</i>
TURBT	<i>Transurethral Resection of Bladder Tumor</i>
UCC	<i>Urothelkarzinom-Zelllinie</i>
UTX	<i>Ubiquitously Transcribed TPR Protein on the X Chromosome</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	<i>Wingless</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2	Diagnose und Therapie	1
1.2	Molekulare Eigenschaften des Urothelkarzinoms	3
1.2.1	Mutationsspektrum	4
1.2.2	Wichtige Onkogene und Tumorsuppressoren	4
1.2.3	Veränderungen in der epigenetischen Regulation	6
1.3	Histondeacetylasen	8
1.3.1	Einteilung	8
1.3.2	Lokalisation und Struktur	9
1.3.3	Katalytischer Mechanismus der Deacetylierung	9
1.3.4	Regulation der Aktivität durch Komplexbildung und PTM	9
1.3.5	Allgemeine Funktionen	11
1.3.6	Rolle der HDAC bei Karzinogenese und Tumorprogression	12
1.3.7	Pharmakologische HDAC-Inhibition	13
1.3.8	Antineoplastische Effekte der HDAC-Inhibition	13
1.3.9	Stand der HDAC-Inhibitoren in der Krebstherapie	15
1.3.10	HDAC als therapeutische Ziele im Urothelkarzinom	16
1.4	BET-Proteine	21
1.4.1	Bromodomänen und Bromodomänen-enthaltende Proteine	21
1.4.2	Lokalisation und Struktur	22
1.4.3	Regulation der Transkription	23
1.4.4	Weitere Funktionen	24
1.4.5	Rolle der BET bei Karzinogenese und Tumorprogression	25
1.4.6	Pharmakologische BET-Inhibition	25
1.4.7	BET-Inhibition in der Krebstherapie	26
1.4.8	BET-Proteine als therapeutische Ziele im Urothelkarzinom	27
1.5	Ziele der Arbeit	28
1.6	Ethikvoten	29

2	Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines, Hölscher, A. S., Schulz, W. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., Hoffmann, M. J., Clinical Epigenetics, (10)1, (2018)	31
3	Diskussion	46
3.1	Variierende Sensitivität von Urothelkarzinom-Zelllinien gegenüber BET-Inhibition	46
3.2	Wirkungen kombinierter HDAC- und BET-Inhibition in verschiedenen Zellkulturmodellen	48
3.2.1	Synergistische antineoplastische Aktivität – Proliferation und Klonogenität	48
3.2.2	Apoptose als vorherrschender Zelltodmechanismus	49
3.2.3	Unterschiede zwischen Karzinomzelllinien und Normalzellen – ein Hinweis auf Tumorspezifität?	50
3.3	Molekulare Mechanismen des Synergismus	52
3.3.1	Induktion von p57 ^{KIP2}	52
3.3.2	Veränderte Expression apoptotischer Regulatoren	58
3.3.3	Transkriptionelle Veränderungen durch Hyperacetylierung der Histone	61
3.4	Fazit und Ausblick	65
4	Zusatzkapitel Aurora-Kinasen	66
4.1	Inhibition der Aurora-Kinasen im Urothelkarzinom	66
4.2	Material und Methoden	68
4.3	Ergebnisse und Diskussion – Kombination der Inhibition von HDAC und Aurora-Kinasen	68
5	Literaturverzeichnis	74
6	Anhang	85

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom ist mit 430.000 neuen Fällen pro Jahr die neunthäufigste Krebserkrankung weltweit [1]. Meistens handelt es sich um Urothelkarzinome aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege und nur selten um plattenepithelartige, kleinzellige oder drüsig differenzierte Karzinome [2]. In Industrieländern sind Harnblasenkarzinome besonders häufig und der Anteil an Urothelkarzinomen ist besonders hoch [1]. Plattenepithelartige Harnblasenkarzinome kommen überproportional häufig in nordafrikanischen Ländern vor [1] und werden durch Infektion mit Schistosomen begünstigt [3]. Männer erkranken deutlich häufiger als Frauen und das Erkrankungsalter liegt in den meisten Fällen im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt [1].

Urin ist in der Harnblase zeitlebens anwesend und kann Karzinogene enthalten, die in den Urothelzellen Mutationen verursachen und damit die Entstehung von Harnblasenkarzinomen begünstigen [4]. Ein besonders starkes Risiko besteht für Personen, die beruflich gegenüber aromatischen Aminen exponiert sind, wie es häufig in der chemischen Industrie vorkommt [5, 6]. Auch durch Zigarettenrauchen gelangen aromatische Amine [7] und viele weitere Karzinogene [4] in den Urin. Dies gilt als Grund für das Zigarettenrauchen als wichtigsten Risikofaktor [4, 8].

Neben dem Geschlecht konnten weitere genetische Risikofaktoren entdeckt werden. Beispielsweise wird für genetische Polymorphismen in solchen Genen ein erhöhtes Risiko vermutet, die für Enzyme kodieren, welche den Abbau von aromatischen Aminen katalysieren [9].

1.1.2 Diagnose und Therapie

Die wichtigste klinische Einteilung erfolgt in muskelinvasive (MIBC) und nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIBC), weil sich Prognose und Therapie unterscheiden [10]. Dabei umfassen NMIBC die Tumorstadien Tis, Ta und T1 und MIBC T2a bis T4 [10]. Es gibt zwei Entstehungspfade: papilläre Läsionen, die in das Lumen vorwachsen, und wenig differenzierte flache, nicht-papilläre Läsionen (*Carcinoma in situ*).

Ein *Carcinoma in situ* kann sich direkt zum MIBC entwickeln, während papilläre Läsionen seltener zu MIBC fortschreiten. Meist wandeln sich nur die hochgradigen papillären Läsionen im Verlauf zu MIBC [11]. NMIBC (80%) sind häufiger als MIBC (20%). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit MIBC (unter 50%) ist schlechter als bei NMIBC (90%) [12].

Die Resektion eines NMIBC erfolgt in der Regel durch transurethrale Resektion (TURBT). Je nach Risikograd der Läsion sind beim NMIBC die adjuvante intravesikale Instillation von Chemotherapeutika oder eine Immuntherapie mittels BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) wichtige Maßnahmen, um die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv zu senken [10]. Trotzdem kommt es häufig zu Rezidiven, sodass nicht selten wiederholte TURBT bis hin zur Zystektomie nötig werden.

Beim MIBC hingegen kann die Harnblase meist nicht erhalten bleiben [10] und die radikale Zystektomie ist die Therapie der Wahl, wenn eine Metastasierung nicht nachweisbar war. Außerdem wird eine bilaterale pelvine Lymphadenektomie durchgeführt, die die Prognose weiter verbessern kann [13]. Trotz Lymphadenektomie sinkt die 10-Jahres-Überlebensrate bei positivem Lymphknotenstatus unabhängig vom Stadium auf 34% [14]. Um die Harnblase in manchen Fällen dennoch erhalten zu können, wurde ein trimodales Therapiekonzept aus TURBT, gefolgt von kombinierter Radio- und Chemotherapie, entwickelt. Es kann angewandt werden, wenn der Tumor vollständig durch TURBT entfernt werden konnte. Wenn dieses Konzept angewendet wird, kann die Harnblase dauerhaft erhalten bleiben und so die Morbidität reduziert werden. Allerdings konkurriert diese Verbesserung der Lebensqualität dann aber mit dem onkologischen Ergebnis, weil die lokale Kontrolle des Tumors durch Lokalrezidive gefährdet werden kann. Das trimodale Konzept kommt deshalb speziell bei älteren und morbidem Patienten zum Einsatz, wenn die konventionelle kurative Therapie ohnehin hohe Risiken birgt [15].

Patienten mit Fernmetastasen erhalten vorrangig eine Cisplatin-basierte Kombinationschemotherapie. Hier hat sich die Kombination von Cisplatin mit Gemcitabin als weniger toxisch, aber vergleichbar effektiv herausgestellt, verglichen mit der vorher bevorzugten Kombination von Cisplatin mit Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin (MVAC) [16]. Die Hauptprobleme der Cisplatin-basierten Chemotherapien bilden Chemoresistenzen der Krebszellen und Toxizität der Therapeutika bei ohnehin schlechtem Zustand der Patienten, der den Einsatz der Chemotherapie von vornherein verbietet [17].

Schlechte Nierenfunktion und hohes Alter sind die wichtigsten Gründe, aus denen bis zu 50% der Patienten eine Cisplatin-basierte Chemotherapie versagt wird [18]. Abgesehen von einigen mäßig erfolgreichen Zweitlinientherapien [19] hat sich wenig für die Patientengruppe mit metastasiertem Harnblasenkarzinom verbessert [20]. Sämtliche klinische Versuche mit zielgerichteten Therapien verliefen insgesamt enttäuschend [21] und führten nicht zur Zulassung neuer Therapeutika [22], bis die Immunevasion von Krebszellen als Angriffspunkt beim Harnblasenkarzinom in den Fokus rückte.

Hanahan und Weinberg haben wesentliche Kennzeichen von Krebszellen - *hallmarks of cancer* – postuliert [23]. Später haben sie weitere Kennzeichen ergänzt, insbesondere die Immunevasion von Krebszellen [24]. Ein Faktor dabei ist PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), ein Oberflächenprotein, das von den Krebszellen häufig verstärkt exprimiert wird. Es bindet an den PD-1 Rezeptor auf T-Zellen und verhindert so deren Aktivierung. Dadurch wird die adaptive Immunantwort gegenüber den Krebszellen geschwächt. Passend dazu weisen Tumoren mit hoher Expression von PD-L1 eine schlechtere Prognose auf [25]. Durch Blockade von PD-L1 mittels des monoklonalen Antikörpers Atezolizumab konnten starke Effekte auf verschiedene klinische Parameter beobachtet werden, insbesondere bei Patienten mit immunhistochemisch nachgewiesener, hoher Expression von PD-L1 durch Immunzellen im Tumorgewebe [26]. Dieser Erfolg hat das neue Feld der Immunmodulation beim Harnblasenkarzinom eröffnet. In der Folge wurden viele ähnliche Therapien erprobt [27]. Inzwischen wird die Immunmodulation als neue Erstlinientherapie anstelle der Cisplatin-basierten Chemotherapie bei fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom diskutiert, auch aufgrund der im Allgemeinen niedrigeren Toxizität und damit besseren Anwendbarkeit [28].

Die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten bei metastasiertem Harnblasenkarzinom durch Immunmodulation rechtfertigt die Anstrengungen bei der Erforschung neuer zielgerichteter Therapien für das Harnblasenkarzinom.

1.2 Molekulare Eigenschaften des Urothelkarzinoms

Im Rahmen großangelegter multinationaler Studien wurden Urothelkarzinome systematisch molekular charakterisiert [29-31]. In Anlehnung an den Übersichtsartikel von Knowles et al. 2015 [12] wird im Folgenden ein Überblick über die wesentlichen molekularen Veränderungen des Urothelkarzinoms gegeben.

1.2.1 Mutationsspektrum

Bei der Suche nach Mutationen ergaben sich durchschnittlich etwa 300 exonische Mutationen pro Tumorprobe. Nur Melanome und Lungenkarzinome übertreffen diese hohe Anzahl an Mutationen [12]. Den größten Teil der Mutationen machen Transitionen von C:G zu T:A aus [29]. Weil davon die meisten im Sequenzkontext TpC auftreten, liegt somit eine APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) -Signatur vor [30]. Zigarettenrauchen als wichtigster Risikofaktor für das Urothelkarzinom verursacht hingegen meistens Transversionen von C:G zu A:T und seltener Transitionen von C:G zu T:A, wobei die Tabakrauch-Signatur hier einen anderen Sequenzkontext aufweist [31]. Wahrscheinlich ist deshalb eher die Überexpression von APOBEC3B für die hohe Anzahl an Mutationen im Urothelkarzinom verantwortlich [32].

1.2.2 Wichtige Onkogene und Tumorsuppressoren

Genomische Instabilität charakterisiert vor allem das MIBC und in geringerem Umfange NMIBC [12]. Bedingt wird sie möglicherweise durch Mutationen in Genen, die bei der Chromosomenorganisation und -segregation (bspw. *STAG2* – *stromal antigen 2*) sowie bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen [12]. Beim MIBC führt die Instabilität regelmäßig zu Polyploidie. Sehr häufig von struktureller Instabilität betroffen ist Chromosom 9. Hier findet sich im Abschnitt 9p21 das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*), das u.a. für den Zellzyklusinhibitor p16^{INK4A} (*p16 Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4A*) sowie p14^{ARF} (*p14 Alternative Reading Frame*), einen Aktivator von p53, kodiert. In etwa 45% der Urothelkarzinome geht durch verschiedene Mechanismen (Deletionen, Chromosomenabbrüche, Verlust des gesamten Chromosoms) eines der Allele verloren, was in diesem Fall bereits ausreicht, um den Zellzyklus und damit die Proliferation zu beschleunigen (Haploinsuffizienz) [12].

Die Deregulation des Zellzyklus ist eine typische Eigenschaft des MIBC [12]. Nach Verlust von *CDKN2A* ist die Aktivität von Retinoblastomprotein pRb beeinträchtigt. Liegt kein Verlust von *CDKN2A* vor, kommt es manchmal (11-13%) zur inaktivierenden Mutation von *RBI* (*RB Transcriptional Corepressor 1*) [33] und zur kompensatorischen Überexpression von p16^{INK4A} und p14^{ARF} [12], die sozusagen „ins Leere läuft“. Der Verlust von *CDKN2A* und die inaktivierende Mutation von *Rbi* schließen einander aus, weil sie funktionell redundant zueinander sind [34]. Deshalb besteht eine inverse Korrelation zwischen der Expression von

p16^{INK4} und pRB1 [12]. Außerdem ist das Tumorsuppressorgen *TP53* (*tumor protein p53*) in bis zu 56% der MIBC durch Mutationen inaktiviert [33]. In weiteren 5% der MIBC ist das Gen *MDM2* (*Mouse Double Minute 2*) amplifiziert [33]. Es kodiert für die E3-Ubiquitinligase MDM2 mit dem Substrat p53, sodass p53 sekundär inaktiviert wird. Daher bleibt u.a. die Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 nach Genomschädigungen oder Induktion der replikativen Seneszenz aus. Des Weiteren ist das Gen *CCND1* (*Cyclin D1*) in etwa 20% der MIBC amplifiziert [33]. Cyclin D1 wird deshalb überexprimiert und führt zu einer Überaktivität der Cyclin-abhängigen Kinase CDK4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*) und so wiederum zur Inaktivierung von pRB1 durch Hyperphosphorylierung. Einer dieser vier Mechanismen – Verlust von *CDKN2A*, Mutation von *TP53* oder *RB1* sowie Amplifikation von *CCND1* – führt bei fast allen MIBC zu Deregulation des Zellzyklus [29].

Ein besonders häufig mutiertes Onkogen ist *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*). Die Mutation kommt in 80% der NMIBC, aber in nur 10% der MIBC vor [12]. Deswegen haben Tumoren mit *FGFR3*-Aktivierung eine bessere Prognose als Tumoren ohne solche [35]. *FGFR3* kodiert für die membranständige Rezeptortyrosinkinase *FGFR3*. Deren Ligand ist ein Fibroblasten-Wachstumsfaktor. Aktivierende Punktmutationen und verminderte Expression inaktivierender microRNAs führen zu vermehrter Expression von *FGFR3* mit konsekutiver Überaktivität des MAP-Kinase-Signalweges (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), der das Zellwachstum stimuliert [12]. Translokation von *FGFR3* mit Bildung überaktiver Fusionsproteine ist ein weiterer Mechanismus der *FGFR3*-Aktivierung [36].

Der PI3-Kinase (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase*) - und der MAP-Kinase-Signalweg sind im Urothelkarzinom häufig überaktiv [12]. Für die Überaktivität des MAP-Kinase-Signalweges sind nicht allein die *FGFR3*-Veränderungen verantwortlich. Stattdessen wird sie in manchen Urothelkarzinomen durch Mutationen in den *RAS* (*Rat Sarcoma*) -Genen [34, 37] sowie durch *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) -Überexpression hervorgerufen [38]. Die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs kann über *ERBB2* (*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*) -Amplifikation, aktivierende Punktmutationen von *ERBB3* und Überexpression von *EGFR* zustande kommen [33]. Die Genprodukte, allesamt Rezeptortyrosinkinasen, aktivieren direkt die PI3-Kinase. Häufig ist das Gen *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*), das für zentrale PI3-Kinase selbst kodiert, aktivierend mutiert [33]. Der Verlust von einem oder beiden Allelen von *PTEN* (*Phosphatase And Tensin Homolog*) [33] ist bedeutsam, weil die Phosphatase *PTEN* das vermehrt gebildete Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat wieder zu

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat umsetzen würde und sie damit der Aktivierung von AKT (*AKT Serine/Threonine Kinase 1/2/3*) als Effektor des Signalweges entgegenwirken würde. Die Expression von PTEN ist in etwa 50% der MIBC verändert [33]. Nach Inaktivierung von *PTEN* und *TP53* in Harnblasen von Mäusen entwickelten sich invasive Urothelkarzinome [39]. Allein die Inaktivierung von *TP53* und Überaktivität des PI3-Kinase-Signalweges können also im Tiermodell Urothelkarzinome auslösen [40]. Tatsächlich sind beide Veränderungen typisch für das *Carcinoma in situ*, das sich meistens zum MIBC entwickelt [10].

1.2.3 Veränderungen in der epigenetischen Regulation

Viele der oben beschriebenen molekularen Veränderungen waren länger bekannt, auch schon vor den neueren Studien mit Hochdurchsatzverfahren. Allerdings haben diese eine häufige, vorher wenig beachtete Eigenschaft von Urothelkarzinomen aufgedeckt: Mutationen in Genen epigenetischer Regulatoren [33, 41, 42]. Bevor näher auf diese Mutationen eingegangen wird, folgt zunächst eine allgemeine Einführung zur Epigenetik.

Die DNA-Doppelstränge sind in Chromatin organisiert [43]. Chromatin besteht aus der DNA selbst und spezialisierten Proteinen, den verschiedenen Histonen H1, H2A, H2B, H3 und H4. Je etwa 200 bp DNA sind fest um ein Oktamer aus je zwei H2A, H2B, H3 und H4 gewunden und bilden ein Nukleosom [44]. Sie werden getrennt durch 20–50 bp lange „*linker-DNA*“, an die H1 bindet [45]. Auf diese Weise zu Chromatin kondensierte DNA ist für Transkription schlecht zugänglich (Heterochromatin). Erst die Acetylierung als posttranslationale Modifikation (PTM) an den Lysin- und Arginin-Seitenketten der Histone schwächt die elektrostatische Anziehung zwischen DNA und Histonen ab, indem sie die positiven Ladungen neutralisiert. Hierbei wird das Chromatin strukturell aufgelockert und der Transkription zugänglich gemacht (Euchromatin). Neben der Acetylierung sind Mono-, Di-, und Tri-Methylierung der Lysin-Seitenketten Beispiele für Histon-PTM [46].

Eine Vielzahl verschiedener Enzyme vermitteln diese Histon-PTM, oft in gegenläufiger Weise: Histonacetyltransferasen (HAT) beispielsweise fügen Acetylgruppen an („*writers*“), während Histondeacetylasen vorhandene Acetylgruppen abspalten („*erasers*“). Dadurch ergibt sich ein Gleichgewicht, welches durch veränderte Aktivität einer der beiden Enzymgruppen verschoben werden kann [47]. Durch Verminderung einer Histon-PTM können Lysin-Seitenketten dem jeweiligen Gleichgewicht jedoch auch entzogen werden,

wenn fortan eine andere PTM angefügt wird. Histon-PTM konkurrieren also miteinander um freie Lysin-Seitenketten und bilden dadurch komplizierte, verzweigte Gleichgewichte [48].

Effektorproteine können mittels spezifischer Domänen direkt an die Histon-PTM binden: Bromodomänen ermöglichen es Proteinen, acetylierte Lysin-Seitenketten spezifisch zu binden („*readers*“) [49]. Das Bromodomänen enthaltende Protein BRD4 (*Bromodomain-Containing Protein 4*) wird für die effektive Elongation bei der Transkription benötigt [50]. Histon-PTM regulieren die Transkription von Genen also neben der Veränderung der Chromatinstruktur auch durch die Rekrutierung von Effektorproteinen wie Transkriptionsfaktoren, aber auch großer Multi-Protein-Komplexe, deren Zusammensetzung und Funktion vielfach noch unvollständig bekannt sind [51]. Des Weiteren erfordern DNA-Reparatur, Replikation und Rekombination die Regulation durch Histon-PTM [52]. Zusammengefasst werden diese Prozesse unter dem Begriff epigenetische Regulation, weil sie die Merkmalsausprägung in Organismen verändern können, ohne dabei die Sequenz der DNA zu verändern [53]. Auch DNA-Methylierung und einige nicht-kodierende RNAs tragen zu epigenetischer Regulation bei [54].

Gene epigenetischer Regulatoren sind im Urothelkarzinom überproportional häufig mutiert. Kettenabbruchs-Mutationen (*nonsense* oder *frameshift*) bestimmen das Mutationsmuster; doch kommen auch Missense-Punktmutationen vor. Sie führen zur Inaktivierung der betroffenen Gene. Daher sind die betroffenen epigenetischen Regulatoren am ehesten Tumorsuppressoren [41]. Häufig von Mutationen betroffen sind die Gene der Histondemethylasen *KDM6A*, *KDM6C* (*Lysine Demethylase 6A/C*), der Histonmethylasen *KMT2A*, *KMT2C*, *KMT2D* (*Lysine Methyltransferase 2A/C/D*), sowie von Proteinen der Chromatinremodellierung wie *ARID1A* (*AT-Rich Interaction Domain 1A*) sowie der Histonacetyltransferasen *CREBBP* (*CREB Binding Protein*) und *EP300* (*E1A Binding Protein P300*) [12].

Das häufig inaktivierte Gen *KDM6A* kodiert für die Histondemethylase UTX (*Ubiquitously-Transcribed TPR Protein on the X Chromosome*), welche die Histon-PTM H3K27me₃, die mit Repression der Transkription assoziiert ist, zu H3K27me₂ oder H3K27me demethyliert [55]. Gen-*Knockout* von UTX führt zu verstärkter Proliferation UTX-wildtypischer Urothelkarzinom-Zelllinien [56]. Also kommt es durch UTX-Inaktivierung am ehesten zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren. EZH2 (*Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) ist als Histonmethylase ein direkter Gegenspieler [57] und ist im

Urothelkarzinom häufig überexprimiert [58]. Verminderte Demethylierung durch Inaktivierung von UTX und verstärkte Methylierung von H3K27 durch EZH2 führen so zu einer besonders starken Repression von Tumorsuppressoren durch H3K27me3. EZH2-Inhibition hemmt Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) zwar generell [59], solche mit inaktivierenden Mutationen in *KDM6A* sind aber besonders empfindlich gegenüber EZH2-Inhibition [60]. Ähnliches wurde auch beim Multiplen Myelom beobachtet [61]. Hier handelt es sich also um ein therapeutisch angreifbares, verschobenes Gleichgewicht von Histon-PTM.

Auch bei der Histonacetylierung gibt es ein verschobenes Gleichgewicht durch zwei sich gleichgerichtet auswirkende Veränderungen. Einerseits sind die HAT CREBBP und EP300 häufig durch Mutationen inaktiviert [12]. Andererseits sind verschiedene HDAC im Urothelkarzinom überexprimiert [62, 63]. Deshalb könnte es zu besonders starker Hypoacetylierung der Histone kommen – einer Eigenschaft vieler Tumoren [64]. Umgekehrt weisen Tumoren mit stärkerer Acetylierung oft eine bessere Prognose auf. So korreliert die H4-Acetylierung in Blasten bei akuter lymphatischer Leukämie positiv mit dem Gesamtüberleben [65]. Inhibition der HDAC - pharmakologisch oder durch Gen-*Knockdown* - führt zur Re-Expression von Tumorsuppressoren. Die Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{CIP1} (*p21 CDK-Interaction Protein 1*) durch HDAC-Inhibitoren ist ein gut charakterisiertes Beispiel [66]. Insgesamt kann die HDAC-Inhibition Einfluss auf Zellzyklusderegulation, Apoptoseresistenz, Immunevasion, Autophagie, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren [67] – allesamt *hallmarks of cancer* [24] – nehmen. Bei einigen hämatologischen Neoplasien sind HDAC-Inhibitoren bereits als Therapieoption zugelassen [68, 69]. Für das Urothelkarzinom erscheint HDAC-Inhibition wegen der oben genannten molekularen Veränderungen der epigenetischen Regulatoren ebenfalls vielversprechend.

1.3 Histondeacetylasen

Im Folgenden soll ein Überblick über wichtige Aspekte der HDAC allgemein und in Bezug auf Inhibitoren gezeichnet werden. Als Grundlage dienen die Übersichtsartikel von Seto et al. 2014 [70], de Ruijter et al. 2003 [71], Yang et al. 2008 [72], Moser et al. 2014 [73] und Delcuve et al. 2012 [74].

1.3.1 Einteilung

HDAC werden phylogenetisch nach Übereinstimmung der Sequenz mit Genen von *Saccharomyces cerevisiae* in Klassen eingeteilt. Sie werden ferner chronologisch nach dem

Zeitpunkt ihrer Entdeckung benannt. Es resultieren vier verschiedene Klassen: HDAC1-3 und 8 gehören zu Klasse I (ortholog zu *Rpd3*); HDAC4-7, 9 und 10 gehören zu Klasse II (ortholog zu *Hda1*); SIRT1-7 (*Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog*) gehören zu Klasse III (ortholog zu *Sir2*) und HDAC11 gehört zu Klasse IV (ortholog zu *Rpd3* und *Hda1*). HDAC der Klassen I, II und IV sind klassische HDAC, weil die Katalyse der Lysin-Deacetylierung von einem Zn^{2+} -Ion abhängig ist. Die Sirtuine in Klasse III hingegen verbrauchen bei der Deacetylierung NAD^+ (Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid) [70].

Klasse I ist für diese Arbeit die entscheidende, weil der verwendete HDAC-Inhibitor Romidepsin vorwiegend auf die Aktivität dieser HDAC wirkt [75].

1.3.2 Lokalisation und Struktur

Die Aminosäuresequenzen aller Klasse-I-HDAC beinhalten ein *nuclear localization signal* (NLS). Daher befinden sich Klasse-I-HDAC im Zellkern. HDAC3 besitzt auch ein *nuclear export signal* (NES), sodass das Protein auch im Zytoplasma lokalisiert vorliegen kann. HDAC8 wird, anders als HDAC1-3, in vielen Zellen kaum exprimiert [71]. Am Aminoterminus befinden sich die Deacetylaseaktivität vermittelnden Proteindomänen. Carboxyterminal liegen zwei (HDAC1,2) bzw. eine (HDAC3) CK2 (*Casein Kinase 2*) - Phosphorylierungsstellen. HDAC8 besitzt eine PKA (*Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Alpha*)-Phosphorylierungsstelle am Aminoterminus [72].

1.3.3 Katalytischer Mechanismus der Deacetylierung

Für HDAC8 wurde der Mechanismus der Lysin-Deacetylierung am besten untersucht. Ein Zn^{2+} -Ion ist dort im katalytischen Zentrum an Aminosäuren-Seitenketten und H_2O koordinativ gebunden. Für den genauen Ablauf der Reaktion in Bezug auf beteiligte Aminosäuren-Seitenketten gibt es verschiedenste Theorien. Entscheidend ist jedoch der nukleophile Angriff des H_2O -Moleküls auf die durch das Zn^{2+} -Ion polarisierte Carbonylgruppe des Substrats Acetyllysin. So entstehen durch Hydrolyse Lysin und Acetat [76].

1.3.4 Regulation der Aktivität durch Komplexbildung und PTM

Im Zellkern liegen Klasse-I-HDAC meist in Komplexen mit anderen Proteinen vor. HDAC8 liegt häufig als Homodimer vor. Erst durch solche Interaktionen kommt es zu stärkerer enzymatischer Aktivität. Komplexe mit anderen Proteinen sind aber bei HDAC8 für die

Deacetylierung nicht erforderlich. HDAC3 hingegen bildet kleine Komplexe mit verschiedenen Proteinen aus und kann die Aktivität von Klasse-II-HDAC (HDAC4, 5, 7) verstärken [73]. Die stark homologen HDAC1 und HDAC2 liegen meist als Homo- oder Heterodimere vor. Diese sind ihrerseits Bestandteile verschiedener Multi-Protein-Komplexe, die sich zelltypspezifisch unterschiedlich zusammensetzen und die Aktivität der Dimere zusätzlich modulieren können. Im Folgenden werden die drei wichtigsten Komplexe mit HDAC1 und HDAC2 beschrieben [74].

Der Sin3 (*Switch independent 3*) -Komplex besteht aus den transkriptionellen Repressoren Sin3A/B (*Sin3 transcription regulator family member A/B*), einem Dimer aus HDAC1 und oder HDAC2, den Histon-bindenden Proteinen RbAp46 (*Rb-associated protein 46*) und RbAp48 (*Rb-associated protein 46*) und den assoziierten Proteinen SAP18 (*Sin3A Associated Protein 18*) und SAP30 (*Sin3A Associated Protein 30*). Er fungiert als Bindepartner für andere epigenetisch wirksame Enzyme, wie DNA-Methylasen, Histon-Methylasen und Nukleosomen-Remodellierer [74].

Der NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) -Komplex vereint zwei verschiedene epigenetische Aktivitäten. Zum einen weist auch er Deacetylase-Aktivität durch HDAC1- und oder HDAC2-Dimere auf. Hinzu kommt aber auch die Chromatin-remodellierende Aktivität der ATP-abhängigen DNA-Helicasen Mi-2 α (*CHD3, Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3*) und oder Mi-2 β . Außerdem sind RbAp46 und RbAp48, die reprimierenden Zinkfingerproteine p66 α (*GATAD2A, GATA Zinc Finger Domain Containing Protein 2A*) und p66 β (*GATAD2B, GATA Zinc Finger Domain Containing Protein 2B*), die methylierte DNA bindenden Proteine MBD2 (*Methyl-CpG-binding Domain Protein 2*) oder MBD3 (*Methyl-CpG-binding Domain Protein 3*), Proteine der MTA-Familie (Metastasis associated gene 1/2/3) und die Histon-Demethylase LSD1 (*Lysine-specific Demethylase 1*) Bestandteile des NuRD-Komplexes [74].

Im CoREST (*Corepressor RE1 Silencing Transcription Factor*) -Komplex dient das Protein CoRest als Adapter und reprimiert die Transkription. Zusätzlich zur Deacetylierung wird durch die ebenfalls im Komplex vorkommende LSD1 H3K4me2 zu H3K4me1 demethyliert, was zusätzlich reprimierend wirkt. Allerdings kann der CoREST-Komplex abhängig vom zellulären Kontext sowohl reprimierend als auch aktivierend auf die Transkription wirken [74].

Neben solcher Komplexbildung spielen bei der Regulation der Klasse-I-HDAC auch andere Mechanismen eine Rolle. Inositol-tetrakisphosphat (IP₄) ist beispielsweise ein allosterischer Aktivator verschiedenster HDAC-Komplexe [77]. Auch die PTM Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, Nitrosylierung und Carbonylierung regulieren die Aktivität der HDAC [78]. So fördert die Phosphorylierung von HDAC1 sowohl die enzymatische Aktivität als auch die Komplexbildung [79]. HDAC2 muss in phosphorylierter Form vorliegen, um Komplexe eingehen zu können [74].

1.3.5 Allgemeine Funktionen

HDAC-ähnliche Vorläufer kommen schon in Prokaryoten vor, obwohl diese keine Histone besitzen. Phylogenetisch dienten HDAC zunächst also am ehesten der Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen [80].

In menschlichen Zellen ist Acetylierung auch abgesehen von Histonen eine häufige PTM von Proteinen. Durch HDAC-Inhibition konnte eine Zunahme dieser Acetylierung beobachtet werden. Folglich sind HDAC auch in Eukaryoten an der Regulation der Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen beteiligt. Solche differentiell acetylierten Proteine kommen im Rahmen unterschiedlicher zellulärer Prozesse vor – von Struktur- bis hin zu DNA-Reparaturproteinen [73]. Selbst Tumorsuppressoren können durch Acetylierung reguliert werden. In Neuronen führt HDAC-Inhibition beispielsweise zu vermehrter Acetylierung von p53. Dadurch kann p53 nicht als Transkriptionsfaktor für das proapoptotische Gen *BBC3* (*BCL-2 Binding Component 3*) wirken, sodass die Induktion der Apoptose durch p53 abgeschwächt wird [81].

Außerdem sind Klasse-I-HDAC an zellulären Prozessen wie Spleißen, DNA-Reparatur, Replikation sowie Mitose und Meiose beteiligt [73].

Die zentrale Funktion der Klasse-I-HDAC ist jedoch die Deacetylierung der Histone, die auf die Transkription von Genen Einfluss nimmt. Den einzelnen HDAC bestimmte Substrate spezifisch zuzuordnen ist schwierig, weil sie teils redundante Funktionen ausüben und daher einander nach spezifischem *Knockdown* kompensieren. Auch Versuche *in vitro*, bei denen die Aktivität einzelner HDAC untersucht wird, haben nur eine geringe Aussagekraft für die Substratspezifität *in vivo*, weil die Komplexbildung hierbei außer Acht gelassen wird, obwohl diese für die HDAC-Funktion zentral ist. Deswegen widersprechen Studien zur

Substratspezifität der Klasse-I-HDAC einander häufig, wodurch ein uneinheitliches Bild entsteht [70].

Hypoacetylierte Bereiche sind – u. A. wegen der stärkeren elektrostatischen Anziehung zwischen Histonen und DNA – für Transkription schlecht zugänglich. Ursprünglich wurde die Repression der Transkription durch HDAC daher einzig durch die Deacetylierung erklärt. Als Partner der HDAC in oben beschriebenen Komplexen wurden jedoch Repressoren der Transkription identifiziert. Klasse-I-HDAC-Mutanten ohne Deacetylase-Aktivität wirkten in Versuchen deshalb trotzdem reprimierend auf die Transkription [70, 82]. Aktuell wird ein dynamisches Modell postuliert, bei dem sich HDAC an inaktivierte Gene binden und die Transkription unterdrücken. Regelmäßig werden sie dabei durch HAT ersetzt, wenn die Transkription stattfindet. Aber auch dieses Modell wird nicht allen Studienergebnissen gerecht, denn Wang et al. [83] lokalisierten HDAC vornehmlich bei aktiven und nicht bei inaktiven Genen [70, 83]. Des Weiteren kam es in einer Studie von Bhaskara et al. [84] nach *HDAC3-knockout* zu veränderter Expression vieler Gene in beide Richtungen [70, 84]. Daher wird den HDAC neben Repression auch Aktivierung der Transkription zugeschrieben. Es bleibt aber unklar, ob diese Aktivierung durch einen eigenen epigenetischen Mechanismus oder durch Repression von Genen, die ihrerseits transkriptionshemmend wirken, hervorgerufen wird [70].

Bei gleichzeitigem Gen-*knockdown* bzw. -*knockout* der stark homologen HDAC1 und 2 in einem breiten Spektrum von Zellmodellen konnten DNA-Schäden und chromosomale Veränderungen, gefolgt von Apoptose, beobachtet werden [73, 85-88]. Der gleichzeitige Verlust von HDAC1 und 2 kann also nicht ausreichend durch andere HDAC kompensiert werden. Darin könnte einer der Mechanismen liegen, wie HDAC-Inhibitoren antineoplastische Effekte auf Krebszellen ausüben [73].

1.3.6 Rolle der HDAC bei Karzinogenese und Tumorprogression

Klasse-I-HDAC liegen in vielen hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren überexprimiert vor. Die Überexpression ist meistens mit schlechterer Prognose assoziiert [89]. Je weiter dabei die maligne Transformation fortgeschritten ist, desto stärker wird die Expression der Klasse-I-HDAC [90].

Fraga et al. [64] beschrieben als Erste die Histon-Hypoacetylierung vieler Krebszelllinien, aber auch hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren. Insbesondere die Acetylierung

von H4K16 geht in Krebszellen verloren. Sie kann bereits in papillären Vorläuferläsionen von Tumoren nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Beteiligung bei der Karzinogenese hinweist.

1.3.7 Pharmakologische HDAC-Inhibition

HDAC-Inhibitoren werden für die Behandlung vieler Erkrankungen erforscht. Dazu zählen neben Krebserkrankungen auch kardiovaskuläre, neurodegenerative, Autoimmun- und Infektionserkrankungen (HIV). Am intensivsten wurde aber im Bereich der Krebserkrankungen geforscht, sodass inzwischen vier HDAC-Inhibitoren durch die US-Arzneimittelzulassungsbehörde *Food and Drug Administration* (FDA) zur Behandlung des Multiplen Myeloms und seltenerer Lymphome zugelassen sind [91].

Nach ihrer chemischen Struktur lassen sich HDAC-Inhibitoren in Hydroxamsäure-Derivate und Nicht-Hydroxamsäure-Derivate (zyklische Peptide, Benzamide u.a.) einteilen. Außerdem unterscheiden sich HDAC-Inhibitoren in ihrer Spezifität für einzelne HDAC – von Inhibition einzelner bis hin zur Inhibition aller HDAC der Klassen I, II und IV. Manche HDAC-Inhibitoren sind bereits im nanomolaren Bereich aktiv, andere erst im millimolaren Bereich [92].

Das Pharmakophor der Hydroxamsäure-Derivate beinhaltet eine Zink-bindende, eine Verbindungs- (*linker-*) und eine *Cap*-Domäne. Durch die Zink-bindende Domäne wird das Zn^{2+} -Ion im enzymatisch aktiven Zentrum der HDAC koordinativ gebunden, sodass die Deacetylierung gehemmt wird [92, 93]. Die Verbindungs- und *Cap*-Domänen entscheiden über den räumlichen Zugang des Moleküls zum enzymatisch aktiven Zentrum der HDAC. Da sich HDAC hier in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden, können durch Modifikation dieser Domänen unterschiedliche Spezifitäten für verschiedene HDAC erreicht werden [94].

1.3.8 Antineoplastische Effekte der HDAC-Inhibition

HDAC-Inhibitoren wirken sich auf vielfältige Weise zellulär aus [68].

Apoptose

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose können durch HDAC-Inhibitoren eingeleitet werden. Gen-*Knockdown* der extrinsischen Apoptose-Aktivatoren FAS (*Fas Cell Surface Death Receptor*) und TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand TRAIL*) führte zu verringerter Apoptose nach HDAC-Inhibition *in vivo* [68, 95]. Häufig

werden durch HDAC-Inhibitoren auch Mitglieder der BCL-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*) dereguliert. Zum einen werden proapoptotische Regulatoren wie BAX (*BCL-2 Associated X*) und BAK (*BCL-2 Antagonist/Killer 1*) induziert [96] und zum anderen antiapoptotische Regulatoren wie BCL-2 und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) reprimiert [97, 98]. Dadurch wird der intrinsische Weg der Apoptose ausgelöst [68]. Die Repression der antiapoptotischen Regulatoren ist ein Beispiel für die eigentlich unerwartete Repression von Genen nach HDAC-Inhibition.

Zellzyklus

HDAC-Inhibitoren induzieren Zellzyklusarrest auf verschiedenen Ebenen. Am bekanntesten ist die Induktion des CDK-Inhibitors p21^{CIP1} [66]. Dieser verhindert kompetitiv die Dimerisierung von Zyklinen mit Zyklin-abhängigen Kinasen, sodass diese inaktiviert werden. Daraus folgt geringere Phosphorylierung von RB1 und damit eine stärkere, inaktivierende Dimerisierung von RB1 mit Transkriptionsfaktoren der E2F (*E2 Transcription Factor*) - Familie, deren Zielgene für die Proliferation notwendig sind [68]. Zusätzlich werden die beteiligten Zykline durch HDAC-Inhibitoren reprimiert [68, 99]. Übergeordnet wird der Tumorsuppressor p53 nach HDAC-Inhibition durch Acetylierung aktiviert und induziert seinerseits CDK-Inhibitoren [68, 81].

Immunmodulation

In mehreren Studien wurde vermehrte Expression der MHC (*Major histocompatibility complex*) -Moleküle und ihrer costimulatorischen Proteine nach HDAC-Inhibition festgestellt [68, 100]. Des Weiteren werden durch HDAC-Inhibition immunogene Neoantigene induziert, die T-Zellen über MHC-Moleküle präsentiert werden können [101]. *In vivo* kann dadurch möglicherweise ein verstärktes Ansprechen des Immunsystems auf die Tumorzellen erreicht werden [68].

Angiogenese und Metastasierung

Durch Repression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und vermehrten Abbau von HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) wird die Angiogenese nach HDAC-Inhibition gehemmt [68, 102, 103]. Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumoren. Manche Krebszelllinien entwickeln jedoch nach HDAC-Inhibition einen Phänotyp, der Metastasierung begünstigen könnte. Einige Matrix-Metalloproteasen etwa

werden durch HDAC-Inhibition induziert [68, 104]. Hier verdeutlicht sich ein mögliches proneoplastisches Potential der HDAC-Inhibitoren.

Außerdem beeinflussen HDAC-Inhibitoren die Expression von nicht-kodierenden RNAs, die Differenzierung von Krebsstammzellen, die Induktion von Autophagie und die Aktivität von Signalwegen, wie z.B. des MAP-Kinase- und des Wnt (*Wingless*)-Signalwegs [68].

HDAC-Inhibitoren nehmen folglich Einfluss auf viele wesentliche Kennzeichen von Krebszellen [24], insbesondere auch auf die oben beschriebenen, für das Urothelkarzinom typischen, molekularen Veränderungen.

Halsall et al. [105] diskutieren die auffallend stark variierende Sensitivität unter Tumorentitäten vor dem Hintergrund der biologischen Rolle von HDAC-Inhibitoren, die häufig von Bakterien synthetisiert werden, um Eukaryoten zu bekämpfen. Sie postulieren die Existenz eines Resistenzmechanismus, der Eukaryoten vor der resultierenden Hyperacetylierung durch Inaktivierung acetylierender Enzyme schützen müsse. Dieser Mechanismus sei in manchen Tumoren durch Mutation der beteiligten Gene unterdrückt und führe so zu besonders starkem Ansprechen auf HDAC-Inhibition. Daraus schlussfolgern sie die Möglichkeit für Kombinationstherapien mit HDAC-Inhibitoren, die diesen Resistenzmechanismus hemmen.

1.3.9 Stand der HDAC-Inhibitoren in der Krebstherapie

Vorinostat (SAHA) ist ein Vertreter der Hydroxamsäure-Derivate und inhibiert als Pan-Inhibitor die HDAC der Klasse I, II und IV. Zugelassen ist Vorinostat zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms [91]. Belinostat und Panobinostat sind ebenfalls Hydroxamsäure-Derivate und zur Behandlung des Multiplen Myeloms bzw. des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen [91]. In einer klinischen Studie mit Vorinostat konnten keine Effekte bei Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom festgestellt werden. Daher musste die Studie abgebrochen werden [106]. Des Weiteren zeigte sich in zwei klinischen Studien bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom ausgeprägte Toxizität bei Einzelanwendung von Vorinostat nach vorheriger konventioneller Chemotherapie [107] und besonders starke Toxizität bei Kombination mit Chemotherapie [108].

Romidepsin (Istodax) ist ein Depsipeptid und Naturstoff, der durch *Chromobacterium violaceum* gebildet wird [109]. Als Prodrug muss es *in vivo* zunächst durch die Glutathion-Reduktase aktiviert werden [110]. Unter den Klasse-I-HDAC inhibiert es insbesondere

HDAC1 und 2 schon im nanomolaren Bereich. Zugelassen ist es zur Behandlung des kutanen und peripheren T-Zell-Lymphoms [91]. Die Toxizität erscheint etwas niedriger als bei Vorinostat. Die wichtigsten Nebenwirkungen bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom sind Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Thrombozytopenie, Neutropenie und EKG-Veränderungen (Verlängerung der QT-Zeit), die aber ohne strukturelle Schäden am Herz auftreten, möglicherweise aber selten zu plötzlichem Herztod führen könnten. Insgesamt treten diese unerwünschten Nebenwirkungen zwar häufig auf, machen aber nur selten Therapieabbrüche nötig [111].

Zusammengefasst sind HDAC-Inhibitoren also erfolgreiche zielgerichtete Therapeutika für hämatologische Neoplasien. Auch bei soliden Tumoren zeigten sich in präklinischen Studien antineoplastische Effekte. Die Aktivität gegen solide Tumoren *in vivo* hat sich in klinischen Studien aber als schwach herausgestellt [112]. Spezifische Inhibition einzelner statt breiter Inhibition vieler HDAC gilt als möglicher Ausweg um auch in soliden Tumoren antineoplastische Effekte zu erreichen und die Toxizität zu begrenzen [113].

1.3.10 HDAC als therapeutische Ziele im Urothelkarzinom

Die Rolle der HDAC im Urothelkarzinom wird durch die Arbeitsgruppe seit mehr als fünf Jahren systematisch untersucht. Im Vordergrund steht dabei, ob sich HDAC-Inhibitoren für die Behandlung des Urothelkarzinoms eignen. Ebenso soll die Rolle der HDAC bei Karzinogenese und Tumorprogression im Urothelkarzinom untersucht werden. Insbesondere soll auch evaluiert werden bei welchen HDAC durch selektive Inhibition antineoplastische Effekte entstehen, weil sich HDAC in Struktur und Funktion stark unterscheiden. Vor diesem Hintergrund ist auch eine wachstumsfördernde Wirkung durch Inhibition einzelner HDAC denkbar. Daher könnte die gleichzeitige (Pan-)Inhibition mehrerer HDAC-Klassen gemischte statt gleichgerichteter Effekte erzielen. Folglich könnte die gezielte Inhibition einzelner HDAC anstelle der Pan-Inhibition durch Vorinostat mit Blick auf neue Therapieansätze vorteilhaft sein.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden einzelne HDAC und deren Kombinationen durch Gen-*Knockdown* mittels siRNA (*small interfering RNA*) herunterreguliert, um die Funktion einzelner HDAC für das Urothelkarzinom zu untersuchen. Außerdem wurden unterschiedlich HDAC-Inhibitoren *in vitro* charakterisiert, um so Kandidaten für spätere *in vivo*-Versuche zu identifizieren. Um Unterschiede spezifischerer HDAC-Inhibitoren gegenüber weniger spezifischeren herauszustellen, wurde bei den meisten Experimenten zum

Vergleich eine Kontrolle mit Vorinostat (SAHA) mitgeführt. Durch Überexpression der entsprechend inhibierten HDAC soll außerdem die Spezifität der Inhibitoren überprüft werden („*rescue experiment*“). Des Weiteren werden die Auswirkungen der Inhibitoren auf Signalwegaktivitäten, Zelltodmechanismen und den Zellzyklus analysiert.

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der einzelnen Unterprojekte zusammengefasst werden, da sie den Ausgangspunkt für diese Arbeit darstellen.

Niegisch et al. [63] untersuchten zunächst die mRNA-Expression der HDAC in einem heterogenen Satz von Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC). Verglichen mit der Expression in normalen uroepithelialen Zellen stellten sich HDAC2 und 8 als Mitglieder der Klasse I überwiegend erhöht und HDAC 4, 5 und 7 als Mitglieder der Klasse II mehrheitlich erniedrigt exprimiert dar. Auch in einer kleinen Serie von Urothelkarzinom-Tumorproben lag die HDAC8 mRNA überexprimiert vor. Eine signifikante Überexpression von HDAC2 und 3 konnte in diesen Proben jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Tendenzen der Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene entsprachen nur teilweise denen auf Protein-Ebene: nur die verminderte Expression von HDAC4 und 7 bestätigte sich hier. Insgesamt ergab sich ein uneinheitliches Bild der Expression der HDAC im Urothelkarzinom, wobei Klasse-I-HDAC eher überexprimiert und Klasse-II-HDAC eher vermindert exprimiert erschienen. UCC mit unterschiedlicher Zugehörigkeit zum mesenchymalen oder epithelialen Phänotyp wurden dann mit Vorinostat behandelt. Die Viabilität der UCC reduzierte sich dosisabhängig mit einem IC_{50} (mittlere halbmaximal inhibitorische Konzentration) im einstelligen mikromolaren Konzentrationsbereich. Western-Blot-Analysen ergaben eine Induktion von $p21^{CIP1}$ nach Behandlung mit Vorinostat. Ebenso konsistent waren die Auswirkungen auf den Zellzyklus. Einerseits bildeten sich subG1 (subGap-1) -Fraktionen als Anzeichen für den Zelltod aus. Des Weiteren kam es zur Akkumulation von Zellen in der G2/M (Gap-2/Mitose) -Phase, während die Zahl der Zellen in der S (DNA-Synthese) -Phase sank. Insgesamt ergaben sich durch diese Studie erste Hinweise auf die antineoplastischen Wirkungen von HDAC-Inhibition auf UCC.

Auf der Basis dieser Ergebnisse betrachteten Lehmann et al. [114] dann in ihrer Studie dezidiert HDAC8 als Zielmolekül. Hierzu wurde zuerst ein siRNA-vermittelter *Knockdown* der HDAC8-mRNA in verschiedenen UCC erzielt. So behandelte Zellen wiesen eine verminderte Viabilität auf und die Fähigkeit bei geringer Zelldichte klonal zu wachsen (Klonogenität) war nach Behandlung schwächer. Versuche mit mehreren HDAC8-

spezifischen Hydroxamsäure-Derivaten ergaben ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der Viabilität mit höherer Sensitivität bei den epithelial differenzierten, verglichen mit den mesenchymal differenzierten UCC, obwohl die epithelial differenzierten UCC eine geringere HDAC8-Expression aufwiesen. Die Effekte waren jedoch schwach ausgeprägt und kamen erst bei Konzentrationen $>10 \mu\text{M}$ zum Tragen. Weiterhin wurden die Effekte auf die Histon- und α -Tubulin-Acetylierung mittels Western-Blot-Analyse gemessen. Pharmakologische Inhibition und *Knockdown* von HDAC8 führten beide nicht zu Veränderungen der Acetylierung von Histon H3 und H4. Die Acetylierung des zytoplasmatisch lokalisierten α -Tubulin jedoch stieg nach beiden Versuchen an. Daher wurde für HDAC8 eine untergeordnete Rolle bei der Histonacetylierung postuliert. Messungen der mRNA-Expression von HDAC1, 2 und 3 schlossen eine Kompensation für HDAC8 durch Überexpression dieser anderen Mitglieder der Klasse-I aus. Insgesamt konnte die Studie HDAC8 als geeignetes Zielmolekül weitgehend ausschließen.

Kaletsch et al. [115] gingen der Frage nach, ob HDAC4 und 5 geeignete Zielmoleküle sind. Hierzu bedienten sie sich des mutmaßlich HDAC4 und 5-spezifischen Inhibitors 19i (Hydroxamsäure). Dieser Inhibitor führte zu sehr ähnlichen zellulären Effekten wie Vorinostat, wenn auch bereits bei niedrigeren Konzentrationen. Mittels eines lentiviral transduzierten HDAC4-Expressionskonstrukts wurden stabil HDAC4 überexprimierende UCC generiert. Diese waren entgegen der Erwartungen nicht weniger sensibel gegenüber der Behandlung mit dem HDAC4-Inhibitor 19i. Dies warf die Frage auf, ob 19i HDAC4-spezifische Inhibition vermittelt. Bei einer wiederholten Evaluation der *in vitro*-Inhibitor Aktivität wurden dann nur schwache Aktivitäten von 19i gegenüber HDAC4 und 5, aber starke Aktivität gegenüber HDAC1, 2, 3, 6, 8 und 10 festgestellt. Dies lässt sich als Grund für die Ähnlichkeiten der beobachteten Effekte mit denen von Vorinostat interpretieren. Der Inhibitor TMP269 (ein Benzamid) erwies sich in der *in vitro*-Analyse demgegenüber als hochspezifisch für die Klasse-IIA HDAC4, 5, 7 und 9. Die Effekte von TMP269 auf UCC waren aber schwach ausgeprägt mit IC_{50} -Werten im hohen zweistelligen mikromolaren Konzentrationsbereich. Des Weiteren wurden Kontrollzellen stärker in ihrem Wachstum beeinträchtigt als die UCC. Daher konnten Klasse-II-HDAC als Zielmoleküle weitgehend ausgeschlossen werden, weil weder deren pharmakologische Inhibition noch die Überexpression von HDAC4 ausgeprägte Effekte auf das Wachstum von UCC entwickelten.

Eine weitere Studie von Rosik et al. [116] beschäftigte sich mit der Evaluation von HDAC6 als Zielmolekül. Dazu wurden UCC mit den HDAC6-spezifischen Inhibitoren Tubacin,

Tubastatin A und ST-80 behandelt. Obwohl eine signifikante Überexpression der HDAC6-mRNA in einem Satz von Urothelkarzinom-Tumorproben nachgewiesen werden konnte, war der Effekt der Inhibitoren auf UCC gering. Die Viabilität verringerte sich nach Behandlung mit Tubacin und Tubastatin A bei hohen mikromolaren Konzentrationen und wurde durch ST-80 kaum beeinflusst. In Kombination mit verschiedenen anderen Inhibitoren konnten keine synergistischen Effekte beobachtet werden. Die Acetylierung von α -Tubulin nahm erwartungsgemäß nach Behandlung zu. Das HDAC6-Knockdown wirkte sich nicht signifikant auf die Viabilität der Zellen aus. Man schlussfolgerte daraus ein von HDAC6 unabhängiges Wachstum von UCC. Die antineoplastischen Effekte der HDAC6-Inhibition beschränkten sich auf eine moderate Hemmung der Zellmotilität. So wurde auch HDAC6 als sinnvolles Zielmolekül für die Behandlung des Urothelkarzinoms ausgeschlossen.

Pinkerneil et al. [117] widmeten sich in ihrer Studie mit HDAC1 und 2 zwei weiteren Mitgliedern der Klasse-I-HDAC. Der kombinierte HDAC1 und 2-Knockdown führte zu deutlich stärkerer Inhibition der Viabilität und Klonogenität von UCC verglichen mit dem Knockdown der einzelnen Proteine. Bei Knockdown nur einer der beiden stellte man in der Western-Blot-Analyse eine Überexpression der jeweils anderen fest. Dies spiegelt den bekannten Kompensationsmechanismus wider, der durch den kombinierten Knockdown offenbar umgangen wurde. So konnte nur nach kombiniertem Knockdown eine proteolytische Spaltung der (Initiator-)Caspase-8 und der (Effektor-)Caspase-3 mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Auch die Induktion von p21^{CIP1} und das Auftreten einer subG1-Fraktion im Zellzyklusprofil waren besonders nach kombiniertem Knockdown ausgeprägt. Außerdem wurde die Wirkung der Klasse-I-HDAC-spezifischen Inhibitoren Romidepsin (zyklisches Peptid), Givinostat (Hydroxamsäure), Entinostat und Mocetinostat (beides Benzamide) auf UCC untersucht. Alle getesteten UCC waren bei Viabilität und Klonogenität sensitiv gegenüber der pharmakologischen Inhibition. Die Inhibitoren waren im Vergleich wirksamer als Vorinostat. HBLAK-Zellen, die als spontan immortalisierte Urothelzellen mit typischen molekularen Eigenschaften früher Urothelkarzinome beschrieben wurden [118], genetisch immortalisierte normale Urothelzellen TERT-NHUC [119] und viral immortalisierte menschliche embryonale Nierenzellen HEK-293 dienten hier als Kontrollzellen. Zwar wirkten sich die Inhibitoren stärker auf die Viabilität der Kontrollzellen verglichen mit den UCC aus. Die Klonogenität wurde aber bei allen UCC stark gehemmt, während sie sich bei den Kontrollzellen weniger veränderte. Dieser Unterschied trat nicht beim Pan-Inhibitor Vorinostat auf, bei dem die Reduktion der Klonogenität der Kontrollzellen

teils stärker war als bei den UCC. Die pharmakologische Inhibition der Klasse-I-HDAC wirkte sich in vielerlei Hinsicht verschieden zum *Knockdown* aus. Zum einen führte die pharmakologische Inhibition zu starker Hyperacetylierung der Histone H3 und H4, während der *Knockdown* eine vergleichsweise geringere Steigerung der Acetylierung einzig von H3 bewirkte. Zum anderen unterschieden sich die Zelltodmechanismen. Nach *Knockdown* kam es vorrangig zu Apoptose ohne Zellzyklusveränderungen. Die pharmakologische Inhibition hingegen bewirkte massive Zellzyklusveränderungen, zunächst mit G2/M-Akkumulation und Zellzyklusarrest und später mit einem irregulären Zellzyklusprofil. Des Weiteren konnte hier keine proteolytische Spaltung der Caspase-3 nachgewiesen werden. Daher wurde für die pharmakologische Inhibition ein nicht-apoptotischer Zelltodmechanismus als Folge der Zellzyklusstörung angenommen. Mittels cDNA-Microarray wurden dann die Veränderungen der mRNA-Expression durch pharmakologische Inhibition mit Romidepsin und Givinostat und durch *Knockdown* in zwei UCC miteinander verglichen. Jeweils mehrere tausend verschiedene Gene lagen nach pharmakologischer Inhibition bzw. *Knockdown* signifikant differentiell exprimiert vor. Unter den stets gleichsam veränderten Genen fand sich erwartungsgemäß p21^{CIP1}. Nach dem *Knockdown* waren viele an der Zelltodregulation beteiligte Gene differentiell exprimiert. Bei der pharmakologischen Inhibition hingegen gehörten besonders Regulatoren der Replikation und der Mitose zu den häufig differentiell exprimierten Genen. Dies wurde als mögliche Ursache für die Unterschiede bei den Zelltodmechanismen interpretiert.

In einer weiteren Studie von Pinkerneil et al. [120] wurde der neue Klasse-I-HDAC Inhibitor 4SC-202 (Benzamid) untersucht, der neben HDAC1 und 2 auch HDAC3 und LSD1 inhibiert. Ähnlich wie Romidepsin und Givinostat erwies sich 4SC-202 als effizienter verglichen mit Vorinostat. Auch hier kam es zu vorwiegend nicht-apoptotischem Zelltod und Zellzyklusveränderungen, die den oben beschriebenen sehr ähnelten.

Zusammenfassend haben die Studien HDAC1 und 2 als vielversprechende Zielmoleküle für die Therapie des Urothelkarzinoms identifiziert. Dabei kam es teils bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich zu antineoplastischen Wirkungen der Inhibitoren. Des Weiteren ergaben sich Hinweise für bessere Tumorspezifität der Inhibitoren, verglichen mit Vorinostat – sofern diese *in vitro* ausreichend beurteilt werden kann.

1.4 BET-Proteine

1.4.1 Bromodomänen und Bromodomänen-enhaltende Proteine

Die Bromodomäne wurde zuerst 1992 von Haynes et al [121] im Protein des Gens *brahma* von *Drosophila melanogaster* beschrieben. Bromodomänen sind evolutionär stark konservierte Proteindomänen. Sie ermöglichen die spezifische Bindung von Proteinen an acetylierte Lysin-Seitenketten. Die Lysin-Acetylierung als posttranslationale Modifikation konnte ihrerseits in einer Studie an mindestens 388 Lysin-Seitenketten in 195 humanen Proteinen nachgewiesen werden und betrifft Proteine aus den Gruppen der Histone, Regulatoren der Transkription, Chromatinstrukturproteine, Chaperone, Zytoskeletproteine, Signalproteine und metabolische Enzyme [122].

Ebenso vielfältig ist die Gruppe der Bromodomänen enthaltenden Proteine: 42 humane Proteine verfügen über insgesamt 61 Bromodomänen [123]. Fujisawa et al. [124] beschreiben in ihrem Übersichtsartikel acht verschiedene Familien von Bromodomänen enthaltenden Proteinen anhand ihrer Struktur. Die meisten sind demnach Bestandteile von Multiprotein-Komplexen, deren Bindungspartner weitere funktionelle Domänen wie PHD- (*plant homeodomain*), PWWP- (Pro-Trp-Trp-Pro), BAH- (*bromo-adjacent homology*), KIX- (*KID-interacting*) und SAND- (Sp100, AIRE1, Nup41/75, DEAF1) -Domänen beinhalten. Bromodomänen enthaltende Proteine besitzen aber auch selbst verschiedene weitere funktionelle Domänen, wie z.B. katalytisch aktive HAT-Domänen [123, 124]. Im Kontext der Histone sind für die Spezifität eines Bromodomänen enthaltenden Proteins, neben den Bromodomänen selbst, weitere im selben Protein liegende Domänen besonders wichtig. Diese weiteren Domänen können z.B. PHD-Domänen sein, die methylierte Lysin-Seitenketten binden, oder auch eine zweite Bromodomäne. So können bestimmte Kombinationen von Histonmodifikationen erkannt werden [124].

Für diese Arbeit am wichtigsten ist die Familie der BET (*bromodomains and extra terminal domain*) -Proteine, zu denen die ubiquitär exprimierten BRD2, BRD3 und BRD4 sowie das gewebsspezifisch exprimierte BRDT (*bromodomain testis associated*) zählen [125]. Der Verlust von BRD2 oder BRD4 durch *Knockout* führte in verschiedenen Studien in Mäusen zum frühen Tod der Embryonen. Diese Proteine sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit essentiell [126].

Eine Bromodomäne setzt sich aus zwei verbindenden β -Schleifen und vier α -Helices zusammen, die eine hydrophobe Tasche formen, innerhalb der acetylierte Lysin-Seitenketten von Proteinen gebunden werden können [124, 127]. Die Bromodomänen selbst unterscheiden sich stark in der Oberflächenladung. Hierdurch kann bereits eine gewisse Spezifität für bestimmte zu bindende Proteine entstehen. So können an der Oberfläche positiv geladener Bromodomänen positiv geladene Proteine – wie die Histone mit ihrem hohen Anteil von Lysin und Arginin – schlechter binden [124]. Die Bromodomänen der BET-Proteine binden eine acetylierte Lysin-Seitenkette eines Histons innerhalb einer solchen hydrophoben Tasche. Für die Bindung entscheidend ist einerseits die elektrische Ladung der die Tasche umgebenden Oberfläche und andererseits zwei konservierte Aminosäuren-Seitenketten innerhalb der Tasche, mit denen die acetylierte Lysin-Seitenkette elektrostatisch interagiert: direkt mit einer Asparagin-Seitenkette sowie indirekt - in Kooperation mit einem Wassermolekül - mit einer Tyrosin-Seitenkette [125, 128]. Wenn zwei acetylierte Lysin-Seitenketten sehr nah beieinander vorkommen, wie bei der Histon-PTM H4K5AcK8Ac, können diese auch gemeinsam von einer einzigen Bromodomäne gebunden werden. Dabei geht die aminoterminal gelegene acetylierte Lysin-Seitenkette die oben beschriebene Interaktion mit den Asparagin- und Tyrosin-Seitenketten ein, während die carboxyterminal gelegene ausschließlich indirekt durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wird. Die Beteiligung dieser zweiten acetylierten Lysin-Seitenkette verstärkt dabei die Bindung [125, 129].

1.4.2 Lokalisation und Struktur

Die vier BET-Proteine enthalten je zwei aminoterminal gelegene Bromodomänen und eine ET (*extra-terminal recruitment domain*) -Domäne. BRD4 und BRDT enthalten zusätzlich eine CTM (*C-terminal motif*) -Domäne [125]. Zwischen den beiden Bromodomänen liegt eine stets identische, zwölf Aminosäuren umfassende Sequenz. Nach Deletion dieser Sequenz und Expression in HEK293T-Zellen konnten die mutanten BET-Proteine vermehrt im Zytosol statt im Kern der Zellen nachgewiesen werden, sodass man von der Funktion dieser Sequenz als NLS ausgeht [125, 130]. Für eine weitere konservierte Domäne, die carboxyterminal der Bromodomänen liegt, postuliert man eine mögliche Beteiligung an der Homo- bzw. Heterodimerisierung der BET-Proteine. Des Weiteren wurde die Assoziation von BRD2 mit den Chromosomen während der Mitose durch die Deletion dieser Domäne aufgehoben [125, 131].

1.4.3 Regulation der Transkription

Die Regulation der Transkription von Genen stellt die wichtigste bekannte Funktion der BET-Proteine dar. Die Bromodomänen vermitteln dabei die Bindung der BET-Proteine an das Chromatin im Zellkern. Über ihre ET- und CTM- (nur BRD4 und BRDT) -Domänen binden dann Effektorproteine, die ihrerseits weitere Proteine rekrutieren, sodass Chromatin-gebundene Multi-Proteinkomplexe entstehen. BET-Proteine werden deshalb häufig auch als molekulare Adapter oder Plattformen angesehen [125].

Die CTM-Domäne von BRD4 interagiert mit dem P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) -Komplex [125]. Je nach Zustand – aktiv oder inaktiv – setzt sich P-TEFb unterschiedlich zusammen. Im inaktiven Zustand besteht der Komplex aus einem von drei verschiedenen Cyclin T-Proteinen sowie CDK9 (*cyclin-dependent kinase 9*), einer 7SK-snRNA (*small nuclear RNA*) und HEXIM1 (*Hexamethylene Bisacetamide Inducible 1*). Im aktiven Zustand hingegen fehlt die Assoziation mit dem inhibitorischen HEXIM1 und der verbindenden 7SK-snRNA. Der aktivierte P-TEFb-Komplex phosphoryliert mittels der CDK9-Kinase dann die RNA-Polymerase II an Serin 2, sodass die Elongation während der Transkription stark gesteigert wird. BRD4 kann P-TEFb durch verschiedene Mechanismen vom inaktiven in den aktiven Zustand überführen [125, 132] – sogar in Anwesenheit von HEXIM1 durch direkte Interaktion mit CDK9 [125, 133]. BRD4 aktiviert und rekrutiert gleichzeitig den P-TEFb-Komplex zum Transkriptionsstartpunkt von protein-kodierenden Genen. Danach begleiten beide die RNA-Polymerase II bei der Transkription durch acetylierte Nucleosomen. So steigert BRD4 die Expression von Genen durch die Elongation der Transkription [125].

Der oben beschriebene Mechanismus von BRD4 auf die Transkription am Transkriptionsstartpunkt von proteinkodierenden Genen trifft auf die Mehrheit der Gene zu [134]. Trotzdem ist die Transkription verschiedener Gene ganz unterschiedlich stark auf BRD4 angewiesen; manche Gene reagieren besonders stark auf Verlust von BRD4 [134]. Beispiele für solche Gene sind *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*), *BCL-2* und *CDK4* [126]. Dafür wird die Bindung von BRD4 an Promotoren und Enhancern [134] sowie an Super-Enhancern [135] von Genen verantwortlich gemacht.

Des Weiteren wurde ein Einfluss von BET-Proteinen auf die Initiation der Transkription nachgewiesen [136]. Demnach steigert BRD4 die Transkription von eRNAs (*enhancer RNAs*) durch die Rekrutierung von P-TEFb zu proximal gelegenen Enhancern. Diese bidirektionalen,

nicht-kodierenden eRNAs verstärken ihrerseits die Initiation der Transkription an Transkriptionsstartpunkten von protein-kodierenden Genen.

Die Auswirkungen der ET-Domänen von BET-Proteinen auf die Transkription sind weniger gut bekannt. Diese ET-Domänen binden virale Proteine, wie ein Antigen des *Kaposi-Sarkom-Virus* [125, 137]. Physiologisch konnten Rahman et al. [138] fünf weitere Interaktionspartner der ET-Domänen aller BET-Proteine identifizieren, darunter JMJD6 (*Jumonji Domain-Containing Protein 6*), NSD3 (*Nuclear SET Domain-Containing Protein 3*) und GLTSCR1 (*Glioma tumor suppressor candidate region gene 1*). Nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* dieser Proteine konnten die Autoren eine verminderte Transkription eines viralen Reporter-Gens, für dessen Transkription bekannterweise BRD4 notwendig ist, nachweisen. Des Weiteren konnte die Rekrutierung von NSD3 zu den Promotoren von einigen BRD4-abhängigen Genen durch BRD4 mittels Chromatin-Immunpräzipitation nach *Knockdown* von BRD4 belegt werden. Die Effekte von BRD4- und NSD3-*Knockdown* auf die Expression dieser BRD4-abhängigen Gene waren erwartungsgemäß vergleichbar. Für die Steigerung der Transkription durch die Rekrutierung von NSD3 machten die Autoren dessen Aktivität als Histonmethylase von H3K36 verantwortlich [138]. Die Rekrutierung sekundärer Effektorproteine wie NSD3 durch die ET-Domänen stellt einen P-TEFb-unabhängigen Pfad der Genaktivierung durch BET-Proteine dar. Außerdem erklärt sich so, wieso auch eine kurze Proteinvariante von BRD4 die Transkription von Genen fördern kann, obwohl ihr die CTM-Domäne fehlt [125].

Zusammenfassend nehmen BET-Proteine auf vielfältige Weise Einfluss auf die Transkription von Genen. BRD4 und BRDT kommt dabei wegen ihrer CTM-Domäne eine Sonderrolle zu [125].

1.4.4 Weitere Funktionen

BET-Proteine können über ihre Bromodomänen auch acetylierte Nicht-Histon-Proteine binden. Cyclin T1, als Bestandteil des P-TEFb-Komplexes, kann in dreifach acetylierter Form von BRD4 gebunden werden, sodass der Komplex stabilisiert und aktiviert wird [125, 132].

Devaiah et al. [139] beschrieben in ihrer Arbeit eine bis dahin unbekannte Funktion von BRD4 als Histonacetyltransferase. Die HAT-Aktivität betrifft viele der an Histon H3 und H4 aminoterminal gelegenen Lysin-Seitenketten, deren Acetylierung mit der Lockerung von Chromatin und folglich mit gesteigerter Transkription assoziiert ist. Außerdem wird die

weiter carboxyterminal gelegene Modifikation H3K122Ac durch BRD4 vermittelt. Diese ist mit der Dekompaktierung und Dissoziation der Nucleosomen assoziiert. Pharmakologische BET-Inhibition kann dabei die HAT-Aktivität von BRD4 aufheben.

1.4.5 Rolle der BET bei Karzinogenese und Tumorprogression

Eine Vielzahl von Studien haben die Rolle der BET-Proteine bei Karzinogenese und Tumorprogression nachgewiesen. Viele Erkenntnisse sind erst durch die in den letzten Jahren entwickelten pharmakologischen Inhibitoren erlangt worden. Diverse Tumorentitäten sind demnach regelrecht auf BET-Proteine angewiesen [126]. Des Weiteren liegen BRD2 und BRD4 in vielen Tumorentitäten überexprimiert vor [126].

Dass sich BRD4 bzw. BRD3 tatsächlich wie klassische Onkogene verhalten können, wird deutlich bei der Betrachtung des *NUT midline carcinoma*, eines sehr seltenen, aggressiven, undifferenzierten Plattenepithelkarzinoms, das durch die Fusion des *NUT (nuclear protein in testis)* -Gens auf 15q13 mit dem *BRD4*-Gen auf 19p13.1 durch Translokation gekennzeichnet ist [126]. Das resultierende Fusionsprotein wird für die Entstehung und das Fortschreiten des *NUT midline carcinoma* verantwortlich gemacht [140]. Der *Knockdown* des Fusionsproteins *in vitro* führte zu Zellzyklusarrest und Ausdifferenzierung der Zellen [141]. Im Rahmen einer klinischen Studie kam es zu einem Ansprechen von einigen Patienten mit *NUT midline carcinoma* auf pharmakologische BET-Inhibition [142]. Der genaue Mechanismus, der hinter der onkogenen Wirkung des BRD3/4-NUT-Fusionsproteins steht, ist aber weiterhin unbekannt [125].

1.4.6 Pharmakologische BET-Inhibition

Der erste BET-Inhibitor war das Triazolo-thieno-Diazepin (+)-JQ1. Filippakopoulos et al. [143] berichteten in ihrem Artikel 2010 erstmals über die Synthese dieses Racemats. Das (+)-Enantiomer bindet sehr spezifisch die Bromodomänen aller vier BET-Proteine [143]. Insbesondere die Bromodomänen von BRD4 werden bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich gebunden [144]. Zudem kann JQ1 Zellmembranen sehr gut penetrieren [144]. In Tierversuchen mit Mäusen zeigten sich keine Zeichen für starke Toxizität, sodass JQ1 auch *in vivo* angewendet werden kann. JQ1 zeigte hohe Aktivität gegen den Tumor in einem Xenograft-Modell des *NUT midline carcinoma* [144]. JQ1 diente als Leitsubstanz für die Entwicklung zahlreicher weiterer BET-Inhibitoren, die in klinischen Studien Verwendung fanden [126].

Nach BET-Inhibition konnte mittels ChIP Seq (*Chromatin Immuno Precipitation DNA-Sequencing*) eine ubiquitäre Verminderung von BRD4 an Super-Enhancern, Enhancern und Promotoren beobachtet werden, die für die verminderte Expression einer großen Anzahl von Genen verantwortlich gemacht wird [126, 135]. In der Expressionsanalyse nach BET-Inhibition in verschiedensten Krebszelllinien ergibt sich eine „Signatur“ von immer wieder gleichgerichtet regulierten Genen [126].

1.4.7 BET-Inhibition in der Krebstherapie

Bisher sind keine der BET-Inhibitoren für die Therapie am Menschen zugelassen. Zurzeit werden jedoch viele klinische Studien mit BET-Inhibitoren durchgeführt.

Eine Phase-I-Studie mit dem BET-Inhibitor OTX015 an vier Patienten mit *NUT midline carcinoma* zeigte ein Ansprechen bei zwei Patienten, das zwei bzw. zehn Monate andauerte [141]. In weiteren Studien mit anderen BET-Inhibitoren wurden ähnliche Ansprechraten erzielt. Insgesamt sind die Ergebnisse der Studien an Patienten mit *NUT midline carcinoma* vor dem Hintergrund der hohen Aktivität in präklinischen Modellen enttäuschend; die Gründe dafür sind unklar [126, 142].

In einer größeren Studie wurde die Aktivität von OTX015 auf hämatologische Erkrankungen untersucht. In der ersten Kohorte fanden sich 41 Patienten mit akuter Leukämie, die zuvor bereits zwei erfolglose systemische Therapieversuche erhalten hatten. Hier zeigte sich ein Ansprechen bei fünf Patienten mit mehreren Monaten kompletter Remission [126, 145]. In der zweiten Kohorte fanden sich 45 Patienten mit Lymphomen und Multiplen Myelomen, die zuvor bereits drei verschiedene systemische Therapien erhalten hatten. Die BET-Inhibition zeigte keine Aktivität bei den Patienten mit Multiplem Myelom. Zwei Patienten mit Lymphom erlebten mehrere Monate kompletter Remission. Insgesamt war das Ansprechen in der Subgruppe mit diffus großzelligem Non-Hodgkin-Lymphom größer, verglichen mit den anderen Lymphomen. Die Expression von MYC durch die Lymphome konnte den Erfolg aber nicht vorhersagen [126, 146].

Thrombozytopenie, Erschöpfungssyndrom, gastrointestinale Beschwerden und Hyperbilirubinämie sind als gemeinsame Nebenwirkungen verschiedener BET-Inhibitoren beschrieben worden [126].

1.4.8 BET-Proteine als therapeutische Ziele im Urothelkarzinom

Beim Urothelkarzinom gab es bisher im Wesentlichen nur zwei Publikationen zu BET-Proteinen.

Yan et al. [147] verglichen die BRD4 mRNA-Expression in zwölf Proben von Urothelkarzinomen und dem angrenzenden normalen Urothel. Dabei stellten sie eine signifikante Überexpression der BRD4 mRNA fest. Sie überprüften diese Beobachtung auf Proteinebene mittels Western-Blot. Hier bestätigte sich die Überexpression von BRD4. Die immunhistochemische Analyse einer kleinen Zahl von Geweben mit einem BRD4-Antikörper zeigte vorwiegend nukleäre Färbung der malignen Gewebe. Der Grad der Anfärbung wurde bestimmt und mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert. Hohe BRD4 Expression korrelierte mit hohem *Grading*, positivem Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung. Die anschließende multivariate Cox-Analyse identifizierte BRD4 als unabhängigen prognostisch negativen Faktor für das Gesamtüberleben. Mit dem Nachweis der BRD4-Überexpression schafft diese Studie eine Rationale für die Untersuchung von BET-Inhibition im Urothelkarzinom.

Wu et al. [148] widmeten sich in ihrer Studie zunächst ebenfalls der BRD4-Expression in 55 Proben von Urothelkarzinomen. Sie konnten die Ergebnisse von Yan et al. in Bezug auf Überexpression von BRD4 und Korrelation von BRD4-Expression mit den klinischen Parametern *Grading* und Lymphknotenstatus reproduzieren. Des Weiteren konnten sie die Überexpression von BRD4 in zwei UCC verglichen mit einer Kontroll-Zelllinie nachweisen. In UCC führten BRD4-*Knockdown* mittels shRNA (*short-hairpin RNA*) und Behandlung mit JQ1 gleichsam zu einer Reduktion der Viabilität, Zellzyklusarrest und Reduktion der Proliferation. Nach ektopischer Überexpression von BRD4 stieg die Sensitivität der UCC gegenüber JQ1. Durchflusszytometrisch wurde die Anfärbbarkeit von UCC mit Propidiumiodid und Annexin-V untersucht. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Propidiumiodid-negativen, aber Annexin-V-positiven Zellfraktion nach JQ1, was als Zeichen ablaufender Apoptose gewertet werden kann. Expressionsanalysen ergaben eine positive Korrelation zwischen der Expression der Methyltransferase EZH2 und der Expression von BRD4. Sowohl JQ1 als auch BRD4-*Knockdown* führten umgekehrt zu verminderter EZH2-Expression und verminderten die Aktivität des EZH2-Promotors in einem Luciferase-Reporter-Assay. Ektopische EZH2-Überexpression schwächte den Effekt von JQ1 auf den Zellzyklus und die Induktion der Apoptose ab. Ebenso konnte die ektopische MYC-

Überexpression die Repression von EZH2 durch BRD4-*Knockdown* und JQ1 aufheben. In der ChIP-Analyse konnten die Autoren dann nachweisen, dass MYC nach BRD4-*Knockdown* oder JQ1-Behandlung nicht mehr an den EZH2-Promotor bindet, eine direkte Bindung von BRD4 an den EZH2-Promotor hingegen ausschließen. Demnach reguliert BRD4 die EZH2-Expression indirekt über MYC. Außerdem konnten die Autoren proliferationshemmende Wirkungen von BRD4-*Knockdown* und JQ1 in einem Maus-Xenograft-Modell nachweisen. Diese Studie bestätigte zunächst die Überexpression von BRD4 im Urothelkarzinom. Weiterhin beschrieb sie die Aktivität von JQ1 gegenüber UCC *in vitro* und *in vivo*. Dabei identifizierte sie auch einen Mechanismus, über den BET-Inhibition das seinerseits im Urothelkarzinom häufig deregulierte EZH2 hemmen kann.

1.5 Ziele der Arbeit

Die Vorarbeiten aus dem urologischen Forschungslabor haben die Inhibition der Klasse-I-HDAC im Urothelkarzinom sehr genau charakterisiert und als vielversprechenden Ansatzpunkt für eine neue Therapie identifiziert. Neben der Frage, ob sich die Ergebnisse hinsichtlich HDAC im Urothelkarzinom auch *in vivo* reproduzieren lassen, ergaben sich an dieser Stelle weitere Ansatzpunkte, um die klinische Anwendbarkeit von Klasse-I-HDAC-Inhibitoren beim Urothelkarzinom weiter zu untersuchen. So stellte sich die Frage nach sinnvollen Partnern für eine Kombinationstherapie. Werden zwei oder mehr zielgerichtete Inhibitoren von Beginn einer Krebstherapie an kombiniert, statt aufeinander folgend nach dem jeweiligen Therapieversagen angewendet, kann oftmals die häufig auftretende Resistenz der Zellen insgesamt stärker verzögert oder verhindert werden [149]. Ferner können durch Kombinationstherapien synergistische bzw. überadditive Effekte erzielt werden, die letztlich eine Dosisreduktion erlauben und so die Toxizität der Therapie vermindern [150]. Insbesondere stellte sich die Frage nach Kombinationspartnern, die den Zelltodmechanismus nach Klasse-I-HDAC-Inhibition in UCC zu Apoptose hin modulieren. Bei der Charakterisierung solcher Kombinationstherapien könnten auch neue Erkenntnisse zum Wirkmechanismus der Klasse-I-HDAC-Inhibition in UCC gewonnen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Kombination von Klasse-I-HDAC-Inhibition mit der BET-Inhibition im Urothelkarzinom zu untersuchen. Zunächst sollte mittels Viabilitätsassays evaluiert werden, ob es auch in UCC zu Synergismen kommt. Dazu wurden die Experimente mit der Software CompuSyn ausgewertet, sodass eine zuverlässige Aussage über Synergismen möglich war [150]. Im Anschluss daran sollten die Auswirkungen der

Kombinationstherapie auf die Langzeitproliferation und den Zellzyklus analysiert werden. Parallel dazu sollten die Auswirkungen der Kombinationstherapie auf benigne Kontroll-Zelllinien beschrieben werden, um Hinweise für Toxizität bei Normalzellen zu gewinnen und so die Tumorspezifität einschätzen zu können. Ebenfalls sollte Kombinationstherapie in primären UCC-Kulturen angewendet werden, weil hierdurch eine zuverlässigere Vorhersage über die Effektivität der Therapie *in vivo* getroffen werden kann, verglichen mit der Anwendung einzig bei kommerziell erhältlichen UCCs, die wegen möglicher Anpassungsvorgänge an die Zellkulturbedingungen nicht repräsentative Ergebnisse liefern können. Danach sollten die Auswirkungen eines BRD4-*knockdowns* auf ein breiteres Panel von UCC charakterisiert werden, da die hierzu bereits publizierte Arbeit [148] lediglich die Auswirkungen auf eine UCC und einen ihrer Klone untersucht hat. Außerdem machte sich das Projekt zum Ziel, den Zelltodmechanismus zu identifizieren, der im Anschluss an die Kombinationstherapie abläuft. Hierzu sollte mittels Western-Blot geprüft werden, ob es zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade kommt. Ob der Zelltodmechanismus Caspase-abhängig ist, sollte mit einem funktionellen Versuch mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-Oph getestet werden. Dies erschien wichtig, weil es im Rahmen der Vorarbeiten zur Klasse-I-HDAC-Inhibition kaum zum Ablauf von Apoptose als Antwort auf die Behandlung mit Inhibitoren gekommen war. In anderen Tumorentitäten waren bereits Synergismen bei kombinierter HDAC- und BET-Inhibition beschrieben worden [151, 152]. Dabei wurden viele verschiedene Mechanismen postuliert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einige dieser Mechanismen auch für das Urothelkarzinom zu überprüfen. Hierzu sollten zunächst mittels qRT-PCR sowie Western-Blot verschiedene Messungen durchgeführt werden, um die Effekte auf die Expression von wichtigen Regulatoren nach Kombinationsbehandlung mit denen der Einzelbehandlungen zu vergleichen. Danach sollte eine Hypothese zur Entstehung des Synergismus mittels eines funktionellen Versuchs überprüft werden.

Zu Beginn der Arbeit sollten zwei Ansätze für Kombinationsbehandlungen untersucht werden. Neben BET-Inhibition wurde auch die Inhibition der Aurora-Kinasen untersucht. Die Ergebnisse hierzu werden in einem Zusatzkapitel dargestellt und diskutiert.

1.6 Ethikvoten

Es existieren zwei Ethikvoten, welche die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente abdecken.

Ein positives Ethikvotum mit Aktenzeichen 1788 umfasst die Etablierung von Primärkulturen von urothelialen Epithelzellen und nachgeschaltete Experimente.

Ein weiteres positives Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 4371 umfasst das Anlegen von Primärkulturen von Urothelkarzinom-Zellen. Hier liegt ein Amendment aus dem Jahre 2016 vor.

Die Gewebeproben wurden nach entsprechender Aufklärung für das Anlegen von Primärkulturen verwendet. Es wurden keine weiteren klinischen Daten erhoben. Die Kulturen dienten in anonymisierter Form lediglich als experimentelle Kontrollen.

2 Originalarbeit

Hölscher, A. S., Schulz, W. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., Hoffmann, M. J. (2018), Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. *Clinical Epigenetics*, (10)1

RESEARCH

Open Access



Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines

Alexander S. Hölscher, Wolfgang A. Schulz, Maria Pinkerneil, Günter Niegisch and Michèle J. Hoffmann*

Abstract

Background: New efficient therapies for urothelial carcinoma (UC) are urgently required. Small-molecule drugs targeting chromatin regulators are reasonable candidates because these regulators are frequently mutated or deregulated in UC. Indeed, in previous work, Romidepsin, which targets class I histone deacetylases (HDAC), efficiently killed UC cells, but did not elicit canonical apoptosis and affected benign urothelial cells indiscriminately. Combinations of HDAC inhibitors with JQ1, an inhibitor of bromodomain-containing acetylation reader proteins like BRD4, which promote especially the transcription of pro-tumorigenic genes, have shown efficacy in several tumor types. We therefore investigated the effects of combined Romidepsin and JQ1 treatment on UC and benign urothelial control cells.

Results: JQ1 alone induced cell cycle arrest, but only limited apoptosis in eight UC cell lines with strongly varying IC_{50} values between 0.18 and 10 μ M. Comparable effects were achieved by siRNA-mediated knockdown of BRD4. Romidepsin and JQ1 acted in a synergistic manner across all UC cell lines, efficiently inhibiting cell cycle progression, suppressing clonogenic growth, and inducing caspase-dependent apoptosis. Benign control cells were growth-arrested without apoptosis induction, but retained long-term proliferation capacity. In UC cells, anti-apoptotic and oncogenic factors Survivin, BCL-2, BCL-XL, c-MYC, EZH2 and SKP2 were consistently downregulated by the drug combination and AKT phosphorylation was diminished. Around the transcriptional start sites of these genes, the drug combination enhanced H3K27 acetylation, but decreased H3K4 trimethylation. The cell cycle inhibitor CDKN1C/p57^{KIP2} was dramatically induced at mRNA and protein levels. However, Cas9-mediated CDKN1C/p57^{KIP2} knockout did not rescue UC cells from apoptosis.

Conclusion: Our results demonstrate significant synergistic effects on induction of apoptosis in UC cells by the combination treatment with JQ1 and Romidepsin, but only minor effects in benign cells. Thus, this study established a promising new small-molecule combination therapy approach for UC.

Keywords: BET inhibitor, JQ1, HDACi, Romidepsin, Bladder cancer, Apoptosis

Background

For more than 30 years, chemotherapy of invasive urothelial carcinoma has been based on combinations of cisplatin with other cytotoxic drugs. This treatment is moderately efficacious and limited by frequent development of resistance and toxicity in the often elderly patients. Novel drugs targeting growth factor receptors or signal transduction pathways have so far not yielded significant benefits in clinical trials and have therefore not been introduced into clinical practice. Intriguingly, among all

cancer types, urothelial carcinoma appears to have the highest prevalence of mutations in chromatin regulator proteins, including various components of the trithorax-like histone-modifying and SWI/SNF1 chromatin remodeling protein complexes [1]. It is therefore reasonable to assume that epigenetic inhibitors represent an alternative approach to chemotherapy of urothelial carcinoma.

Many epigenetic inhibitors target the activity of enzymes modifying histones or DNA. For instance, HDAC inhibitors (HDACi) interfere with the enzymatic activity of histone deacetylases and are considered good drug candidates. Our previous comprehensive analysis of expression of different HDACs isoenzymes in UC and their suitability as therapeutic targets revealed HDAC class I

* Correspondence: Michele.Hoffmann@hhu.de
Department of Urology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University,
Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

enzymes as the best targets for HDACi in UC therapy [2]. Drugs targeting specific class I HDACs like Romidepsin, Givinostat, or 4SC-202 most efficiently inhibited cell proliferation and caused cell death in UC cells. Despite their efficacy, these compounds do not seem optimal for treatment of UC on their own, because cell death occurred only partly by apoptosis and proliferation of benign urothelial control cells was also efficiently blocked [3, 4]. We therefore investigated the combination of Romidepsin with the BET inhibitor JQ1, which has been proposed to synergize with HDACi in several cancer types and to induce a canonical apoptotic response [5–8]. In pancreatic adenocarcinoma, the synergism was ascribed to several interacting mechanisms, encompassing inhibition of AKT signaling, increased STAT3 phosphorylation, and prominent induction of the CDK inhibitor p57^{KIP2} [8].

JQ1 is the best characterized representative of a novel class of compounds which blocks binding of chromatin proteins by targeting domains recognizing histone modifications. JQ1 specifically targets the bromodomains of transcriptional coactivators like “bromodomain and extra-terminal” (BET) proteins, especially BRD proteins, and appears to be particularly effective in cancers dependent on MYC transcription factors, which are not well drug-gable by other means [9]. The best studied BET protein BRD4 has been shown to be overexpressed in UC tissues [10] correlating with grade, progression towards metastatic disease, and poor overall survival [11]. As an epigenetic reader of acetylation marks at histone tails, BRD4 functions as a scaffold protein linking chromatin remodeling and transcriptional regulation to cell cycle progression. A newly discovered histone acetyltransferase activity for H3K122 further contributes to chromatin decompaction and transcription activation [12]. Inhibition of BRD4 in particular disrupts super enhancers and represses the oncogenes *c-MYC* and *EZH2* [13, 14]. A pioneer study by Wu et al. on BRD4 in UC revealed its upregulation in cancer tissues and inhibition of cell proliferation by JQ1 in two related UC cell lines, T24 and EJ [10]. Knockdown of *BRD4* likewise inhibited proliferation of these UC cell lines. The authors ascribe these effects to inhibition of *c-MYC* and subsequent downregulation of *EZH2*.

In the present study, we therefore investigated whether JQ1 exerts antineoplastic effects on a broader range of UC cell lines which cover the heterogeneity of urothelial carcinoma more comprehensively. Indeed, its efficacy varied between the cell lines, and JQ1 neither suppressed clonogenic growth nor elicited pronounced apoptosis consistently. The combination of JQ1 with Romidepsin however displayed strong synergies in tumor cell growth suppression and apoptosis induction across all cell lines; concomitantly, histone acetylation was broadly enhanced. As in pancreatic adenocarcinoma cells, p57^{KIP2} emerged as

one factor synergistically responding to the combination treatment. Surprisingly, however, p57^{KIP2} knockout rather enhanced apoptosis in UC cells.

Methods

Cell culture, transfections, drug exposure

BRD4 expression, effects of siRNA-mediated knockdown, and drug exposure were studied in a range of urothelial carcinoma cell lines (UCCs) representing the heterogeneity of urothelial carcinoma, namely, VM-Cub1, RT-112, T24, 5637, UM-UC-3, HT-1376, 639-V, BFTC-905, J-82, and SW-1710. All cell lines were regularly authenticated by STR profiling and checked for mycoplasma contamination. As normal cell controls, we used the normal urothelial cell lines HBLAK [15] and TERT-NHUC, a culture of primary urothelial cells (NHUC) [16], and benign immortalized fetal kidney HEK-293 cells.

UCCs and HEK-293 cells were cultured in DMEM GlutaMAX-I (Gibco, Darmstadt, Germany) supplemented with 4.5 g/l D-glucose, pyruvate, and 10% FBS (Biochrom, Berlin, Germany). HBLAK cells were cultured in CnT-Prime Epithelial Culture Medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland). TERT-NHUC cells were cultured in keratinocyte serum-free medium (Gibco) supplemented with 0.35 µg/ml *N*-epinephrine and 0.33 mg/ml hydrocortisone. NHUC were cultured in keratinocyte serum-free medium (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin, EGF, and BPE. Primary urothelial carcinoma cultures were established from fresh transurethral resectates and cultured in Epilife Medium (Gibco) supplemented with 0.5 ng/ml EGF, 25 µg/ml BPE, 1% nonessential amino acids (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 1% ITS mix (Invitrogen), 3 mM glycine, and 10% fibroblast-conditioned medium on a collagen IV matrix [17]. All cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂.

For siRNA-mediated knockdown, cells cultured in six-well plates were transfected with 8 nM BRD4 ON-TARGET plus BRD4 siRNA-SMART pool (L-004937-00-0005, Dharmacon, Freiburg, Germany) or ON-Target plus Control pool (D-001810-10-05, Dharmacon) using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and assayed 48, 72, or 120 h post-transfection.

For BRD4 overexpression, cells were transfected with p6344 pcDNA4-TO-HA-Brd4FL (Addgene plasmid #31351) [18] or empty vector (pcDNA4-TO) using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche, Penzberg, Germany).

Romidepsin and (+)-JQ1 were purchased from Selleck Chemicals (Munich, Germany) and dissolved in DMSO. Control cells were treated with DMSO only. Drugs were added 24 h after cell seeding. Pan-Caspase inhibitor Q-VD-Oph (SML0063, Sigma Aldrich, Hamburg, Germany) was dissolved in DMSO and used at 30 µmol/l.

Drug concentrations for combination treatments were adjusted for each cell line since IC_{50} values for both compounds varied strongly (Table 1 upper part).

Determination of viability

Viability of cells treated with JQ1 was measured after 72 h by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide dye reduction assay (MTT, Sigma Aldrich). Viability of cells after siRNA-mediated BRD4 knock-down or treatment with Q-VD-Oph was measured via total cellular ATP using CellTiter-Glo Assay (Promega, Mannheim, Germany).

Calculation of IC_{50} values and drug synergy

For determination of IC_{50} values, JQ1 was added in defined concentration ranges. For determination of drug synergy, JQ1 and Romidepsin were used in fixed dose ratios. For each cell line, individual dose ratios were chosen based on the IC_{50} of the individual drugs (Table 1 upper part). For each cell line, at least five different combinations of concentrations were applied and then analyzed by the Chou-Talalay method using CompuSyn software [19]. The final cell line-dependent

concentrations for the 48-h combination treatment used for subsequent analyses are given in Table 1 (lower part).

Colony-forming assay and Giemsa staining

For colony-forming assays, cells were seeded into six-well plates at a density of 1000 cells/well 48 h post-drug treatment and either 48, 72, or 120 h post-siRNA transfection. After 10–15 days, cells were fixed in methanol and stained with Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany).

Flow cytometry

Cell cycle analyses were performed 48 h after treatment with individual drugs or their combinations and 48, 72, and 120 h post-siRNA transfections. Detached cells in supernatant and attached cells were collected and stained with buffer containing 50 μ g/ml propidium iodide, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100 for 1 h at room temperature. To assess apoptotic cell death and necrosis, cells were incubated with Annexin V-FITC (31490013, Immunotools, Friesoythe, Germany), Annexin V binding buffer, and propidium iodide at 2 μ g/ml. Flow cytometry was done using the MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and MACSQuantify software as previously described [20].

Table 1 Treatment doses for single and combined treatment.

Eight UCCs, two immortalized benign urothelial cells (TERT-NHUC, HBLAK), primary urothelial cells (NHUC), and HEK-293 cells were treated with JQ1 at a fixed range of concentrations. Cell viability was measured by MTT- assay 72 h later. IC_{50} values for each cell line were determined (upper part). Cell viability results were used according to the Chou-Talalay method to determine doses for the combination treatment with synergistic effects for each investigated cell line. The respective doses were applied for further functional characterization for 48 h (lower part)

Urothelial carcinoma cell lines		Control cell lines	
	JQ1 IC_{50} [μ mol/l]		JQ1 IC_{50} [μ mol/l]
VM-Cub1	0.18	TERT-NHUC	0.4
RT-112	0.19	HBLAK	0.4
T24	0.23	NHUC	0.26
5637	0.39	HEK-293	0.26
UM-UC-3	2.6		
HT-1376	5.2		
639-V	6.8		
BFTC-905	10		
JQ1 + Romidepsin combination doses			
	JQ1 [μ mol/l]		Romidepsin [nmol/l]
Vm-Cub1	0.22		2.2
UM-UC-3	1		2
T24	0.22		2.2
639-V	1.8		1.6
HBLAK	0.4		0.89

RNA isolation, cDNA synthesis, and qRT-PCR

Total mRNA was isolated using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) with an extended incubation time of 30 min at 42 °C. qRT-PCR was performed using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) and self-designed primers for the target genes and the reference gene *TBP* (TATA-box-binding protein) on the LightCycler 96 PCR platform (Roche). The primers used are listed in Additional file 1.

Western blot analyses

Total cellular protein was extracted by lysis for 30 min on ice in RIPA buffer containing 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1 mmol/l EDTA, 50 mmol/l TRIS (pH 7.6), protease inhibitor cocktail (10 μ l/ml, Sigma Aldrich), and phosphatase inhibitor (10 μ l/ml, Sigma Aldrich). Protein concentrations were determined by bicinchoninic acid protein assay (ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany). Proteins were separated in SDS-PAGE gels and then wet-blotted to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Membranes were blocked by 5% non-fat dry milk or BSA in TBS-T (150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS, pH 7.6 and 0.1% TWEEN-20), washed several times, and then incubated with primary antibodies at 4 °C overnight. After several

washings with TBS-T, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature for 1 h. Membranes were then developed using Super Signal West Femto (ThermoFisher Scientific) or Western Bright Quantum (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany). α -tubulin was used as a loading control. Antibodies are listed in Additional file 1.

Extraction and analysis of histones

Histones were acid-extracted according to a published protocol [21]. One microgram of each sample was used for Western blot analysis with 15% SDS-PAGE gels and PVDF membranes (Merck Millipore) as described above using antibodies listed in Additional file 1. Histone H3 was used as a histone loading control.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP-IT™ Express Kit (#53008, Active Motif, La Hulpe, Belgium) was used according to the manufacturer's instructions. Rabbit Gamma Globulins (#31887, Invitrogen) served as a background control. Quantitative real-time PCR was used to determine enrichment of indicated gene regions at their transcriptional start site (TSS) as well as 2 kb upstream and downstream of each TSS. For a list of antibodies and primers, see Additional file 1.

Generation of p57^{KIP2} knockout cells by gene editing

Cells were transfected by X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche, Penzberg, Germany) with p57 Double Nickase Plasmid (sc-400444-NIC-2, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) encoding a GFP marker, puromycin resistance, and two different sgRNAs targeting *CDKN1C* exon 1 and D10A mutant Cas9 (Nickase). Double Nickase control Plasmid (sc-437281) with non-targeting sgRNAs was used as a control. GFP expression allowed monitoring of transfection efficiency. Transfected cells were selected with 0.5 μ g/ml puromycin for 5 days before single-cell seeding into 96-well plates. Genomic DNA was extracted from single-cell clones using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). An amplicon spanning the sgRNA binding sites was amplified using HotStarTaq polymerase (Qiagen); PCR products were cloned into PCR4-TOPO TA Vector (450030, Invitrogen) and Sanger-sequenced. Mutant sequences were compared to the NCBI *CDKN1C* reference sequence (NG_008022.1). Successful knockout of p57^{KIP2} was verified by Western blot analysis.

Results

Knockdown of BRD4 exerts antineoplastic effects on UCCs
Since BRD4 is considered the most important target of the BET inhibitor JQ1 in various cancers, we evaluated BRD4 protein expression in a series of UCCs compared to the benign urothelial control cell lines HBLAK,

TERT-NHUC, and NHUC (Fig. 1a). BRD4 was expressed in all tested UCCs at variable levels, in some UCCs more strongly than in the normal controls.

Next, we investigated by siRNA-mediated knockdown how dependent different UCCs are on BRD4 function and whether effects of siRNA knockdown differed from that by pharmacological inhibition in the same cell line. VM-Cub1 and UM-UC-3 cells were chosen for their very different phenotypes and have had been extensively characterized for their response to HDACi previously [3, 4]. As shown below, they were also differentially sensitive to JQ1 (Table 1 upper part). Efficient knockdown of BRD4 protein was confirmed at 48, 72, and 120 h post-transfection. Expression of *c-MYC*, a common target of BRD4, was strongly decreased in VM-Cub1 cells 120 h post-transfection, but not in UM-UC-3 (Fig. 1b).

Cell viability decreased following BRD4 knockdown in a time-dependent manner in both cell lines (Fig. 1c). Concordantly, clonogenic growth was significantly suppressed (Fig. 1d; $p \leq 0.01$). Changes in cell cycle distribution intensified over time; VM-Cub1 cells became arrested in G0/G1, whereas UM-UC-3 cells accumulated in G2/M (Fig. 1e). Only minor increases in subG1 fractions were observed.

UCCs differ in sensitivity to pharmacological BET inhibition

Next, we investigated the dose response of eight different UCCs, including VM-Cub1 and UM-UC-3, to JQ1. JQ1 diminished viability in all cell lines, but they clearly fell into two groups, with low and high sensitivity. Calculated IC_{50} values were below 0.5 μ M in the first group, but well above 1 μ M in the second group (Table 1). Notably, at the highest concentration of JQ1 (25 μ M) tested, a sizeable fraction of cells survived the treatment. This fraction correlated only partially with the respective IC_{50} , indicating that JQ1 alone acted rather in a cytostatic fashion. No correlation was seen between sensitivity to JQ1 and BRD4 protein expression or any other previously investigated characteristics of the cell lines. Benign control cells generally responded to low concentrations of JQ1 (IC_{50} 0.26–0.4 μ M).

BET inhibitor JQ1 and class I HDAC inhibitor Romidepsin synergistically inhibit UCC proliferation and clonogenic growth

Cell viability results from dose-response curves for JQ1, and Romidepsin were used to generate combination index plots (Fa/CI-Plots; fraction affected/combo index; Fig. 2a) by the Chou-Talalay method [19]. Strong synergisms (CI < 1) were detected for all four UCCs at effect rates (Fa; percentage of dead cells) from 0.2 (T24) to 0.4 (UM-UC-3). Synergies intensified with increasing effect rates. Intriguingly, the strongest synergies were seen in the less JQ1-sensitive 639-V and UM-UC-3 cells.

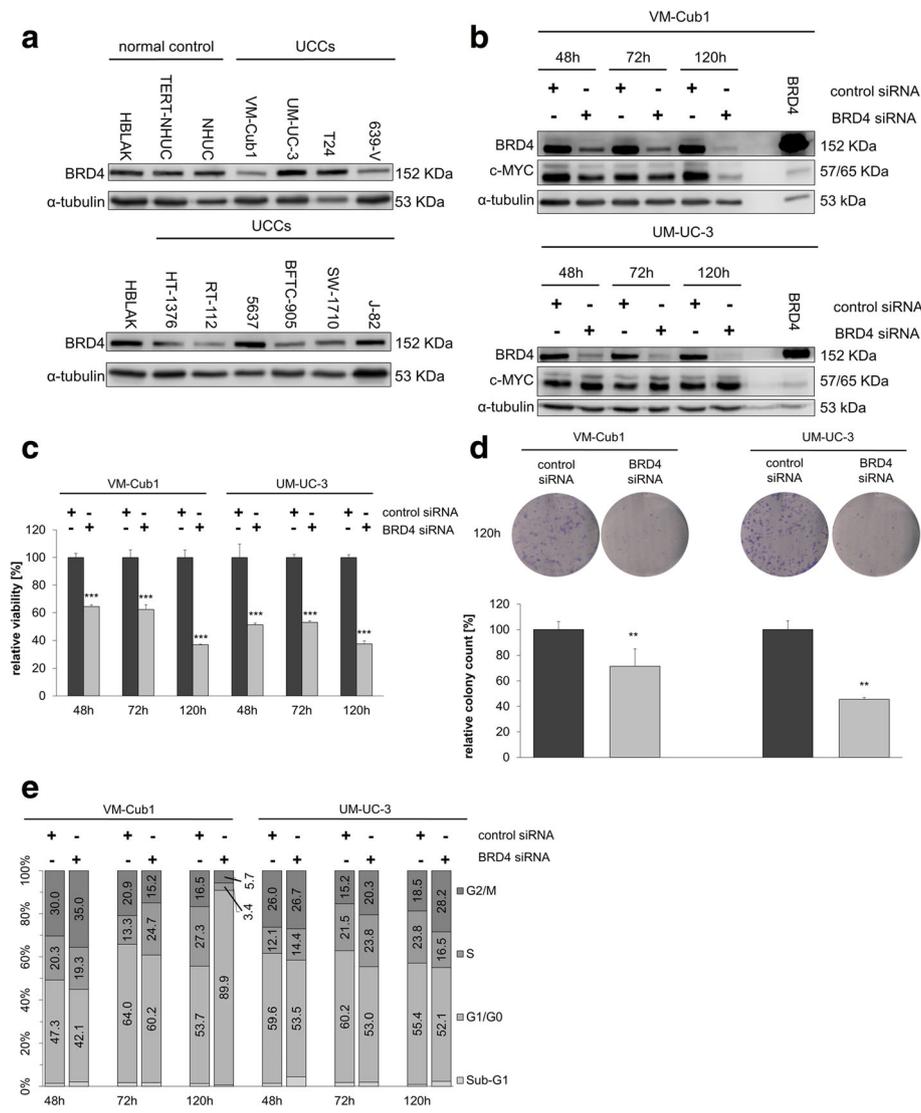


Fig. 1 Effects of BRD4 knockdown on urothelial carcinoma cell lines. **a** Western blot analysis of BRD4 expression in 10 UCCs compared to the benign urothelial control cell lines HBLAK, NHUC, and NHUC-TERT. α -tubulin served as a loading control. **b** Western blot analysis of BRD4 and c-MYC expression after siRNA-mediated knockdown of BRD4 in VM-Cub1 and UM-UC-3 cells. Cells transfected with BRD4 expression plasmid served as a positive control, with 3 μ g instead of 20 μ g protein loaded. **c** Relative viability of VM-Cub1 and UM-UC-3 cells after BRD4 knockdown for 48, 72, and 120 h compared to treatment with control siRNA. Relative viability is displayed on the ordinate in percent of the control cells treated with non-targeting siRNA. Differences between control and targeting siRNA were analyzed using Student's *t* test ($***p \leq 0.001$). **d** Clonogenicity assays of VM-Cub1 and UM-UC-3 cells after BRD4 knockdown for 120 h and results of quantification ($**p \leq 0.01$). **e** Flow cytometric cell cycle analysis of VM-Cub-1 and UM-UC-3 cells after BRD4 knockdown for 48, 72, or 120 h. Percentages of cells in the respective cell cycle phase are given

Similarly, primary cancer cell cultures established from patient tissues responded strongly towards combined treatment resulting in strong synergies (Additional file 2). In contrast, only a limited synergy of the combined treatment was seen with benign HBLAK cells (Fig. 2a).

Next, we compared the effects of single and combined treatment on cell proliferation and apoptosis. Dosages for the combined treatment were chosen from synergistic combinations and mostly below individual IC_{50} s (Table 1).

Single treatment with JQ1 alone diminished clonogenic growth of the more sensitive VM-Cub1 cells (Fig. 2b), whereas the less sensitive UM-UC-3 cells readily formed colonies. Clone formation by benign HBLAK cells was rather unaffected. Next, we evaluated the combination of JQ1 and Romidepsin in two more (VM-Cub1 and T24) and two less (UM-UC-3 and 639-V) JQ1-sensitive UCCs and in HBLAK as a benign urothelial control. The combination treatment synergistically suppressed long-term proliferation

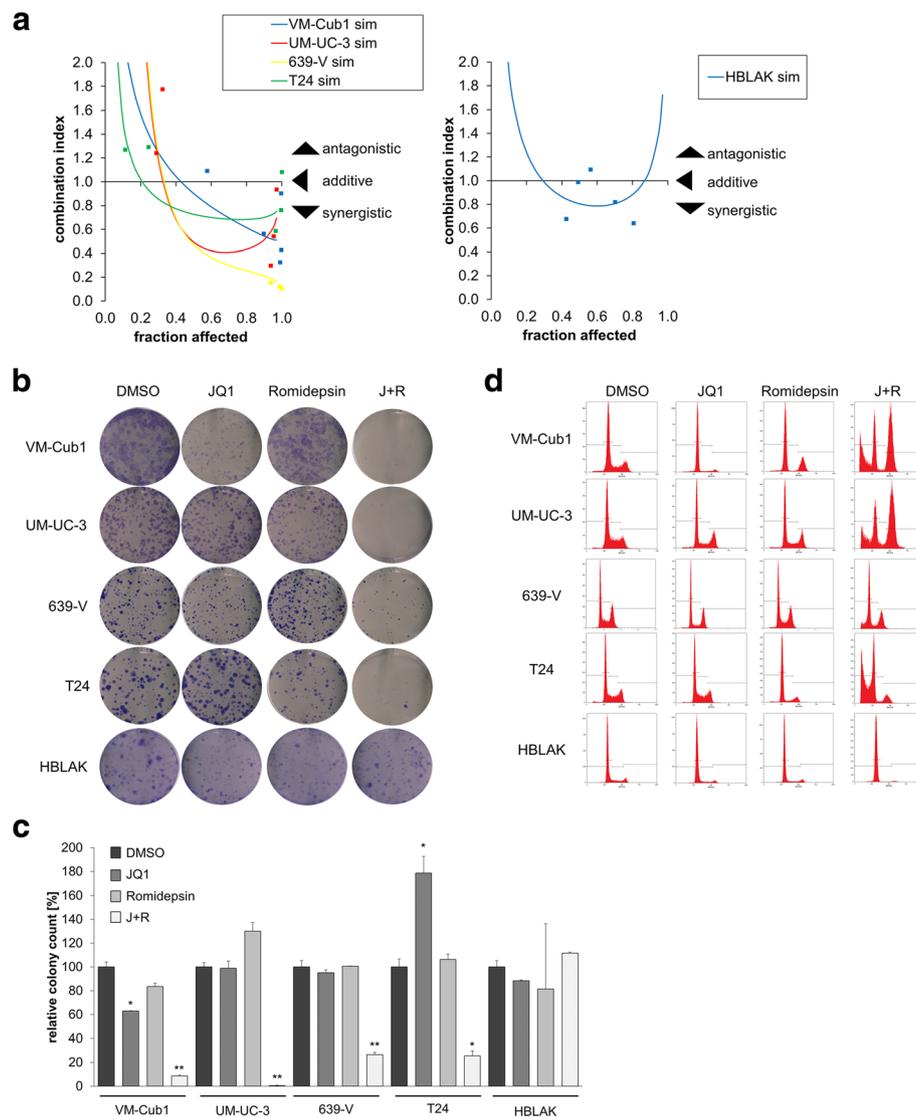


Fig. 2 Effects of combined treatment with JQ1 and Romidepsin on proliferation and clonogenic growth of UCCs. **a** Combination index (CI/Fa) plots for the combination of JQ1 and Romidepsin. Cell viability was measured at five constant dose ratio experimental data points by ATP assay after 72-h treatment. CI plots were then generated using CompuSyn software. CI < 1 indicates synergism. Benign HBLAK cells were compared to four UCCs. **b** Clonogenicity assay following treatment for 48 h with JQ1, Romidepsin, or both compounds compared to DMSO as indicated in Table 1 (lower part). **c** Quantification of colony counts from clonogenicity assays. Differences between control and treated cells were analyzed using Student's *t* test (** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$). **d** Flow cytometric cell cycle analyses following the indicated treatment for 48 h in four different UCCs and in HBLAK cells. See Additional file 3 for cell numbers in the respective cell cycle phases

of all four UCCs (at least 4-fold compared to DMSO; Fig. 2b, c), much more strongly than each inhibitor alone at the same doses (at least 3.5-fold compared to single treatments; Fig. 2b, c). Remarkably, no significant inhibition of clonogenic growth was observed in HBLAK cells.

To characterize the cellular effects of the drug combination in more detail, we performed cell cycle analysis by flow cytometry. Treatment with JQ1 alone led to accumulation of cells in the G0/G1-phase and a decreased S-phase fraction in most UCCs (Fig. 2d, Additional file 3),

except in UM-UC-3, where an increased G2/M fraction was observed. The subG1 fraction increased slightly in several, albeit not in all UCCs. HBLAK cells were likewise arrested in G0/G1, with decreased S-phase fraction, but no increased subG1 fraction. Cell cycle distribution changes after treatment with JQ1 were very similar to those after BRD4 knockdown (see Fig. 1e). Likewise, UCCs responded towards single treatment with Romidepsin by accumulating in G0/G1 or G2/M (Fig. 2d) in accord with our previous results [4].

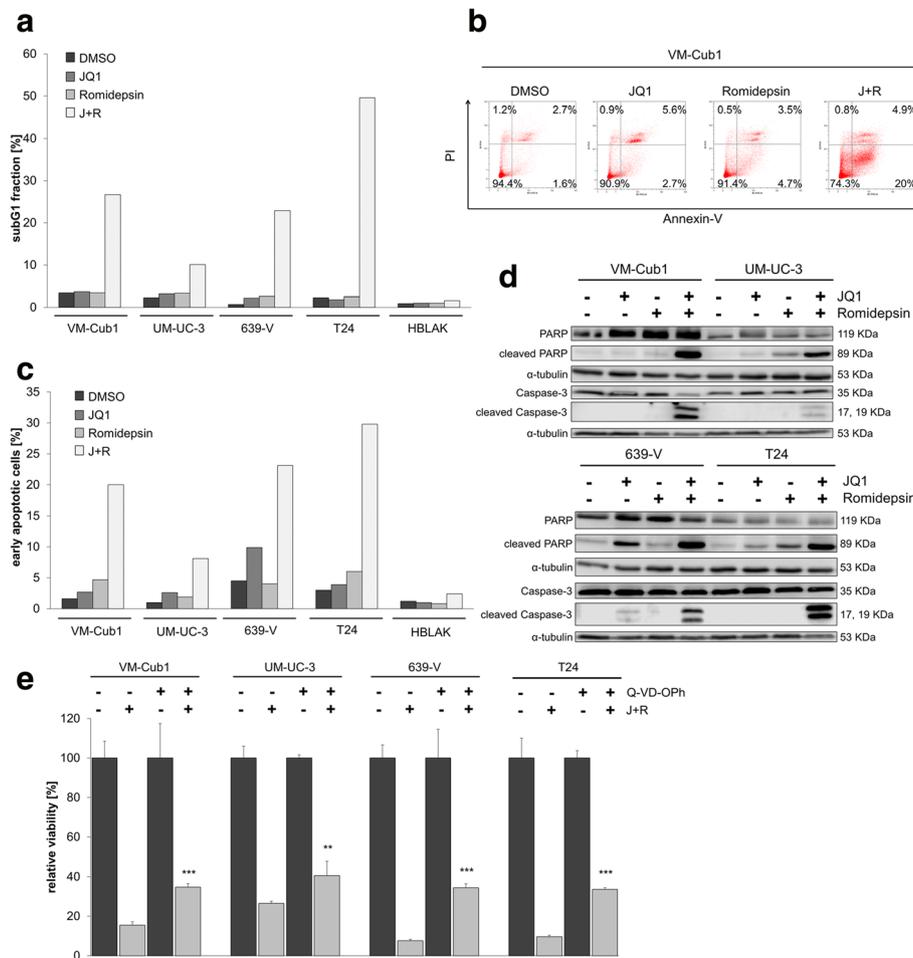


Fig. 3 Induction of apoptotic cell death by combined treatment with Romidepsin and JQ1. **a** Increase of subG1 fraction by combination treatment as determined by flow cytometry. **b** Flow cytometric analysis of UCCs with indicated treatment (Table 1 lower part) after combined staining with PI and Annexin V. Percentages of viable (lower left), early (lower right), or late (upper right) apoptotic and necrotic (upper left) VM-Cub1 cells subsequent to indicated treatments. **c** Percentage of early apoptotic cells as measured by Annexin V staining for all UCCs and HBLAK control cells are displayed in bar graphs for the respective treatment. **d** PARP and Caspase-3 cleavage 48 h after treatment assessed by Western blot analysis. **e** Four UCCs received the combination treatment with or without the Pan-Caspase inhibitor Q-VD-Oph at 30 $\mu\text{mol/l}$. All cells received the same concentration of DMSO. Cell viability displayed on the ordinate was measured by ATP assay after 48 h. Differences between J + R treatment and J + R treated plus Caspase inhibitor were analyzed using Student's *t* test (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$)

In contrast, combination treatment resulted consistently in a strong increase of the subG1 fraction across all four UCCs (Fig. 3a), whereas the number of S-phase cells was reduced dramatically, indicating cell cycle inhibition and cell death (Fig. 2d, Additional file 3). Although the cell lines reacted rather uniformly in so far, they differed in the cell cycle phase, in which they became arrested. Whereas VM-Cub1 and UM-UC-3 cells showed a strong G2/M increase with decreased G0/G1 cells, 639-V and T24 cells displayed an increased G0/G1 fraction (Fig. 2d, Additional file 3). HBLAK cells arrested in G0/G1 with a remarkable decrease of the S-phase and G2/M fractions. Notably, the combination induced a subG1 fraction much more prominently than either agent on its own in UCC, but not in HBLAK cells (Fig. 3a).

Combination treatment causes apoptotic cell death

The increased subG1 fractions and according morphological changes in cell morphology indicated that combination treatment elicited pronounced apoptosis. Concordantly, the number of early apoptotic cells determined by Annexin V staining (Fig. 3b, c and Additional file 4) as well as cleaved Caspase 3 and cleaved PARP were significantly enhanced (Fig. 3d). These markers of apoptosis were not or only weakly induced by either a single drug treatment. Of note, induction of apoptosis was less pronounced in UM-UC-3 compared to the other UCCs. Moreover, cytotoxicity of the combination treatment was partly prevented by the Pan-Caspase inhibitor Q-VD-Oph in all four UCCs (Fig. 3e) indicating that the combination treatment efficiently elicited caspase-dependent apoptosis.

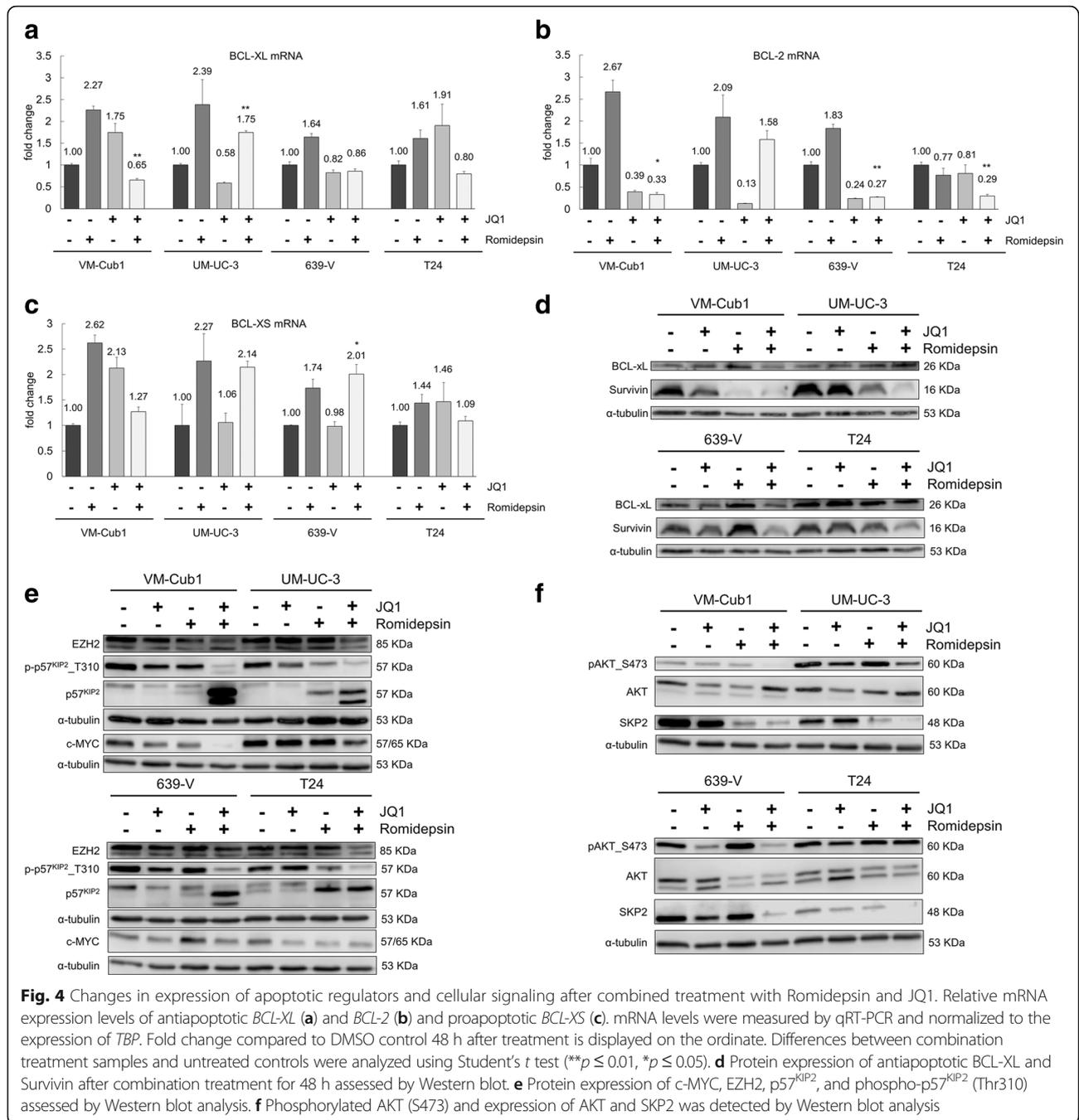


Fig. 4 Changes in expression of apoptotic regulators and cellular signaling after combined treatment with Romidepsin and JQ1. Relative mRNA expression levels of antiapoptotic *BCL-XL* (a) and *BCL-2* (b) and proapoptotic *BCL-XS* (c). mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized to the expression of *TBP*. Fold change compared to DMSO control 48 h after treatment is displayed on the ordinate. Differences between combination treatment samples and untreated controls were analyzed using Student's *t* test (***p* ≤ 0.01, **p* ≤ 0.05). **d** Protein expression of antiapoptotic BCL-XL and Survivin after combination treatment for 48 h assessed by Western blot. **e** Protein expression of c-MYC, EZH2, p57^{KIP2}, and phospho-p57^{KIP2} (Thr310) assessed by Western blot analysis. **f** Phosphorylated AKT (S473) and expression of AKT and SKP2 was detected by Western blot analysis

Concurring, mRNA expression of the antiapoptotic regulators BCL-XL (Fig. 4a) and BCL-2 (Fig. 4b) was diminished by combination treatment in UCCs, again with the exception of UM-UC-3. Expression of BCL-XS was either increased or remained unchanged (Fig. 4c). Similarly, the antiapoptotic BCL-XL and Survivin proteins were generally downregulated by the combination treatment (Fig. 4d). These anti-apoptotic proteins were not consistently downregulated by either single agent and in some cases actually induced. Thus, in contrast

to single drug treatments, combined treatment led to stronger and more consistent downregulation of antiapoptotic regulators. This downregulation was less pronounced in UM-UC-3, presumably accounting for the weaker apoptotic response in this cell line.

Expression of c-MYC and EZH2, which have previously been identified as targets of BRD4 knockdown and JQ1 treatment mediating cell cycle arrest and apoptosis [10], were likewise clearly diminished following combined treatment (Fig. 4e).

JQ1 and Romidepsin synergistically induce p57^{KIP2} by various mechanisms

Since the cell cycle regulator protein p57^{KIP2} (encoded by the *CDKN1C* gene, hereafter p57) had been reported to mediate synergistic induction of apoptosis by combined HDAC and BET inhibition in pancreatic ductal adenocarcinoma [8], we evaluated its expression in four UCCs after treatment. p57 mRNA was induced between 17-fold (T24) and up to 1000-fold (VM-Cub1) by combination treatment. It was also induced regularly, but to a smaller extent, by Romidepsin, but not consistently by JQ1 (Additional file 5). Western blot analysis revealed a double band around the predicted molecular weight, of which especially the lower band was strongly induced by the combination treatment (Fig. 4e). The upper band likely reflects a phosphorylated isoform generated by active AKT protein kinase which is destined to degradation via a SKP2-containing E3 ubiquitin ligase complex. Accordingly, a (T310) phospho-specific p57 antibody demonstrated loss of phosphorylated p57 following combination treatment, indicating accumulation of the more stable unphosphorylated p57 protein (Fig. 4e).

Accordingly, active pAKT was diminished in three of four cell lines by JQ1 single treatment, but particularly strongly by combined treatment (Fig. 4f). SKP2 expression, too, was strongly downregulated in all four cell lines by the combination treatment. VM-Cub1 cells displayed the strongest induction of p57 protein and mRNA and the most pronounced decrease in its negative regulators c-MYC, pAKT, and SKP2. Conversely, T24 cells displayed the weakest increase of p57 protein and pAKT levels remaining unchanged. These findings suggest that, in addition to increased transcription of *CDKN1C*, stabilization of p57 contributes to its accumulation. Of note, reduced activity of AKT by combined treatment is likely to diminish pro-survival signaling in UCCs by other pathways as well.

STAT3 activation may also be involved in regulation of cell cycle progression and anti-apoptotic response and had been reported to be inactivated by combined HDAC and BET inhibition in pancreatic ductal adenocarcinoma [8]. However, we neither observed significant changes in STAT3 phosphorylation nor expression after combined treatment with JQ1 and Romidepsin (Additional file 6).

Gene editing of p57^{KIP2} in UCC

To investigate to which extent p57 contributes to apoptosis induction by combined treatment in UCCs, we generated VM-Cub1 p57 knockout clones by CRISPR/Cas9-mediated gene editing. In contrast to the parental cells, p57 protein remained undetectable in cell clones with successful knockout even after combined treatment (Fig. 5a). Surprisingly, however, p57 knockout did not rescue the cells from induction

of cell death; viability was instead further decreased (Fig. 5b) and cleaved PARP was enhanced (Fig. 5a). Colony formation assays displayed concurring results (Fig. 5c), as did cell cycle analysis. Double treatment of p57 knockout cells disrupted the cell cycle completely, and the majority of cells died rapidly (Fig. 5d, Additional file 3).

Combination treatment strongly increases histone acetylation around transcriptional start sites

To follow the effects of the drug combination on the chromatin level, we analyzed changes in histone acetylation. Overall, acetylation of histones H3 and H4 increased after treatment with Romidepsin alone, but was further enhanced by combination treatment (Fig. 6a). We further analyzed H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation, which are established markers for active transcription, around the transcriptional start sites of six genes affected by the drug combination using chromatin immunoprecipitation (ChIP). ChIP results for acetylated H3K27 revealed a broad and strongly enhanced enrichment of acetylation after combined treatment encompassing at least 2 kb upstream of the transcriptional start site (TSS) to 2 kb downstream of the TSS of all six investigated genes (Fig. 6b). By comparison, treatment with Romidepsin alone did not significantly increase H3K27 acetylation compared to DMSO controls. Strikingly, H3K4 trimethylation was increased at the TSS of *BCL2*, *CDKN1C/p57*, and *SKP2* genes after treatment with JQ1 alone, but decreased, mostly significantly, at the TSS of genes downregulated by the combination treatment.

Discussion

In this study, we examined the efficacy of a combination treatment with small-molecule inhibitors of chromatin regulators in urothelial carcinoma cell lines. In previous studies, we had identified HDAC class I-specific inhibitors like Romidepsin to be the most efficient HDAC inhibitors in UC. However, as this treatment did not induce apoptosis straightforwardly and did not appear particularly selective for tumor cells, we searched for a second drug for an improved combination therapy [2, 4]. Here, we combined Romidepsin with the BET inhibitor JQ1, which had been proposed to synergize with HDACi in several cancer types and to induce a canonical apoptotic response [22]. To our knowledge, the particular combination of Romidepsin and JQ1 has only been investigated by Jostes et al. in testicular cancer cell lines. These authors reported about reduced tumor burden even at lower and less frequent doses in xenograft experiments [6]. Other studies to date applied mainly pan-HDAC inhibitors like panobinostat or SAHA [23–25].

The results of our current study clearly demonstrate a significant synergistic effect on cell proliferation and

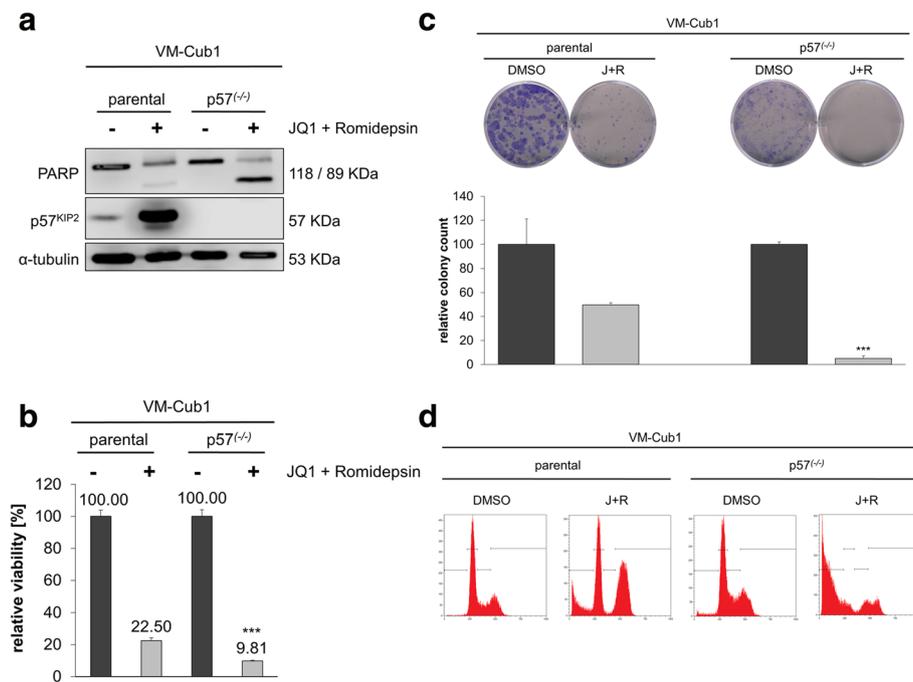


Fig. 5 Effect of *p57^{KLIP2}* gene knockout on induction of apoptosis by combination treatment. **a** Protein expression of p57 and PARP1 in parental and knockout VM-Cub1 cells with or without combination treatment. **b** Relative viability of VM-Cub1 parental and *p57* knockout cells after combination treatment. Differences between samples with combination treatment of parental and knockout cells were analyzed using Student's *t* test (***p* ≤ 0.001). **c** Examples of clonogenicity assay, with quantified colony counts (***p* ≤ 0.001) and **d** cell cycle analysis for the indicated cells following combined inhibitor treatment. See Additional file 3 for cell numbers in the respective cell cycle phases

prominent apoptotic cell death for the combination of the BET protein inhibitor JQ1 and the HDAC class I-specific inhibitor Romidepsin. As UC cells are quite resistant to apoptosis induction under many conditions, we were especially interested in characterizing these cellular effects.

A pioneer study on the efficacy of single treatment with JQ1 alone in two related UC cell lines (T24 and EJ) provided first direct evidence that UC cells may be dependent on BRD4 [10]. shRNA mediated knockdown in the respective cells, decreased cell viability in a time-dependent manner (72 h), and induced cell cycle arrest in G0/G1 phase. In addition, in vivo tumor growth was reduced by BRD4 inhibition in a xenograft mouse model. We also found BRD4 overexpressed in some of the 12 investigated UC cell lines compared to benign urothelial cells, but overexpression was not uniformly observed, indicating that T24 may not be representative for all UC cell lines. Indeed, in our study, siRNA-mediated knockdown of BRD4 in both VM-Cub1 and UM-UC-3 cells resulted in a time-dependent reduction of cell viability and long-term proliferation, but the cells responded differentially with respect to cell cycle arrest. VM-Cub1 cells displayed the expected arrest in G0/G1, whereas UM-UC-3 arrested in G2/M. In many further functional assays, we likewise observed that UM-UC-3 cells responded differently or less efficiently,

e.g., with regard to induction of apoptosis. Similar heterogeneity of BRD4 expression and response to BRD4 inhibition may occur in cancer patients due to the pronounced heterogeneity of urothelial carcinoma. This prompted us to characterize the response of UC towards single and combined treatment more comprehensively across different cell lines.

Indeed, our investigations on the cellular effects of pharmacological BRD4 inhibition in eight UC cell lines chosen to represent the heterogeneity of urothelial carcinoma demonstrated that the previously reported results on T24 [10] cannot be simply extended to all UC cell lines. Instead, dose-response curves for JQ1 in eight UC cell lines demonstrated that they could be clearly classified into two groups with low and high sensitivity and that not all UCCs are as sensitive as T24. The differential sensitivity was not related to BRD4 protein expression or any other obvious characteristics of the cell lines and remains to be further investigated.

Like T24 in the study by Wu et al. [10], most cell lines accumulated in G0/G1 following treatment with IC₅₀ doses of JQ1 (0.18–6.8 μM), but UM-UC-3 accumulated in G2/M. At these doses, we detected only a slight increase of the subG1-fraction. Comparable results were reported for colon cancer and medulloblastoma cells, which arrested in G0/G1 after treatment with

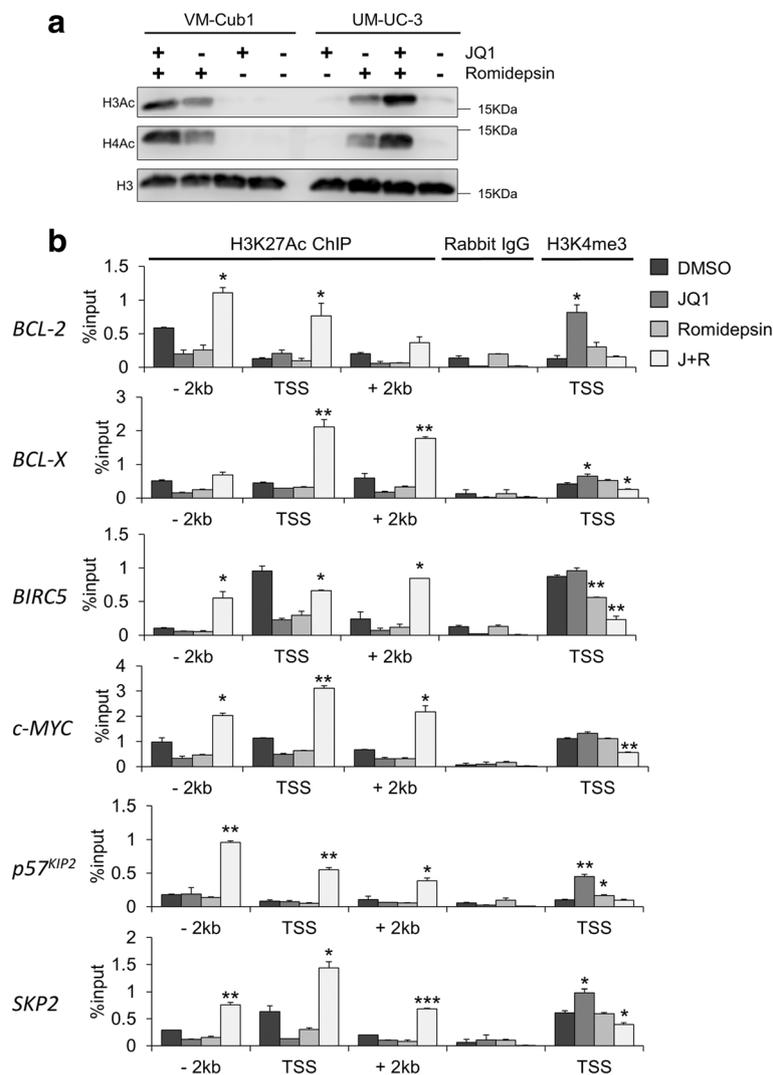


Fig. 6 Changes in histone modifications elicited by combination treatment. **a** Changes in H3 and H4 acetylation were detected after single and combined treatment in VM-Cub1 and UM-UC-3 cells by acid histone extraction and Western blot analysis. Total histone 3 served as a loading control. **b** Chromatin immunoprecipitation analysis of H3K27 acetylation at transcriptional start sites (TSS) as well as 2 kb upstream (-2 kb) and 2 kb downstream (+2 kb) of *BCL-2*, *BCL2L1/BCL-X*, *BIRC5/Survivin*, *c-MYC*, *CDKN1C/p57* and *SKP2* genes after single and combined treatment of VM-Cub1 cells. Immunoprecipitated DNA amounts measured by qPCR for each condition are expressed as percentage of input DNA. Additionally, H3K4 trimethylation was analyzed at the TSS of the same genes. Rabbit IgG served as a background control. Differences between samples with combination treatment and DMSO treated cells were analyzed using Student's *t* test (***p* ≤ 0.001, ***p* ≤ 0.01, **p* ≤ 0.05)

0.1–0.5 μM JQ1 [14, 26]. However, in contrast to various other cancer cell types, JQ1 treatment alone neither significantly inhibited long-term proliferation of UCCs nor induced significant apoptosis suggesting that UC cells are generally less sensitive towards JQ1 than other tumor types [8, 14, 24, 27] and recover over time. Benign urothelial cells also arrested at rather low concentrations, but no apoptosis was observed and long-term proliferation ability was retained.

Using the Chou-Talalay method [19], we determined doses for the combined treatment with JQ1 and Romidepsin with synergistic effects on cell viability at doses

mostly lower than the IC₅₀ concentrations of either single treatment. Importantly, all UC cell lines, including those with low sensitivity to JQ1 alone like UM-UC-3 and 639-V, as well as primary tumor cultures, responded strongly to the combination treatment. The combination of JQ1 with Romidepsin was clearly more efficacious in inhibiting proliferation of UCCs than JQ1 alone. Moreover, the combination elicited apoptosis much more efficiently than either JQ1 or Romidepsin. Benign control cells were strikingly less affected suggesting that the combined treatment might achieve a higher tumor specificity with lower toxic side effects for normal

cells than single treatment with Romidepsin [4]. Accordingly, long-term proliferation was not affected in HBLAK cells, but was very strongly diminished in all cancer cell lines, again irrespective of their sensitivity towards JQ1 alone. The cell cycle was heavily disturbed, and we observed very strongly increased subG1 fractions as well as high numbers of early apoptotic cells subsequent to combination treatment in UCCs, but not in benign HBLAK cells. Similar synergistic effects on proliferation and apoptosis have been reported in pancreatic cancer, neuroblastoma, and AML cells by combination treatment using JQ1 with the pan-HDAC inhibitors SAHA (vorinostat) or panobinostat [8, 23, 24] and in melanoma cells by panobinostat and BET inhibitor I-BET151 [7]. Borbeley et al. also combined the class I-specific inhibitor mocetinostat with JQ1 for treatment of breast cancer cells [27]. Interestingly, normal melanocytes, embryonic fibroblasts, and normal hematopoietic progenitor cells were spared from apoptosis similar to HBLAK cells, again emphasizing the increased tumor specificity of the combination [7, 23, 24].

Molecular biomarkers and application of the caspase-inhibitor Q-VD-OPh confirmed that the combination treatment, other than treatment with either inhibitor alone, efficiently induced canonical caspase-dependent apoptosis in UC cells. Similar changes in apoptosis-related proteins were found in pancreatic cancer [8], neuroblastoma [23], melanoma [7], and AML cells [24]. Anti-apoptotic proteins like BCL-2 may be induced by activated STAT3 [25, 28], and in pancreatic adenocarcinoma cells, the combination of JQ1 and SAHA diminished STAT3 phosphorylation to downregulate BCL-2 [8]. However, in UC cells, we observed neither diminished phosphorylation nor decreased expression of STAT3, again indicating that the mechanisms mediating cellular effects may differ between cancer entities. Accordingly, gene expression profiles following treatment with BETi and HDACi drug combination in studies on different cancer cell types each describe hundreds of differentially expressed genes, with limited overlap, but converging on a cellular response resulting in cell cycle arrest and apoptosis [23, 27]. These relatively uniform ultimate cellular effects thus appear to be driven by cell type-dependent transcriptional programs.

In addition, suppression of AKT-mediated survival signaling is likely to contribute to the observed cell death. Diminished AKT kinase activity may especially contribute to the dramatic overexpression of p57^{KIP2} via stabilization of the protein following decreased phosphorylation priming for SKP2-mediated degradation [29, 30], as especially non-phosphorylated p57^{KIP2} accumulated. SKP2 itself was as well strongly diminished by the treatment, presumably further contributing to p57 accumulation. In accordance with other studies reporting p57^{KIP2} as a prominent factor induced in treated cells

[6, 8], we found both its mRNA and protein strongly elevated.

The function of p57 with regard to regulation of apoptosis is controversial. Obviously, p57 can prevent or promote apoptosis dependent on the cellular context [31]. Promotion of apoptosis may occur by p57 translocation into mitochondria to trigger the intrinsic apoptotic pathway [32]. In pancreatic cancer cells, depletion of p57 by shRNA decreased apoptotic markers induced by JQ1 and SAHA combination treatment; Cas9-mediated knockout of *Cdkn1c* in mice significantly diminished apoptosis of combination-treated animals [8]. In an analogous approach, we generated p57 knockout UC cells by gene editing. Intriguingly, this knockout did not rescue the cells from apoptosis induced by combination treatment. This finding underlines the context-dependent function of p57 on the one hand. On the other hand, it supports again the idea that compounds like JQ1 targeting general transcriptional regulators do rarely act through their effect on a single gene but elicit broad effects on the transcriptome which are cell type-dependent due to the respective transcriptional programs [5]. For instance, in other studies, suppression of c-MYC was proposed to be the central event mediating effects in the treated cells, but forced overexpression of this supposedly crucial target gene failed to rescue all phenotypes [5]. In this respect, we note that downregulation of c-MYC was observed in all UCCs treated with the drug combination, but that its extent varied.

Recent publications have suggested a mechanism for the downregulation of oncogenic and anti-apoptotic factors like c-MYC or BCL-2 after combined treatment with HDAC and BET inhibitors [23, 33]. HDAC inhibitor treatment induces histone hyperacetylation, as also observed in UC cells. Genes undergoing hyperacetylation of H3K27 within a 5 kb region around their transcriptional start site by this treatment appear to become particularly dependent on binding of BET proteins like BRD4 to their regulatory regions, including enhancers, to promote gene transcription. Accordingly, genes activated by HDAC inhibitor treatment were reported to be enriched for BRD4 [33]. Abolishment of BRD4 binding by JQ1 then leads to their transcriptional inactivation. This mechanism has been proposed for combined treatment with 4SC-202, Entinostat, or mocetinostat [27, 33], all of which predominantly target class I HDAC isoenzymes, similar to Romidepsin. Indeed, Romidepsin alone resulted also in activation of anti-apoptotic factors like BCL-2 and BCL-X in UC cells, suggesting that this mechanism also applies in our experimental setting. Accordingly, ChIP analysis revealed broad H3K27 hyperacetylation around the transcriptional start sites of all investigated genes after combined treatment, which would render them sensitive to transcriptional repression by JQ1. Consequently, H3K4

trimethylation, a marker for transcriptionally active genes, was significantly reduced at the TSS of four genes down-regulated by combination treatment in UC cells. Notably, Mishra et al. [33] reported globally increased H3K4me3 at the TSS of genes upon treatment with the HDAC inhibitor 4SC-202, which—different from Romidepsin—additionally inhibits the LSD1 histone demethylase.

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that the combination of JQ1 and Romidepsin exerts strong synergistic antineoplastic effects on urothelial carcinoma cells. Due to the strong synergy, the applied doses were well below the IC₅₀ doses of the single treatments and affected benign control cells only mildly. UC cells are often particularly resistant towards induction of caspase-dependent apoptosis [34]. Therefore, this novel combination treatment constitutes a promising approach for a small-molecule therapy of UC with reduced toxic side effects to normal cells.

Additional files

Additional file 1: Information on primer sequences and antibodies. Sequence information and amplicon sizes for qRT-PCR and ChIP qPCR primers as well as product information and dilution of applied antibodies are given. (PDF 271 kb)

Additional file 2: Data on synergistic effects on cell viability of primary cancer cells by combined treatment with Romidepsin and JQ1. (a), (b) Relative viability of primary cultures 1 and 2 established from primary tumor tissue of two different patients after single or combined treatment for 48 h. Relative viability is displayed on the ordinate in percent of the control cells treated with DMSO. (c) Primary culture 2 was used for an extended dose response curve analysis after 24 h to perform Chou-Talalay calculations ($***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$, $*p \leq 0.05$). (d) Combination index (CI/Fa) plot for the combination of JQ1 and Romidepsin. Cell viability was measured at five constant dose ratio experimental data points by ATP assay for primary culture 2. CI plots were then generated using CompuSyn software. CI < 1 indicates synergism. (PDF 293 kb)

Additional file 3: Detailed flow cytometry results from cell cycle analysis. Displayed are percentages of cells in the indicated cell cycle phase as measured by flow cytometric cell cycle analyses following the indicated treatment for 48 h in four different UCCs and in HBLAK cells (Fig. 2d) or in VM-Cub1 knockout cells (Fig. 5d). (PDF 177 kb)

Additional file 4: Data on induction of apoptotic cell death by combined treatment with Romidepsin and JQ1. Induction of apoptotic cell death by combined treatment with Romidepsin and JQ1. Flow cytometric analysis of UCCs with indicated treatment after combined staining with PI and Annexin V. Percentages of viable (lower left), early (lower right), or late (upper right) apoptotic and necrotic (upper left) VM-Cub1 cells subsequent to indicated treatments. (PDF 1052 kb)

Additional file 5: Data on expression changes of $p57^{KIP2}$ mRNA by combination treatment in UC cells. Relative mRNA expression levels of $p57^{KIP2}$ mRNA after single and combined treatment with Romidepsin and JQ1. mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized to the expression of TBP. Fold change compared to DMSO control 48 h after treatment is displayed on the ordinate. (PDF 100 kb)

Additional file 6: Data on STAT3 activation and expression after combination treatment in UC cells. Phosphorylated and total STAT3 protein was detected by Western blot analysis in four UC cell lines cells after indicated treatment. α -tubulin served as an additional loading control. (PDF 216 kb)

Abbreviations

BET: Bromodomain and extra-terminal; CI: Combination index; Fa: Fraction affected; HDAC: Histone deacetylase; HDACi: HDAC inhibitor; NHUC: Primary normal human urothelial cells; PVDF: Polyvinylidene difluoride; TSS: Transcriptional start site; UC: Urothelial carcinoma; UCC: Urothelial carcinoma cell

Acknowledgements

The authors thank Julia Lachner and Ananda A. Jaguva Vasudevan for the help with some experiments and Marija Lenzen for the technical assistance.

Funding

AH was supported by a fellowship of the Duesseldorf School of Oncology (funded by the Comprehensive Cancer Centre Duesseldorf/Deutsche Krebshilfe and the Medical Faculty Heinrich-Heine-University Duesseldorf). MP and GN were supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (NIE 1398/1-1).

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary files).

Authors' contributions

WAS, MJH, and GN designed the study. AH, MP, and MJH performed the experiments and analyzed and interpreted the data. AH, MJH, WAS, and GN wrote the manuscript. Project administration and funding acquisition was done by WAS, MJH, and GN. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 12 June 2017 Accepted: 15 December 2017

Published online: 04 January 2018

References

1. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507:315–22.
2. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Schulz WA, Niegisch G. HDACs and HDAC inhibitors in urothelial carcinoma—perspectives for an antineoplastic treatment. *Curr Med Chem*. 2017;24:4151–65. epub
3. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Kohlhof H, Schulz WA, Niegisch G. Evaluation of the therapeutic potential of the novel isotype specific HDAC inhibitor 4SC-202 in urothelial carcinoma cell lines. *Target Oncol*. 2016;11:783–98.
4. Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Kohrer K, Arent T, Schulz WA, et al. Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms. *Mol Cancer Ther*. 2016;15:299–312.
5. Bhadury J, Nilsson LM, Muralidharan SV, Green LC, Li Z, Gesner EM, et al. BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:E2721–30.
6. Jostes S, Nettersheim D, Fellermeier M, Schneider S, Hafezi F, Honecker F, et al. The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2016;21:1300–14.
7. Heinemann A, Cullinane C, Paoli-Iseppi R, Wilmott JS, Gunatilake D, Madore J, et al. Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling. *Oncotarget*. 2015;6:21507–21.
8. Mazur PK, Herber A, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sanchez-Rivera FJ, et al. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a

- potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Med.* 2015;21:1163–71.
9. Posternak V and Cole MD. Strategically targeting MYC in cancer [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):408 (doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.7879.1>).
 10. Wu X, Liu D, Tao D, Xiang W, Xiao X, Wang M, et al. BRD4 regulates EZH2 transcription through upregulation of C-MYC and represents a novel therapeutic target in bladder cancer. *Mol Cancer Ther.* 2016;15:1029–42.
 11. Yan Y, Yang F-Q, Zhang H-M, Li J, Li W, Wang G-C, et al. Bromodomain 4 protein is a predictor of survival for urothelial carcinoma of bladder. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:4231–8.
 12. Devaiah BN, Case-Borden C, Geggone A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, et al. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23:540–8.
 13. L-I F, Tian M, Li X, Li J-j, Huang J, Ouyang L, et al. Inhibition of BET bromodomains as a therapeutic strategy for cancer drug discovery. *Oncotarget.* 2015;6:5501–16.
 14. Venkataraman S, Alimova I, Balakrishnan I, Harris P, Birks DK, Griesinger A, et al. Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma. *Oncotarget.* 2014;5:2355–71.
 15. Hoffmann MJ, Koutsogiannouli E, Skowron MA, Pinkerneil M, Niegisch G, Brandt A, et al. The new immortalized uroepithelial cell line HBLAK contains defined genetic aberrations typical of early stage urothelial tumors. *Bladder Cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2016;2:449–63.
 16. Swiatkowski S, Seifert H-H, Steinhoff C, Prior A, Thievensen I, Schliess F, et al. Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines. *Exp Cell Res.* 2003;282:48–57.
 17. Koch A, Hatina J, Rieder H, Seifert HH, Huckenbeck W, Jankowiak F, et al. Discovery of TP53 splice variants in two novel papillary urothelial cancer cell lines. *Cell Oncol (Dordr).* 2012;35:243–57.
 18. Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW, et al. The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol.* 2011;31:2641–52.
 19. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzym Regul.* 1984;22:27–55.
 20. Isono M, Hoffmann MJ, Pinkerneil M, Sato A, Michaelis M, Cinat J, et al. Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:1.
 21. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc.* 2007;2:1445–57.
 22. Conery AR, Centore RC, Spillane KL, Follmer NE, Bommi-Reddy A, Hatton C, et al. Preclinical anticancer efficacy of BET bromodomain inhibitors is determined by the apoptotic response. *Cancer Res.* 2016;76:1313–9.
 23. Shahbazi J, Liu PY, Atmadibrata B, Bradner JE, Marshall GM, Lock RB, et al. The bromodomain inhibitor JQ1 and the histone deacetylase inhibitor panobinostat synergistically reduce N-Myc expression and induce anticancer effects. *Clin Cancer Res.* 2016;22:2534–44.
 24. Fiskus W, Sharma S, Qi J, Valenta JA, Schaub LJ, Shah B, et al. Highly active combination of BRD4 antagonist and histone deacetylase inhibitor against human acute myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:1142–54.
 25. Zeng H, Qu J, Jin N, Xu J, Lin C, Chen Y, et al. Feedback activation of leukemia inhibitory factor receptor limits response to histone deacetylase inhibitors in breast cancer. *Cancer Cell.* 2016;30:459–73.
 26. Zhang C, Su Z-Y, Wang L, Shu L, Yang Y, Guo Y, et al. Epigenetic blockade of neoplastic transformation by bromodomain and extra-terminal (BET) domain protein inhibitor JQ-1. *Biochem Pharmacol.* 2016;117:35–45.
 27. Borbely G, Haldosen LA, Dahlman-Wright K, Zhao C. Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6:33623–35.
 28. Ray S, Zhao Y, Jamaluddin M, Edeh CB, Lee C, Brasier AR. Inducible STAT3 NH2 terminal mono-ubiquitination promotes BRD4 complex formation to regulate apoptosis. *Cell Signal.* 2014;26:1445–55.
 29. Lo H-W. Akt destabilizes p57 (Kip2): Akt at the converging crossroad? *Cell Cycle (Georgetown, Tex).* 2013;12:870–1.
 30. Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, Yada M, Ishida N, Imaki H, et al. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10231–6.
 31. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell.* 2008;14:159–69.
 32. Vlachos P, Nyman U, Hajji N, Joseph B. The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cell Death Differ.* 2007;14:1497–507.
 33. Mishra VK, Wegwitz F, Kosinsky RL, Sen M, Baumgartner R, Wulff T, et al. Histone deacetylase class-I inhibition promotes epithelial gene expression in pancreatic cancer cells in a BRD4- and MYC-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:6334–49.
 34. Knievel J, Schulz WA, Greife A, Hader C, Lubke T, Schmitz I, et al. Multiple mechanisms mediate resistance to sorafenib in urothelial cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15:20500–17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3 Diskussion

3.1 Variierende Sensitivität von Urothelkarzinom-Zelllinien gegenüber BET-Inhibition

Bevor sich diese Arbeit der Kombination pharmakologischer BET- und HDAC-Inhibition widmete, wurden zunächst die antineoplastischen Wirkungen der BET-Inhibition allein gegenüber Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) genauer charakterisiert. Zwar war die BET-Inhibition in UCC mittels JQ1 bereits in der Arbeit von Wu et al. [148] behandelt worden. Allerdings wurden dort für die Experimente ausschließlich die beiden UCC T24 und EJ verwendet, die in der Vergangenheit als Varianten einer identischen Zelllinie identifiziert worden waren [153]. Außerdem konnte T24 weder dem basalen noch dem luminalen molekularen Subtyp des Urothelkarzinoms zugeordnet werden [154, 155]. Des Weiteren hatten Untersuchungen mit Lungenkarzinom-Zelllinien [156] sowie Lymphom-Zelllinien [157] das Bild stark variierender Sensitivität verschiedener Zelllinien derselben Tumorentität gegenüber BET-Inhibition ergeben. Vor diesem Hintergrund erschien die BET-Inhibition in UCC noch unzureichend charakterisiert.

Die Behandlung mit JQ1 und die Bestimmung der mittleren halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von acht UCC, die ein breiteres Spektrum von Subtypen des UC repräsentieren, sowie von zwei benignen Kontroll-Zelllinien offenbarten tatsächlich eine stark variierende Sensitivität auch bei den UCC [158]. Analog zu den Untersuchungen an Lungenkarzinom-Zelllinien von Lockwood et al. [156] lassen sich die UCC grob in zwei Gruppen sensibler und resistenter Zelllinien sortieren, deren IC_{50} sich mindestens um das Zehnfache unterscheidet. Die beiden Kontroll-Zelllinien HBLAK und TERT-NHUC zählten zu den stärker sensiblen Zelllinien. Anders als Wu et al. [148] konnten wir durch die Analyse der BRD4-Expression mittels Western-Blot keine Überexpression von BRD4 in den UCC verglichen mit den Kontroll-Zelllinien nachweisen. Außerdem wurde auch kein Zusammenhang zwischen BRD4-Expression und Sensitivität gegenüber JQ1 deutlich.

In der Literatur wird der Wirkmechanismus der BET-Inhibition häufig mit der Herabregulation von Onkogenen wie MYC [159] und BCL-2 [160] in Zusammenhang gebracht. In vergleichenden Experimenten verwendeten wir mit VM-Cub1 und UM-UC-3 jeweils exemplarisch einen Vertreter gegenüber BET-Inhibition hoch oder wenig sensibler

UCC. In den sensitiveren VM-Cub1-Zellen ließ sich die Herabregulation von MYC sowohl nach Behandlung mit JQ1 als auch nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* von BRD4 nachweisen. Bei den weniger sensitiven UM-UC-3-Zellen hingegen war diese Herabregulation von MYC jeweils nicht nachweisbar. Das anti-apoptotische BCL-2 war jedoch in beiden UCC nach Behandlung mit JQ1 herabreguliert. Daher könnte unseren Daten zufolge eher die unterschiedlich starke MYC-Herabregulation zu der variierenden Sensitivität der UCC beitragen.

Die geringere Sensitivität der UM-UC-3-Zellen zeigte sich auch bei der Zellzyklusanalyse. Während die sensitiven VM-Cub1-Zellen nach BET-Inhibition durch JQ1 oder *Knockdown* von BRD4 in der G0/G1-Phase akkumulierten und die Zahl der Zellen in der S-Phase abnahm, kam es bei den UM-UC-3-Zellen zu einer Akkumulation in der G2/M-Phase ohne Verminderung der S-Phase. Die qualitativ sehr ähnlichen Auswirkungen des *Knockdowns* von BRD4 verglichen mit JQ1-Behandlung deuten auf eine recht spezifische Wirkung von JQ1 über BRD4 hin, andere BET-Proteine wären demnach weniger bedeutsam.

Kurimchak et al. [161] untersuchten die Resistenz gegenüber BET-Inhibition in ihrer Studie an Ovarialkarzinom-Zelllinien, bei denen sich ebenfalls eine sensitive und eine resistente Gruppe von Zelllinien herausbildete. Für die fehlende MYC-Herabregulation bei den resistenten Zelllinien machen sie eine erhöhte Aktivität des PI3-Kinase-Signalweges verantwortlich, die MYC stabilisiere. Bei den Ovarialkarzinom-Zelllinien entstehe dessen Überaktivität demnach durch veränderte Expression von Rezeptortyrosinkinasen, die auf den PI3-Kinase-Signalweg Einfluss nähmen. Gerade UM-UC-3-Zellen weisen eine *PTEN*-Deletion auf [162], die ebenfalls eine Überaktivität des PI3-Kinase-Signalweges zur Folge hat. Möglicherweise könnte diese Eigenschaft also die geringere Sensitivität der Zellen erklären.

Aus diesem Ansatz ergeben sich deutliche Zweifel an der Eignung der alleinigen BET-Inhibition als neuem Therapieansatz für das Urothelkarzinom, weil die erhöhte Aktivität des PI3-Kinase-Signalweges – meist durch Mutationen von *PI3KCA* oder Verlust von *PTEN* – geradezu charakteristisch für muskelinvasive Urothelkarzinome ist [12]. Des Weiteren konnten wir bei der Zellzyklusanalyse nach JQ1-Behandlung keine Vermehrung der subG1-Fraktion detektieren. Folglich kommt es nicht zu Zelltod in Form von Nekrose oder Apoptose als Reaktion auf die Behandlung, sondern vorwiegend nur zu einer Hemmung der Proliferation. Auch die hohe Sensitivität der Kontroll-Zelllinien, verglichen mit den UCC,

spricht gegen diesen Therapieansatz, weil sie auf mangelnde Tumorspezifität der alleinigen BET-Inhibition hindeutet.

3.2 Wirkungen kombinierter HDAC- und BET-Inhibition in verschiedenen Zellkulturmodellen

3.2.1 Synergistische antineoplastische Aktivität – Proliferation und Klonogenität

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit betraf die Wirkung der Kombination pharmakologischer HDAC- und BET-Inhibition, die an vier UCC mittels Viabilitäts- und Klonogenitätsassays untersucht wurde.

Nach Kombinationsbehandlung war die Viabilität aller vier UCC stark vermindert. Bei niedrigdosierter Behandlung kam es zum Antagonismus. Bei höherer Dosis ab etwa der Hälfte der vollen Effektstärke wurden dann überadditive oder synergistische Effekte berechnet. Diese Konstellation von Antagonismus und Synergismus bei einer Kombinationsbehandlung tritt im Allgemeinen recht häufig auf [150]. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen finden sich in der Literatur nicht. Jedoch bemerkt man pragmatisch, dass Dosierungen mit niedriger Effektstärke gerade in der Krebstherapie nicht praktikabel und die entsprechenden Werte für die klinische Anwendung deshalb irrelevant seien [150]. Das Ergebnis eines Viabilitätsassays nach der Behandlung mit Zytostatika kommt allerdings durch die Überlagerung zweier Phänomene zustande: Inhibition der Proliferation und Zytotoxizität, die zu Zelltod führt. Wenn bei niedriger Dosis eines Zytostatikums also vornehmlich die Proliferation gehemmt würde, könnte ein zweites Zytostatikum, das in niedriger Dosierung ebenfalls nur die Proliferation hemmt, den Effekt auf die Viabilität kaum weiter steigern, weil die Inhibition der Proliferation bereits ausgeschöpft wäre, sodass sich die Viabilität erst bei höheren Dosierungen, wenn es auch zu Zelltod kommt, synergistisch verringern könnte.

Obwohl die beiden Zelllinien UM-UC-3 und 639-V zu den BET-resistenten UCC gehören, ergaben die Berechnungen für diese noch stärkere Synergien als bei den BET-sensitiven VM-Cub1 und T24 [158]. Da alle vier UCC etwa gleichermaßen sensibel gegenüber HDAC-Inhibition sind [117], scheint HDAC-Inhibition UCC gegenüber BET-Inhibition zu sensitivieren.

Die Fähigkeit, bei niedriger Zelldichte Kolonien zu bilden (Klonogenität), ging bei allen vier UCC nach der Kombinationsbehandlung gleichermaßen stark verloren. Es bildeten sich lediglich sehr wenige Kolonien aus [158].

Unsere Ergebnisse zum Synergismus von HDAC- und BET-Inhibition in UCC reihen sich in die anderer Studien ein, bei denen unterschiedliche BET- und HDAC-Inhibitoren in anderen Tumorentitäten als Kombinationsbehandlung *in vitro* und *in vivo* betrachtet wurden und sich ebenfalls starke Synergismen ergaben. Die Studien betrafen gleichsam hämatologische Neoplasien wie das murine, MYC-getriebene B-Zell-Lymphom [152] und die Akute Myeloische Leukämie [163] sowie solide Tumoren wie Brustkrebs [164], Melanome [165], das duktales Pankreaskarzinom [151], das Neuroblastom [166] und Keimzelltumoren [167]. Vor diesem Hintergrund scheint die kombinierte HDAC- und BET-Inhibition sehr konsistent wirksam zu sein und könnte bei der Therapie auch der großen genetischen Heterogenität der Urothelkarzinome gerecht werden.

3.2.2 Apoptose als vorherrschender Zelltodmechanismus

Die dieser Arbeit vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe befassten sich ausführlich mit den Möglichkeiten der HDAC-Inhibition im Urothelkarzinom [168]. Lediglich bei gezielter Inhibition der Klasse-I-HDAC kam es zu stärker ausgeprägten und daher vielversprechenden antineoplastischen Effekten [117]. Obwohl sich die Behandlung dramatisch auf Viabilität, Klonogenität und besonders auf den Zellzyklus auswirkte, gelang der Nachweis der Apoptose als Zelltodmechanismus nur in geringem Maße und die Zellen gingen eher verzögert auf nicht-apoptotischem Wege zu Grunde [117].

Dieses Bild änderte sich durch die zusätzliche BET-Inhibition in dieser Arbeit grundlegend [158]. Der Nachweis von Apoptose gelang nach der Kombinationsbehandlung auf verschiedenen Ebenen. Bei der Zellzyklusanalyse bildete sich eine ausgeprägte subG1-Fraktion heraus. Durchflusszytometrisch ließ sich vermehrt eine Annexin-V-positive und gleichzeitig Propidium-Iodid-negative Zellpopulation nachweisen. Weiterhin wurde die aktivierende Spaltung der Caspase-3 sowie die Spaltung ihres Substrats PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase) im Western-Blot sichtbar. Durch pharmakologische Inhibition der Caspasen mittels Q-VD-Oph verminderte sich der Effekt der Kombinationsbehandlung etwas. Somit ist die Apoptose für einen Teil des Effektes auf die Viabilität der UCC erforderlich, der Zelltod von Apoptose abhängig. Andere Zelltodmechanismen wie Nekrose können die Inhibition der Apoptose nicht vollständig kompensieren.

Diese robuste Induktion von Apoptose durch die kombinierte HDAC- und BET-Inhibition entspricht wie der Synergismus bei Viabilität und Klonogenität ebenfalls den publizierten Ergebnissen bei anderen Tumorentitäten (s.o.).

3.2.3 Unterschiede zwischen Karzinomzelllinien und Normalzellen – ein Hinweis auf Tumorspezifität?

Die Toxizität der Kombinationsbehandlung lässt sich abschließend nur durch Studien am Menschen einstufen. Durch vergleichende Behandlung von Kontroll-Zelllinien, die gesundem Urothel entspringen, lassen sich jedoch erste Tendenzen ableiten.

Wir verwendeten die Kontroll-Zelllinie HBLAK. Dort ergab sich ein Synergismus bei der Reduktion der Viabilität nur bei mittleren Effektstärken. Bei hohen Effektstärken jedoch wirkte die Kombination in HBLAK-Zellen antagonistisch. Auch Apoptose konnte bei der Zellzyklusanalyse nicht nachgewiesen werden. Stattdessen kam es zu einem bemerkenswerten Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase, während bei den UCC meist die G2/M-Fraktion stark zunahm. Im Gegensatz zu den UCC blieb zudem die Klonogenität bei den HBLAK-Zellen nach Kombinationsbehandlung erhalten, obwohl die Einzelbehandlungen die Klonogenität gering - nicht statistisch signifikant - zu reduzieren schienen. Möglicherweise reagieren Normalzellen also mit einem nach Exposition reversiblen Zellzyklusarrest, während bei UCC die Klonogenität längerfristig irreversibel beeinträchtigt wird [158]. Insgesamt ergaben sich also gewisse Hinweise auf eine Tumorspezifität der Kombinationsbehandlung.

Trotzdem müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Zum einen mussten bei der Kombinationsbehandlung deutlich niedrigere Romidepsin-Konzentrationen verwendet werden, weil die IC_{50} -Werte bei HBLAK-Zellen deutlich niedriger sind als bei UCC [117]. Zum anderen entstammen HBLAK-Zellen zwar gesunden Urothelzellen, enthalten aber trotzdem typische genetische Veränderungen, wie sie auch bei Vorstufen von Urothelkarzinomen vorkommen und sie sind insofern kein optimales Modell für gesunde Urothelzellen [118]. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob sich die Toxizität im Patienten vorwiegend am Urothel manifestieren würde, weil andere Gewebe wie bspw. das Knochenmark grundsätzlich als empfindlicher gegenüber Zytostatika gelten [169].

Mazur et al. [151] haben in ihrer Arbeit den Pan-HDAC-Inhibitor Vorinostat mit JQ1 kombiniert. Dabei wandten sie ein genetisch modifiziertes Mausmodell für das duktales Pankreaskarzinom an. Hier konnten sie keine starke Toxizität der Kombinationsbehandlung

feststellen. Die behandelten Versuchstiere wiesen nach Behandlung ein stabiles Körpergewicht auf, während die unbehandelten Versuchstiere eine Tumorkachexie entwickelten. Schäden an Leber und Nieren konnten histologisch und immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich Hinweise für moderate intestinale Toxizität. Die hämatologische Toxizität wurde nicht ermittelt. Insgesamt lebten die behandelten Versuchstiere vielfach länger als die nicht behandelten.

Interessanterweise konnten Bolden et al. [170] in ihrem Mausmodell mit induzierbarem BRD4-*Knockdown* ebenfalls intestinale Toxizität beobachten. Dabei kam es zum Verlust intestinaler Stammzellen sowie sekretorischer Zellen. Die Toxizität des BRD4-*Knockdowns* war besonders stark, wenn als Modell für DNA-Schädigung zusätzlich das Zytostatikum Doxorubicin verabreicht wurde oder eine Bestrahlung mit Gammastrahlen durchgeführt wurde. Im Anschluss an die DNA-Schädigung kam es im Gewebe zu einer gestörten Regeneration. Die Autoren schlussfolgern daraus die Gefahr potenzieller synergistischer Toxizität bei zeitnaher Anwendung von BET-Inhibition und Chemotherapeutika, die zu DNA-Schäden führen.

In der Studie von Mazur et al. [151] veränderte sich die Überlebenszeit der Mäuse, die mit JQ1 behandelt worden waren, durch die zusätzliche Gabe von Gemcitabin jedoch nicht. Gemcitabin als DNA-schädigendes Chemotherapeutikum hätte hier auf oben beschriebene Weise mit JQ1 zusammengewirkt haben können.

Bei HDAC-Inhibition entwickeln sich reaktive Sauerstoffspezies, die ebenfalls in der Lage sind DNA-Schäden hervorzurufen [171]. Folglich könnte so die von Mazur et al. nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition beobachtete intestinale Toxizität auf die von Bolden et al. [170] postulierte Weise erklärt werden.

Pinkerneil et al. [117] konnten mittels Immunfluoreszenz DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen – wenn auch in geringer Anzahl - in UCC nachweisen, die mit Romidepsin behandelt worden waren. Demnach müsste bei klinischer Anwendung der in dieser Arbeit diskutierten Kombination von JQ1 mit Romidepsin ebenfalls mit intestinaler Toxizität gerechnet werden.

Laut Bolden et al. waren allerdings sämtliche Toxizitäten nach induzierbarer BRD4-Depletion mit dem Sistieren dieser vollständig reversibel [170], sodass therapiefreie Intervalle die Risiken möglicherweise senken könnten. Jedenfalls sollte bei zukünftigen Experimenten z.B.

mit Xenograft-Tumoren besonders auf die intestinale Toxizität der Inhibition geachtet werden.

3.3 Molekulare Mechanismen des Synergismus

3.3.1 Induktion von p57^{KIP2}

Der Zellzyklusinhibitor p57^{KIP2} (*p57 kinase inhibitor protein 2*), der von dem Gen *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase Inhibitor 1C*) codiert wird, rückte in den Fokus unserer Experimente, weil er durch die Kombinationsbehandlung markant induziert wurde.

In der Arbeit von Mazur et al. [151] zur kombinierten HDAC- und BET-Inhibition im Pankreaskarzinom wurde *CDKN1C* mittels cDNA-Microarray als das am stärksten deprimierte bzw. induzierte Gen identifiziert. Eine Induktion fand auch nach den Einzelbehandlungen statt. Bei der Kombinationsbehandlung kam es aber zu einer synergistischen Induktion des Transkripts – so wie auch die Effekte auf den zellulären Phänotyp synergistisch gesteigert wurden. Zunächst stellte man *in vitro* nach shRNA-vermitteltem *Knockdown* von *CDKN1C* eine verminderte Spaltung von PARP nach Kombinationsbehandlung fest, was auf verminderte Apoptose hindeutet. Danach überprüfte man durch *Gen-Knockout* mit CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9*) auch *in vivo*, ob die Induktion von p57^{KIP2} zur Apoptose nach Behandlung mit JQ1 und Vorinostat beitrug. Dazu verwandt wurde ein etabliertes, genetisch modifiziertes Maus-Modell für Pankreastumoren, bei dem bestimmte Keimbahnmutationen sowie künstliche Entzündungsreize unter Versuchsbedingungen sehr häufig zur Entstehung von Pankreastumoren führen. Zur Untersuchung der Funktion von p57^{KIP2} injizierte man vor der Initiation der Tumorgenese lentivirale Partikel in das Pankreas der Mäuse. Diese Partikel enthielten Plasmide, die für Cas9 kodierten sowie für eine sgRNA (*single guide RNA*), gerichtet gegen *CDKN1C*. In der Folge entwickelten sich p57^{KIP2}-negative Pankreastumoren, was später mittels Immunhistochemie bestätigt wurde. Erwartungsgemäß war auch nach Behandlung mit JQ1 und Vorinostat keine Induktion von p57^{KIP2} nachweisbar. Damit ging ein signifikant niedrigeres Niveau an gespaltener Caspase-3 einher, sodass die Hypothese aufrechterhalten werden konnte. Allerdings fehlen Daten, ob sich der *Gen-Knockout* auch negativ auf das Überleben der Versuchstiere auswirkt, sodass dieser Versuch lediglich die Rolle von p57^{KIP2} bei der Apoptose beleuchtet, jedoch nicht alle anderen antineoplastischen Effekte außer Apoptose. Die entsprechenden Versuche mit

Pankreaskarzinom-Zelllinien nach *Gen-Knockdown* von p57^{KIP2} wurden ebenfalls nur mit Blick auf den apoptotischen Marker PARP durchgeführt. Hier wären ebenfalls Experimente informativ zu den Auswirkungen auf Klonogenität, Viabilität und sonstige phänotypischen Eigenschaften der Zellen, wenn eine Induktion von p57^{KIP2} durch die Kombinationsbehandlung ausbleibt bzw. abgeschwächt wird.

Für *CDKN1C* gab es beim Urothelkarzinom eine ganz ähnliche Ausgangslage. Denn wie für das Pankreaskarzinom [151, 172] gibt es auch für das Urothelkarzinom Hinweise auf Eigenschaften von *CDKN1C* als Tumorsuppressorgen, wie verminderte Expression in Tumorproben durch verschiedene, v.a. epigenetische Mechanismen [173, 174]. In den Daten von Pinkerney et al. [117] zur Charakterisierung der Klasse-I-HDAC-Inhibition in UCC fiel *CDKN1C* ebenfalls als stark differentiell exprimiertes Gen auf. Die globale Expressionsanalyse mittels cDNA-Microarray nach Behandlung der Zelllinien UM-UC-3 und VM-Cub1 mit Romidepsin ergab eine starke Induktion des Transkriptes um das 13- bzw. 217-fache verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Auch das Hydroxamsäure-Derivat Givinostat löste eine starke Induktion aus.

In unseren Experimenten bestätigte sich die Induktion von p57^{KIP2} durch kombinierte HDAC- und BET-Inhibition in UCC [158]. Wie bei Mazur et al. [151] wurde das Transkript bereits bei den Einzelbehandlungen induziert, was sich bei der Kombinationsbehandlung jedoch noch um das Vielfache steigerte. Bei VM-Cub1-Zellen kam es zu einer Steigerung um etwa das Tausendfache. Auf Proteinebene wurde die Induktion erst nach der Kombinationsbehandlung sichtbar. Nach Kombinationsbehandlung stellten sich im Western-Blot meist mehrere, stets weiter im Gel gewanderte Banden dar, die auch Mazur et al. beschrieben haben. Sie deuteten diese als vermindert phosphorylierte Isoformen, die aufgrund verminderter Aktivität von AKT entstünden [151, 175]. Tatsächlich konnten wir in unseren Experimenten die Verminderung von an Threonin 310 phosphoryliertem p57^{KIP2} mit einem spezifischen Antikörper nachweisen [158]. Des Weiteren konnten wir wie Mazur et al. die geringere Expression von MYC nachweisen, wobei MYC wiederum die Transkription von *CDKN1C* hemmt [151, 176]. Zusätzlich detektierten wir eine deutlich verminderte Expression von SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*), welches als Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes die proteasomale Degradation von p57^{KIP2} durch Polyubiquitinierung einleitet [158, 177]. Schließlich konnten wir eine Verminderung der Histon-Methyltransferase EZH2 beobachten, für die aus einer Untersuchung mit Ovarialkarzinomzelllinien ein negativer Einfluss auf die p57^{KIP2}-Expression bekannt ist [158, 178]. EZH2 könnte auch durch die Inaktivierung des

paternalen Allels von *CDKN1C* zu der verminderten Expression beitragen [179]. Darin könnte ein weiterer epigenetischer Mechanismus der De-Repression von $p57^{KIP2}$ bestehen, neben der von Mazur et al. mittels Chromatin-Immunopräzipitation beobachteten Histon-Hyperacetylierung, die mit dem Promotor des Gens assoziiert ist und wahrscheinlich die Transkription des Gens steigert [151]. Zusammenfassend liegt $p57^{KIP2}$ auch in UCC nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition stark induziert vor. Die von Mazur et al. vorgeschlagenen Mechanismen scheinen auch in den UCC zu wirken. Zusätzlich haben wir zwei weitere mögliche Mechanismen identifiziert, die zur Induktion des Transkripts bzw. zur Stabilisierung des Proteins beitragen könnten, nämlich Verringerung von SKP2 einerseits und andererseits von EZH2. Folglich stellte sich die Frage, inwiefern $p57^{KIP2}$ zu den massiven antineoplastischen Wirkungen der kombinierten HDAC- und BET-Inhibition auf UCC beitragen könnte.

Im klassischen Sinne handelt es sich bei dem Protein um einen endogenen Inhibitor von Cyclin-CDK-Komplexen aus der CIP/KIP-Familie, der den Zellzyklus ähnlich wie die anderen Familienmitglieder $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ arretieren kann und vor allem während der Ruhephasen G0 und G1 wirkt, jedoch ab der Synthesephase des Zellzyklus kaum mehr exprimiert wird [180]. Interessanterweise haben kürzlich exogene bzw. pharmakologische CDK4/6-Inhibitoren die Therapiemöglichkeiten bei Brustkrebs erweitert, indem sie das progressionsfreie Überleben bei Patientinnen mit metastatischem und hormonrezeptorpositivem Brustkrebs verlängerten [181]. Eine Induktion endogener CDK-Inhibitoren wie $p57^{KIP2}$ durch epigenetische Inhibitoren erscheint vor diesem Hintergrund interessant, weil die endogenen CDK-Inhibitoren ähnlich wirken könnten wie die pharmakologischen. Andererseits könnte der damit verbundene Zellzyklusarrest auch negative Effekte für die Wirksamkeit von Therapien erzeugen. Waldman et al. [182] untersuchten an Kolonkarzinom-Zellen, wie sich ein Gen-*Knockout* von $p21^{CIP1}$, einem verwandten CDK-Inhibitor, auf die Sensitivität der Zellen gegenüber Gammastrahlung auswirkt. Die Gammastrahlung stand in den Experimenten stellvertretend für DNA-Schäden, wie sie auch durch Zytostatika hervorgerufen werden können. Während die $p21^{CIP1}$ -suffizienten Zellen die Gammastrahlung vielfach überlebten und - sozusagen erfolgreich - in Zellzyklusarrest übergangen, kam es bei den $p21^{CIP1}$ -defizienten Zellen vermehrt zu apoptotischem Zelltod. Versuchstiere mit Xenograft-Tumoren der Kolonkarzinom-Zellen konnten in einigen Fällen durch Gammastrahlung geheilt werden, wenn die Tumoren $p21^{CIP1}$ -defizient waren, in keinem Fall jedoch, wenn die Tumoren $p21^{CIP1}$ -suffizient waren. Der Zellzyklusarrest nach

antineoplastischen Therapien muss sich also nicht zwangsläufig positiv auf den Erfolg einer Therapie auswirken. Nach dem Ergebnis von Waldman et al. könnte der Zellzyklusarrest sogar erheblich zu limitierter Wirksamkeit und Resistenz von Krebszellen gegenüber manchen Therapieformen beitragen.

Neben seiner klassischen Rolle als CDK-Inhibitor wurde p57^{KIP2} auch direkt mit der Regulation von Apoptose nach Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit Zytostatika in Verbindung gebracht [180, 183]. Vlachos et al. [184] etablierten eine p57^{KIP2}-überexprimierende Variante der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa. Diese wies eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber dem Apoptose-Induktor Staurosporin auf, der den intrinsischen Weg der Apoptose aktiviert. Des Weiteren war der pro-apoptotische Effekt der p57^{KIP2}-Überexpression bei Staurosporin-Behandlung durch die Überexpression von BCL-2 reversibel. Außerdem konnten die Autoren eine Translokation von p57^{KIP2} in die Mitochondrien beobachten, wo es zu einer Freisetzung von Cytochrom C beitragen könnte, wobei der Nachweis über die Vermehrung von Cytochrom C in der zytosolischen Fraktion tatsächlich gelang. P57^{KIP2} könnte demnach unmittelbar pro-apoptotisch wirken, indem es die intrinsische Apoptose verstärkt.

Es existieren jedoch auch Studien, die eine anti-apoptotische Funktion von p57^{KIP2} nahelegen. In einer Studie von Ma et al. [185] führte die Behandlung von Brustkrebs-Zelllinien mit einem CDK-Inhibitor zu einer E2F-abhängigen Induktion von p57^{KIP2}. Wenn diese Induktion durch Gen-*Knockdown* mittels shRNA aufgehoben wurde, kam es zu einer deutlich stärkeren Wirkung des CDK-Inhibitors in Form einer vergrößerten subG1-Fraktion. In einer weiteren Studie von Ky et al. [186] wurde die Wirkung des HDAC-Inhibitors Vorinostat auf Kolon- bzw. Plattenepithelkarzinom-Zelllinien untersucht. Die Induktion des Transkriptionsfaktors KLF4 (*Krueppel-like factor 4*) führte wiederum zu einer Induktion von p57^{KIP2}. Sowohl nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* der KLF4- als auch der p57^{KIP2}-mRNA kam es zu einer deutlich stärker ausgeprägten Apoptose nach Behandlung mit Vorinostat. Die Autoren erklären den anti-apoptotischen Effekt von p57^{KIP2} in ihrer Studie mit der Hemmung des SAPK/JNK-Signalweges (*Stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase*) durch p57^{KIP2} auf eine in der Literatur bereits gut beschriebene Weise mittels seiner carboxyterminal gelegenen QT-Box [180, 186]. Diese Eigenschaft der QT-Box unterscheidet p57^{KIP2} von anderen CDK-Inhibitoren wie p21^{CIP1} oder p27^{KIP1}, deren QT-Boxen den SAPK/JNK-Signalweg nicht hemmen können [180].

Zusammenfassend spricht vieles dafür, dass die Rolle von p57^{KIP2} bei Initiation und Progression von Neoplasien sowie dem Ansprechen auf antineoplastische Therapien uneinheitlich ist. Es handelt sich eher um ein multifunktionales Protein, dessen Wirkung sich je nach Zelltyp sowie Kontext unterscheidet [180, 183, 187].

Um zu klären, welche Rolle p57^{KIP2} speziell bei der Induktion der Apoptose nach der Kombinationsbehandlung von UCC spielt, führten wir einen Gen-*Knockout* mit CRISPR/Cas9 bei der Zelllinie VM-Cub1 durch. Dabei verwendeten wir eine Cas9-Mutante, bei der eine der beiden katalytischen Domänen inaktiviert vorliegt, sowie zwei statt einer sgRNA, gerichtet gegen das Exon 1 von *CDKN1C*. Diese Methode war zuvor als vorteilhaft gegenüber der klassischen Variante beschrieben worden, weil hierbei weniger unspezifische Mutationen entstehen [188]. Des Weiteren vereinzelt wir die Zellen nach Transfektion und abgeschlossener Selektion. So erhielten wir monoklonale Tochterzelllinien mit definierten Mutationen im *CDKN1C*-Gen. Auf Proteinebene bestätigte sich der erfolgreiche *Knockout* des Gens [158].

Entgegen der Erwartung waren diese Zellen jedoch deutlich sensitiver gegenüber der Kombinationsbehandlung. Die Viabilität und Klonogenität gingen nach Behandlung noch stärker zurück als bei den Zellen mit unverändertem *CDKN1C*. Es ergaben sich auch Hinweise auf verstärkte anstatt auf verminderte Apoptose. So war die PARP-Spaltung noch deutlich stärker als bei den Wildtyp-Zellen, sodass das ungespaltene PARP fast vollständig verbraucht wurde. Auch der Zellzyklus war noch deutlich mehr affektiert; die einzelnen Fraktionen ließen sich bis auf eine massive subG1-Fraktion kaum mehr abgrenzen [158].

p57^{KIP2} ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die antineoplastischen Effekte in Form von Apoptose nach der Kombinationsbehandlung in UCC verantwortlich. Vielmehr könnte die Induktion von p57^{KIP2} die antineoplastischen Wirkungen sogar abmildern, indem es, ähnlich wie von Waldman et al. [182] für p21^{CIP1} gezeigt, den Eintritt in einen Zellzyklusarrest ermöglicht, der die Zellen weniger sensitiv werden lässt. Auf einen solchen Zellzyklusarrest deutet zumindest die Verteilung der Zellzyklusfraktionen hin. So bleibt nach Kombinationsbehandlung stets ein Teil der Zellen in der G1/G0-Phase, während der Anteil der Zellen in der S-Phase dramatisch abnimmt. Letztlich weist auch die verminderte Klonogenität indirekt auf einen Zellzyklusarrest hin [158]. Der erfolgreiche Zellzyklusarrest könnte insbesondere geeignet sein, um die Zellen vor den von Pinker et al. [117]

beobachteten mitotischen Störungen zu bewahren. Damit würde eine wesentliche Wirkung der Klasse-I-HDAC-Inhibition in UCC abgeschwächt werden.

Unsere Ergebnisse stehen denen von Vlachos et al. [184] entgegen, weil wir durch p57^{KIP2}-*Knockout* vermehrte statt verminderte Apoptose beobachten konnten. Möglicherweise induziert die Kombinationsbehandlung mit JQ1 und Romidepsin die Apoptose in UCC auf eine Weise, die durch p57^{KIP2} nicht unterstützt werden kann, weil in diesem Kontext unterschiedliche Faktoren beteiligt sind gegenüber der Staurosporin-induzierten Apoptose. Interessanterweise konnten wir mittels eines spezifischen p57^{KIP2}-Antikörpers in der Immunfluoreszenz neben einer moderaten intranukleären auch eine schwache extranukleäre Fluoreszenz beobachten. Nach Kombinationsbehandlung nahm die intranukleäre Fluoreszenz stark zu, während sich die extranukleäre Fluoreszenz nicht veränderte (s. Abb. A1 im Anhang). Somit könnte ein Großteil der induzierten Proteinmenge intranukleär lokalisiert sein und wäre daher nicht geeignet, auf die von Vlachos et al. postulierte Weise die Apoptose zu verstärken. Im gleichen Sinne unterscheiden sich unsere Ergebnisse auch von denen von Mazur et al. [151]. Hierfür könnte auch die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien von Urothel- bzw. Pankreas- und Zervixkarzinom verantwortlich sein; dies weist auf gewebespezifische Unterschiede in der Funktion von p57^{KIP2} hin.

Mit den Ergebnissen von Ma et al. [185] und Ky et al. [186] sind unsere jedoch sehr gut vereinbar. In weiteren Studien sollte daher nach möglichen Gemeinsamkeiten bei dem Mechanismus gesucht werden, der die Wirkung von antineoplastischen Therapien durch Induktion von p57^{KIP2} limitiert. Interessant wäre es zu untersuchen, ob die Induktion von p57^{KIP2} auch nach Behandlung mit JQ1 und Romidepsin in UCC von E2F oder KLF4 abhängig ist und inwieweit hier auch die Akkumulation von E2F1 Apoptose mitverursacht. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die inhibitorische Interaktion von p57^{KIP2} mit SAPK/JNK und die nachfolgend verminderte Phosphorylierung der Zielmoleküle des SAPK/JNK-Signalweges in UCC anti-apoptotisch wirken. Möglicherweise könnte sich so die verstärkte Apoptose nach p57^{KIP2}-*Knockout* und Kombinationsbehandlung mit JQ1 und Romidepsin in UCC erklären. Gegebenenfalls könnten p57^{KIP2} antagonisierende Therapien sogar ein therapeutisches Fenster bei Urothelkarzinomen schaffen, indem sie eine Sensitivierung für Chemotherapien oder zielgerichtete Therapien herbeiführen [186]. Hierfür liefert bspw. die Studie von Gupta et al. [189] zur Inhibition von p21^{CIP1} eine Rationale. Sie beobachteten eine Sensitivierung von Kolonkarzinom-Zellen gegenüber Telomerase-Inhibition durch p21^{CIP1}-*Knockout* sowie pharmakologischer Inhibition. Sehr ähnlich wie bei

unseren Ergebnissen zu p57^{KIP2}-*Knockout* und den epigenetischen Inhibitoren in UCC wurde die Effektivität des Telomerase-Inhibitors nach dem p21^{CIP1}-*Knockout* mittels Induktion von Apoptose potenziert.

Letztlich muss der Gen-*Knockout* als Methode kritisch hinterfragt werden. Unseren Ergebnissen könnten auch unspezifische Mutationen durch CRISPR/Cas9 zugrunde liegen. Möglich wäre auch eine allgemein erhöhte Suszeptibilität von p57^{KIP2}-*Knockout*-Zellen, die durch die Multifunktionalität des Proteins begründet sein könnte. In unseren Ergebnissen fällt bspw. eine generell verminderte Klonogenität der p57^{KIP2}-*Knockout*-Zellen verglichen mit den wildtypischen Zellen auf [158]. Daher sollten die Eigenschaften der p57^{KIP2}-*Knockout*-Zellen in weiteren Studien näher charakterisiert werden.

3.3.2 Veränderte Expression apoptotischer Regulatoren

Um die Beteiligung apoptotischer Regulatoren an der Induktion der Apoptose nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition zu evaluieren, untersuchten wir die Expression der anti-apoptischen Proteine BCL-xL und BCL-2, die zur BCL-2-Familie gehören. Außerdem wählten wir das anti-apoptische Protein Survivin aus, das von *BIRC5* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*) kodiert wird und zur IAP (*Inhibitors of apoptosis proteins*) - Familie gehört.

In der Studie zur Klasse-I-HDAC-Inhibition in UCC von Pinkerneil et al. [117] konnte eine konsistente Repression von Survivin in VM-Cub1 und UM-UC-3 Zellen nach Behandlung mit Romidepsin, Givinostat oder Vorinostat nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde Survivin wiederholt als prognostisch ungünstiger Faktor und Biomarker für das Urothelkarzinom beschrieben [190, 191]. In unseren Ergebnissen bestätigte sich die Repression von Survivin nach Behandlung mit Romidepsin in allen vier UCC auf Proteinebene. JQ1 allein verminderte die Expression von Survivin nur gering. Durch die Kombinationsbehandlung wurde Survivin überwiegend noch stärker reprimiert [158]. Folglich könnte die Repression von Survivin einen möglichen Mechanismus der Wirkung der Kombinationsbehandlung darstellen. In Folgeuntersuchungen könnte dies durch Überexpression von Survivin bestätigt werden, sofern diese den apoptotischen Phänotyp der behandelten Zellen abändern könnte.

In anderen Studien zur Kombination von HDAC- und BET-Inhibition wurden bereits Veränderungen der Expression von BCL-2 und BCL-xL beschrieben [151, 163, 165, 166,

192]. In diesen Studien kommt es bereits bei den beiden Einzelbehandlungen jeweils zu einer Repression von BCL-2 bzw. BCL-xL. In den UCC jedoch wird die BCL-2-mRNA durch Behandlung mit Romidepsin induziert – mit der Ausnahme von T24-Zellen. Durch JQ1-Behandlung wird BCL-2 erwartungsgemäß stets reprimiert. Die BCL-xL-mRNA wird ebenfalls durch die Behandlung mit Romidepsin induziert [158]. Diese Ergebnisse sind unerwartet, weil sie bisherigen Erfahrungen zur Wirkung von HDAC-Inhibitoren widersprechen. Demnach führen HDAC-Inhibitoren in anderen Entitäten durch Induktion von pro-apoptotischen Genen und gleichzeitiger Repression von anti-apoptotischen Genen eine pro-apoptotische Signatur herbei [96]. Die Induktion statt Repression von BCL-2 und BCL-xL scheint eine Eigenschaft der Urothelkarzinom-Zelllinien zu sein, die auch ein Grund für das geringe Ausmaß der Apoptose nach HDAC-Inhibition durch Romidepsin in UCC sein könnte [117].

Nach der Kombinationsbehandlung lagen die BCL-2 und BCL-xL mRNAs in unseren Experimenten dann reprimiert vor [158]. Die Kombination mit JQ1 erlaubt es folglich die Induktion durch Romidepsin zu attenuieren. UM-UC-3-Zellen bilden hier eine Ausnahme. In diesen Zellen scheint die Attenuation der Induktion dieser anti-apoptotischen Gene nach Einzelbehandlung mit Romidepsin durch die Kombinationsbehandlung nicht zu funktionieren. Stattdessen werden sie auch durch die Kombinationsbehandlung induziert. Interessanterweise sind es gerade die UM-UC-3-Zellen, bei denen der apoptotische Phänotyp nach der Kombinationsbehandlung am schwächsten ausgeprägt ist, wenn man die Spaltung von PARP und Caspase-3 im Western-Blot, den Anteil der subG1-Fraktion im Zellzyklus, den Anteil früh-apoptotischer Zellen in der Annexin-V/Propidiumiodid-Färbung und die Reversibilität der Apoptose durch den Apoptose-Inhibitor Q-VD-Oph als Maß für den apoptotischen Phänotyp zugrunde legt [158]. Diese Beobachtung legt eine hohe Bedeutung der Regulation von BCL-2 und BCL-xL durch die Kombinationsbehandlung nahe, die wichtiger als bspw. die Regulation von Survivin sein könnte, weil die Intensität des apoptotischen Phänotyps vor allem davon abzuhängen scheint, ob sich die BCL-2- bzw. BCL-xL-Induktion durch JQ1 attenuieren lässt oder nicht. Survivin hingegen wird in allen vier UCC gleichsam reprimiert, obwohl UM-UC-3-Zellen einen schwächeren apoptotischen Phänotyp zeigen. Diese Interpretation müsste durch weitere Experimente belegt werden.

Um die Veränderungen sämtlicher bekannter apoptotischer Regulatoren besser erfassen zu können, sollten analog zum Vorgehen von Bolden et al. [96] Experimente zur globalen Veränderung der Genexpression mit cDNA-Microarrays oder RNA-Seq durchgeführt werden.

So würde umfassend untersucht, ob kombinierte HDAC- und BET-Inhibition auch im Urothelkarzinom eine pro-apoptotische Signatur der apoptotischen Regulatoren der BCL-2- und IAP-Familie hervorruft und wie sich diese zusammensetzt. In anderen Studien wurden u.a. folgende Konstellationen festgestellt: bei Melanom-Zellen die Induktion des pro-apoptotischen BIM (*Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death*) [165], bei akuter Leukämie die Repression der anti-apoptotischen BCL-2 und BCL-xL sowie die Induktion des pro-apoptotischen BIM [163], in T-Zellen hingegen die Induktion des anti-apoptotischen BCL-2 [193], in Rhabdomyosarkom-Zellen die Induktion der pro-apoptotischen BIM und BMF (*Bcl2 Modifying Factor*) sowie die Repression des anti-apoptotischen BCL-xL [194] und im Glioblastom die Induktion des anti-apoptotischen MCL1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*) sowie des pro-apoptotischen NOXA/PMAIP1 (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) [195]. Zum einen wurden also in verschiedenen Tumorentitäten stets verschiedene apoptotische Regulatoren als die jeweils entscheidend durch kombinierte BET- und HDAC-Inhibition regulierten Gene identifiziert. Zum anderen waren die gleichen Regulatoren in verschiedenen Tumorentitäten teils gegengerichtet reguliert. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch den sehr verschiedenen Ursprung der Zellen bedingt. Eine alternative Erklärung könnten auch die Unterschiede bei den jeweils verwendeten Inhibitoren sein. Kim et al. [192] verwendeten jedoch in ihrer Studie an Zellen des kutanen T-Zell-Lymphoms mit JQ1 und Romidepsin die gleichen Inhibitoren. BCL-2 und BCL-xL werden trotzdem durch Romidepsin nicht – wie bei unseren Ergebnissen – induziert, sondern reprimiert, wobei JQ1 auch hier erwartungsgemäß zu einer Repression führt und die Kombinationsbehandlung diesen Effekt weiter verstärkt. Folglich sind die Unterschiede eher durch die verschiedenen Zelltypen als durch unterschiedliche Inhibitoren zu erklären.

In der Studie von Zhang et al. [195] wurde die Induktion des anti-apoptotischen MCL1 mittels cDNA-Microarrays in Glioblastom-Zellen nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition beobachtet. Funktionelle Experimente wie der siRNA-vermittelte *Knockdown* von MCL1 wiesen auf eine Steigerung der Effektivität der Kombinationsbehandlung hin. Folglich limitierte die Induktion von MCL1 die Wirkung der Kombinationsbehandlung. Die Autoren etablierten daraufhin eine Triple-Therapie mit der zusätzlichen Gabe des Kinase-Inhibitors Sorafenib, der indirekt auf verschiedenen Wegen die Expression von MCL1 vermindert. Interessanterweise führt auch die Behandlung von Urothelkarzinom-Zelllinien zu einer verminderten Expression von MCL1 [196]. Diese Triple-Therapie führte *in vitro* zu stark gesteigerter Apoptose. Anhand eines etablierten Glioblastom-Xenograft-Mausmodells wurde

die Triple-Therapie dann auch *in vivo* getestet. Während die kombinierte HDAC- und BET-Inhibition die Überlebensdauer der Versuchstiere nur bei einem der beiden von Patientenproben abgeleiteten Xenograften signifikant verlängerte, zeichnete sich die Triple-Therapie durch eine stets signifikante und deutlichere Verlängerung der Überlebensdauer aus. Auch das Tumorumfang war bei den mit der Tripeltherapie behandelten Versuchstieren signifikant kleiner als bei denen mit der dualen Kombinationsbehandlung behandelten.

Diese Studie unterstreicht eindrucksvoll wie wichtig die genaue Erfassung der Signatur der apoptotischen Regulatoren nach der Kombinationsbehandlung sein könnte, weil sie entscheidende Hinweise für zusätzliche Angriffspunkte zielgerichteter Therapien liefern kann. Offensichtlich aber sollte die Signatur zumindest für jede Tumorentität separat bestimmt werden. In Zukunft wäre es zudem möglich, nach Therapiebeginn mittels Biopsie Tumorproben zu gewinnen, um bei diesen ebenfalls die individuelle Signatur zu bestimmen. Ein Verfahren dieser Art könnte individualisierte Therapieschemata mit einem zusätzlichen Inhibitor ermöglichen, sodass die Tumorzellen gegenüber kombinierter HDAC- und BET-Inhibition sensitiviert würden. Solche Triple-Kombinationstherapien könnten es ermöglichen, die Dosis der einzelnen Inhibitoren weiter zu senken und damit die Toxizität zu verringern. Allerdings müsste auf mögliche neue kritische Toxizitäten solcher Kombinationstherapien geachtet werden, die mit steigender Anzahl der verwendeten Inhibitoren immer schwerer vorherzusehen wären.

3.3.3 Transkriptionelle Veränderungen durch Hyperacetylierung der Histone

Die Veränderung der Expression der apoptotischen Regulatoren durch kombinierte HDAC- und BET-Inhibition hin zu einer pro-apoptotischen Signatur wirft die Frage auf, welche Mechanismen zu dieser Veränderung beitragen. Da sich die Kombinationsbehandlung nicht nur auf Proteinebene, sondern gleichsinnig auch auf mRNA-Ebene auswirkt, geschieht eine Veränderung der Genexpression am wahrscheinlichsten auf Transkriptionsebene.

Wie von Pinkerneil et al. [117] bereits gezeigt, führt die Behandlung der UM-UC-3- und VM-Cub1-Zellen mit Romidepsin zu einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4. Durch Behandlung mit JQ1 hingegen bleibt die Histonacetylierung unverändert. Bei der Kombinationsbehandlung wird die Histonacetylierung jedoch noch deutlich gesteigert [158]. Es ist fraglich, ob durch die kombinierte HDAC- und BET-Inhibition allein die Aktivität der

HDAC im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Romidepsin weiter gesenkt wird. Wahrscheinlich werden eher einerseits die Histonacetyltransferasen (HAT) in ihrer Aktivität gesteigert und andererseits die HDAC durch Romidepsin gehemmt. Eine Steigerung der gesamten HAT-Aktivität durch BET-Inhibition ist jedoch in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Stattdessen beschreiben Wu et al. [197] in ihrem Artikel, wie BRD4 – alternativ zu dem oben beschriebenen Mechanismus via Rekrutierung von P-TEFb – die Transkription von Genen durch vermehrte Acetylierung von H3K27 und H3K56 steigern kann, indem es die Aktivität der beiden HAT EP300 und CBP (*CREB Binding Protein*) durch Interaktion mit seinen beiden Bromodomänen verstärkt. Da die Interaktion durch die Bromodomänen vermittelt wird, lässt sich diese vermehrte Histonacetylierung durch Inhibition mit JQ1 aufheben. Folglich müsste die Behandlung mit JQ1 die Hyperacetylierung nach Behandlung mit Romidepsin eher abschwächen als weiter steigern. Auch die Ergebnisse von Devaiah et al. [139], die eine intrinsische HAT-Aktivität von BRD4 entdeckten, stehen unseren Ergebnissen eher entgegen. Denn auch hier konnte die HAT-Aktivität durch die Behandlung mit JQ1 abgeschwächt werden - auch wenn JQ1 nicht die von den Autoren identifizierte katalytische Domäne blockiert, die für die intrinsische HAT-Aktivität verantwortlich ist, sondern zu einer gestörten Lokalisation von BRD4 entfernt vom Chromatin beiträgt. Folglich bleibt unklar, wie die beobachtete synergistische Hyperacetylierung der Histone entsteht. Möglicherweise gehören zu den durch BET- oder HDAC-Inhibition regulierten auch solche Gene, die an der Histonacetylierung oder Histondeacetylierung direkt beteiligt sind – also bspw. HAT- oder HDAC-Gene selbst. Durch Veränderung der Transkription dieser Gene könnte ein Ungleichgewicht der Aktivität hin zu vermehrter Histonacetylierung entstehen. Schließlich muss auch hinterfragt werden, ob unsere Ergebnisse den tatsächlichen Grad der Histonacetylierung gut widerspiegeln. Die beiden verwendeten Antikörper gegen die gesamte Acetylierung von H3 bzw. H4 könnten einzelne Histonmodifikationen gegenüber anderen mit überproportionaler Affinität binden und die Hyperacetylierung der Histone so überschätzen. Daher sollte in weiteren Studien mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne Histonmodifikationen untersucht werden, wie sich kombinierte HDAC- und BET-Inhibition im Detail auf die Histonacetylierung auswirkt.

Außerdem haben wir die Assoziation von sechs Genen mit den Histonmodifikationen H3K27Ac und H3K4me3 mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) [158] untersucht. H3K4me3 bestimmten wir jeweils am Transkriptionsstartpunkt (TSS) und H3K27Ac jeweils zusätzlich zwei Kilobasen *upstream* bzw. *downstream* des TSS. Die Assoziation des TSS der

Gene mit H3K4me₃, welches als hinweisend auf aktive Transkription an Promotoren gilt [198], stimmt teilweise gut mit den tatsächlichen Veränderungen der mRNA-Expression überein. So entspricht die Verminderung von H3K4me₃ am TSS der Gene *BCL-2*, *BCL-2L1*, *SKP2*, *MYC* und *BIRC5* nach der Kombinationsbehandlung den Erwartungen, weil die mRNA-Expression tatsächlich herabreguliert wird. Nur die starke Induktion des Gens *CDKN1C* durch die Kombinationsbehandlung wird durch H3K4me₃, welches sich im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert, nicht wiedergespiegelt. Überraschenderweise ändert sich die Assoziation des TSS der Gene mit H3K27Ac durch die Einzelbehandlungen mit JQ1 oder Romidepsin kaum und ist eher vermindert als gesteigert. Dieses Ergebnis passt zum einen nicht zur gesteigerten Gesamt-Acetylierung von Histon H3 nach Romidepsin-Behandlung. Zum anderen beobachteten Mishra et al. [199] nach Klasse-I-HDAC-Inhibition mit 4SC-202 in Pankreaskarzinomzellen eine vermehrte Acetylierung von H3K27 in einem Bereich von fünf Kilobasen um den TSS herum. Dabei wandten sie *Chromatin Immunoprecipitation DNA-Sequencing* (ChIP-Seq) an, sodass sie diese Veränderung für das gesamte Genom nachverfolgen konnten. Wir konnten diesen Anstieg von H3K27Ac bei allen sechs von uns untersuchten Genen am TSS sowie jeweils zwei Kilobasen *upstream* und *downstream* erst nach der Kombinationsbehandlung nachweisen [158].

Mishra et al. [199] wählten vier durch Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor 4SC-202 induzierte Gene aus. Mittels ChIP konnten sie dann eine vermehrte Assoziation von BRD4 mit dem TSS dieser Gene beobachten. Sie postulierten eine vermehrte Rekrutierung von BRD4 durch die vermehrte Histonacetylierung. Die Inhibition von BRD4 mittels siRNA oder JQ1 konnte die Induktion der Gene durch 4SC-202 attenuieren. Somit beschreiben die Autoren einen Mechanismus, wie die Hyperacetylierung der Histone durch HDAC-Inhibition bei Genen mit BET-abhängiger Transkription zu einer Induktion der Gene führt. Des Weiteren erklärt sich so, wie sich diese Induktion durch die Kombinationsbehandlung mit JQ1 in eine Repression umkehrt.

Tatsächlich könnte dieser von Mishra et al. postulierte Mechanismus auf unsere Ergebnisse zur Expression der Gene *MYC*, *BCL-2* und *BCL-2L1* übertragbar sein. Zum einen wurde für diese Gene jeweils die BET-Abhängigkeit der Transkription beschrieben [159, 160], zum anderen wird die mRNA dieser Gene durch Behandlung mit Romidepsin in unseren Experimenten induziert, jedoch durch die Kombinationsbehandlung reprimiert [158] (s. Abb. A2 im Anhang für die Veränderungen bei der Expression der *MYC*-mRNA). Auf diese Weise könnte insgesamt eine pro-apoptotische Signatur entstehen, indem anti-apoptotische und

BET-abhängige Gene, die durch Einzelbehandlung mit Romidepsin induziert werden, durch die Kombinationsbehandlung reprimiert werden.

Die Expression der drei anderen von uns untersuchten Gene *SKP2*, *CDKN1C* und *BIRC5* nimmt nach BET-Inhibition auf Protein-Ebene nicht eindeutig ab. Folglich werden diese Gene wahrscheinlich nicht BET-abhängig transkribiert. Nach Kombinationsbehandlung wird die Veränderung der Expression im Vergleich zur Einzelbehandlung gleichgerichtet verstärkt. So wird das bereits durch HDAC-Inhibition induzierte *CDKN1C* durch die Kombinationsbehandlung noch stärker induziert, während die durch HDAC-Inhibition reprimierten Gene (*SKP2* und *BIRC5*) durch die Kombinationsbehandlung noch stärker reprimiert werden [158]. Vorausgesetzt, die vermehrte Histonacetylierung sei der Hauptgrund für die Induktion bzw. Repression dieser Gene nach HDAC-Inhibition, könnte die durch zusätzliche BET-Inhibition synergistisch verstärkte Histonacetylierung zu dieser gleichgerichteten Verstärkung nach Kombinationsbehandlung führen.

Zusammenfassend scheinen diese zwei epigenetischen Mechanismen – Attenuierung der durch HDAC-Inhibition verursachten Induktion von BET-abhängigen Genen (vgl. Mishra et al. [199]) sowie die synergistische Histonacetylierung und die damit verstärkten Effekte der HDAC-Inhibition auf BET-unabhängige Gene - maßgeblich zur Veränderung der Expression der sechs Gene beizutragen (Abb. 1). Allerdings werden allein durch HDAC-Inhibition in UCC mehrere Tausend Gene differentiell exprimiert [117], sodass diese Mechanismen noch mittels Hochdurchsatzverfahren wie cDNA-Microarrays und ChIP-Seq verifiziert werden müssten.

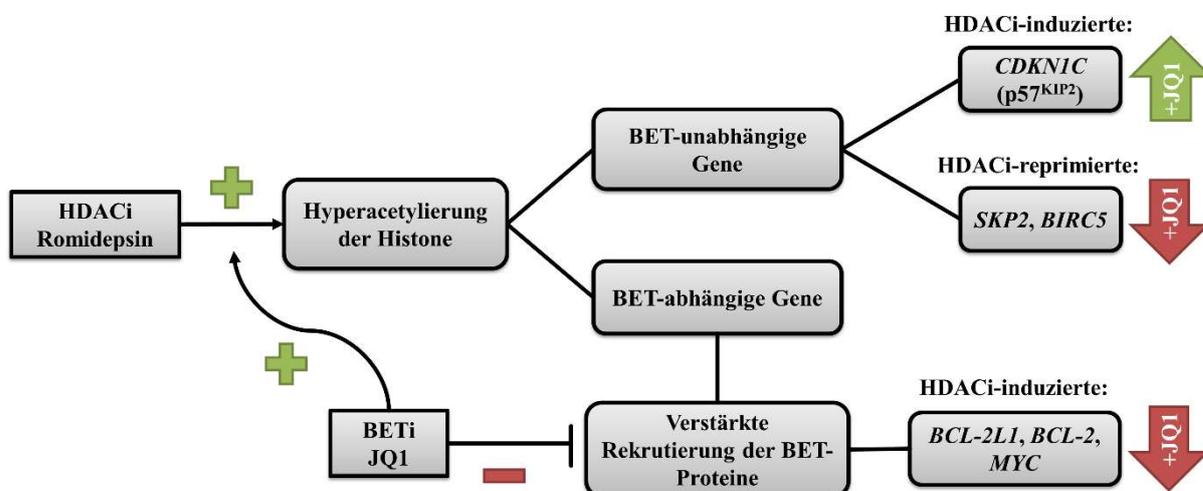


Abb. 1: Übersicht über mögliche Mechanismen der veränderten Gen-Expression nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition in UCC. Abbildung modifiziert nach Mishra et al. [199]. BETi: BET-Inhibitor, HDACi: HDAC-Inhibitor, grüne Pfeile bzw. Plus-Zeichen: Steigerung, rote Pfeile bzw. Minus-Zeichen: Verminderung.

3.4 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene Kombination von HDAC- mit BET-Inhibition weist *in vitro* sehr starke und synergistische antineoplastische Effekte auf. Normalzellen scheinen dabei schwächer von der Kombination beeinträchtigt, sodass sich ein therapeutisches Fenster für das Urothelkarzinom ergeben könnte. Für einige andere Tumorentitäten wurden vergleichbare Kombinationstherapien bereits *in vivo* getestet. Hier war die Effektivität ebenfalls hoch und die Nebenwirkungen bei den Versuchstieren waren begrenzt [151, 163]. Daher kann mit Spannung auf zukünftige klinische Studien bei diesen Tumorentitäten geblickt werden. Bevor eine kombinierte HDAC- mit BET-Inhibition beim Urothelkarzinom in der Klinik getestet werden kann, müsste die Effektivität zunächst *in vivo* im Tiermodell überprüft werden.

Die verschiedenen Arbeiten haben sehr unterschiedliche mögliche Mechanismen hinter dem Synergismus der Kombinationstherapie entdeckt. Insgesamt erscheint die Ursache für den konsistenten Synergismus von HDAC- und BET-Inhibition aber noch nicht ausreichend verstanden zu sein. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass einzelne regulierte Gene – wie z.B. *CDKN1C/p57^{KIP2}* - die Zellantwort eher nicht dominieren, sondern vielmehr die durch epigenetische Mechanismen veränderte transkriptionellen Programme. Zukünftige Arbeiten sollten weiter an der Erforschung dieser Zusammenhänge arbeiten.

Unterdessen werden die pharmakologischen Instrumente immer vielfältiger. So wurden bereits einzelne Moleküle synthetisiert, die als „*dual inhibitors*“ sowohl BET- als auch HDAC-Proteine inhibieren [200]. Des Weiteren ergeben sich durch sog. *BET-Degrader* neue Möglichkeiten bei der pharmakologischen Beeinflussung der BET-Proteine. Diese Moleküle führen den proteasomalen Abbau von einzelnen BET herbei und gestatten so mehr Spezifität für einzelne BET, verglichen mit Inhibitoren der Bromodomänen. Auf diese Weise könnten sie die Toxizität der BET-Inhibition limitieren [201].

Durch das genaue Verständnis des Mechanismus könnten sich bei der klinischen Anwendung Patienten mit besonders geeigneten Tumoren identifizieren lassen. Auch die sinnvolle und gezielte Kombination mit weiteren Inhibitoren oder konventionellen Zytostatika ließe sich so umsetzen.

4 Zusatzkapitel Aurora-Kinasen

4.1 Inhibition der Aurora-Kinasen im Urothelkarzinom

Im Rahmen der Arbeit von Pinkerneil et al. [117] zur pharmakologischen Inhibition der Klasse-I-HDAC in Urothelkarzinom-Zelllinien waren die Gene der Aurora-Kinasen *AURKA* (Aurora-Kinase A) und *AURKB* bei der Analyse der Expressionsveränderungen mittels cDNA-Microarray aufgefallen. Die Expression beider Gene wurde durch die pharmakologische Inhibition der Klasse-I-HDAC konsistent verringert [202]. Diese Veränderungen werden als mögliche Ursachen für die auffälligen Zellzyklusveränderungen nach der Behandlung mit Klasse-I-HDAC-Inhibitoren interpretiert [202].

Bolanos-Garcia [203] charakterisiert die Aurora-Kinasen in seinem Übersichtsartikel als an der Regulation der Mitose beteiligte Proteine. Die Aurora-Kinase A ist vor allem an der mitotischen Spindel und dem Zentrosom lokalisiert, während die Aurora-Kinase B neben dem Zentrosom an der Zentralspindel und den Armen der Chromosomen lokalisiert ist [203]. Zu den Funktionen der Aurora-Kinase A zählen die Organisation des mitotischen Spindelapparates und der Cytokinese sowie die Reifung der Zentrosome. Aurora-Kinase B ist an der Zellteilung und zusätzlich an der Ausrichtung und Trennung der Chromosomen sowie an der Regulation des Mikrotubuli-Apparats beteiligt [203].

Tang et al. [204] zitieren in ihrem Übersichtsartikel eine Vielzahl von Arbeiten, die eine Überexpression oder Überaktivität der Aurora-Kinasen in verschiedenartigsten Tumorentitäten belegen. Hinweise auf Inaktivierungen der Aurora-Kinasen fanden sie in der Literatur hingegen nicht. Zusammenfassend sei Aurora-Kinase A an der Proliferation, der Selbsterneuerungskapazität von Krebsstammzellen sowie an der Epithelial-mesenchymalen Transition und Metastasierung von malignen Zellen beteiligt. Aurora-Kinase B sei hingegen an der Deregulation des Zellzyklus und dem Überleben der malignen Zellen beteiligt [204].

Einige Arbeiten haben Aurora-Kinasen auch im Kontext des Urothelkarzinoms untersucht. So konnten Mobley et al. [205] eine Überexpression von *AURKA* in Tumorproben von Urothelkarzinomen feststellen. Des Weiteren belegten sie eine Beteiligung von *AURKA* an der Invasivität von Urothelkarzinom-Zelllinien *in vitro*. Außerdem sagte die Überexpression von *AURKA* in abgeschilferten Urothelzellen in Urinproben mit hoher Sensitivität und Spezifität das Vorhandensein eines Urothelkarzinoms voraus. Zhou et al. [206] führten Experimente mit Alisertib – einem Inhibitor von Aurora-Kinase A – durch. Urothelkarzinom-

Zellen erwiesen sich darin als sensitiv gegenüber der Inhibition *in vitro* und *in vivo*. Alisertib führte zu verminderter Viabilität und Klonogenität von UCC. Die Autoren beobachteten auch einen starken Einfluss auf den Zellzyklus mit Zunahme der G2/M-Fraktion und der Bildung einer aneuploiden Population von Zellen. Sie schlussfolgerten daraus unvollständig abgeschlossene Mitosen. Auch Apoptose gehörte zu den beobachteten zellulären Effekten. Interessanterweise war die Kombination von Alisertib mit den konventionellen Zytostatika Gemcitabin und Paclitaxel antagonistisch, wenn die Inhibitoren simultan angewendet wurden. Wenn sie jedoch sequenziell eingesetzt wurden, kam es zu einem Synergismus – besonders wenn zuerst Alisertib eingesetzt wurde. Die Inhibition der Aurora-Kinase A könnte Urothelkarzinome also für konventionelle Zytostatika sensitivieren.

Es finden sich bereits Hinweise für einen Synergismus von HDAC- und Aurora-Kinase-Inhibition in anderen Tumorentitäten. Li et al. [207] kombinierten einen Inhibitor der Aurora-Kinase A mit dem HDAC-Inhibitor Valproinsäure. Sie konnten synergistische Effekte auf die Viabilität von Zelllinien von Zervix-, Endometrium- und Ovarialzellkarzinomen beobachten. Muscal et al. [208] kombinierten ebenfalls einen Inhibitor der Aurora-Kinase A mit einem HDAC-Inhibitor – hier Vorinostat. In ihren Experimenten kam es zu einer synergistischen Zytotoxizität bei jeweils einer Zelllinie des Neuroblastoms, des Medulloblastoms bzw. der T-Zell-Leukämie. Okabe et al. [209] fanden einen Synergismus bei der Kombination von Tozasertib (Inhibitor der Aurora-Kinase A) mit Vorinostat in BCR-ABL (*Breakpoint Cluster Region- Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1*) -Fusionsgen-positiven Leukämiezellen. Des Weiteren beobachteten sie eine Verminderung der Proteine Aurora-Kinase A und B nach Einzelbehandlung mit Vorinostat. Paller et al. [210] untersuchten die Kombination des Pan-Aurora-Kinase-Inhibitors AMG900 mit Vorinostat in Prostatakarzinom-Zelllinien. Dabei beobachteten sie synergistische antineoplastische Aktivität, Polyploidie, zelluläre Seneszenz und Apoptose. Zullo et al. [211] beschrieben einen Synergismus von Alisertib und Romidepsin in T-Zell-Lymphom-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Mittels kontinuierlicher Zellbeobachtungen entdeckten sie gestörte Cytokinese in Zellen, die mit dieser Kombination behandelt wurden. Die Anzahl an Zellen mit Polyploidie war bei der Kombinationsbehandlung besonders hoch. Des Weiteren kam es zu Apoptose. Die Ergebnisse waren interessanterweise nicht auf B-Zell-Lymphom-Zellen übertragbar, bei denen sich kein Synergismus und keine gestörte Cytokinese zeigte.

Vor diesem Hintergrund ergab sich als Fragestellung, ob in Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) ein antineoplastischer Effekt der Inhibition von Aurora-Kinasen durch Repression im

Rahmen der Behandlung mit Klasse-I-HDAC-Inhibitoren bereits ausgeschöpft ist oder ob durch zusätzliche pharmakologische Inhibition der Kinaseaktivität der Aurora-Kinasen ein synergistischer Effekt auf die Viabilität zu erzielen sein könnte.

4.2 Material und Methoden

Die für dieses Zusatzkapitel relevanten Materialien und Methoden können weitgehend dem publizierten Manuskript entnommen werden, das Bestandteil dieser Dissertation ist [158]. Im Folgenden werden die für das Zusatzkapitel spezifischen Materialien und Methoden erläutert.

Zellkultur – Verwendete Inhibitoren und Photographien der Zellmorphologie

Zur Inhibition der Aurora-Kinasen wurden die Inhibitoren Alisertib (MLN8237, Cat. S1133, selleckchem.com) und Danusertib (PHA-739358, Cat. S1107, selleckchem.com) verwendet. Die Inhibitoren wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und bei -80°C gelagert. Vor dem Experimentieren wurden jeweils Verdünnungen mittels serieller Verdünnungsreihen in Zellkulturmedium hergestellt.

Die Photographien der Zellmorphologie in Kultur erfolgten mit dem Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S in 400-facher Vergrößerung. Es wurde ein Maßstab mit der Länge von 100 µm am rechten unteren Bildrand eingefügt.

Western-Blot – Verwendete Antikörper

Zur Detektion der Proteine mittels Western-Blot wurden Antikörper gegen Aurora-Kinase A (Purified Mouse Anti-IAK1, Cat. 610938, BD Transduction Laboratories) und Aurora-Kinase B (Purified Mouse Anti-AIM1, Cat. 611083, BD Transduction Laboratories) verwendet. Die Polyvinylidenfluorid-Membranen wurden jeweils über Nacht bei 4°C Temperatur und einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T (*Tris Buffered Saline Tween*) mit einem Anteil von 5% Trockenmilch inkubiert.

4.3 Ergebnisse und Diskussion – Kombination der Inhibition von HDAC und Aurora-Kinasen

Zunächst wurde die Expression der Aurora-Kinasen auf Protein-Ebene mittels Western-Blot bestimmt. Dazu wurde die Expression bei insgesamt vierzehn malignen Urothelkarzinom-Zelllinien mit den zwei benignen Kontroll-Zelllinien HBLAK und TERT-NHUC verglichen. Erwartungsgemäß war die Expression der Aurora-Kinasen A und B in den malignen Zellen

deutlich höher als in den Kontroll-Zelllinien (Abb. 2). Besonders TERT-NHUC-Zellen exprimieren sehr geringe Mengen beider Proteine. HBLAK-Zellen exprimieren moderate Mengen der Proteine, sind jedoch auch nicht als eindeutig benigne einzustufen [118].

Diese Überexpression der Aurora-Kinasen durch UCC könnte eine gewisse Spezifität von Inhibitoren der Aurora-Kinasen für maligne Zellen bewirken. So käme es bei einer therapeutischen Anwendung zu geringerer Toxizität. Allerdings repräsentieren die beiden Kontroll-Zelllinien lediglich die urothelialen benignen Zellen. Im Patienten existieren jedoch viele stark proliferative Gewebe mit höherer Expression der Aurora-Kinasen, die entsprechend stark von Toxizität betroffen sein könnten.

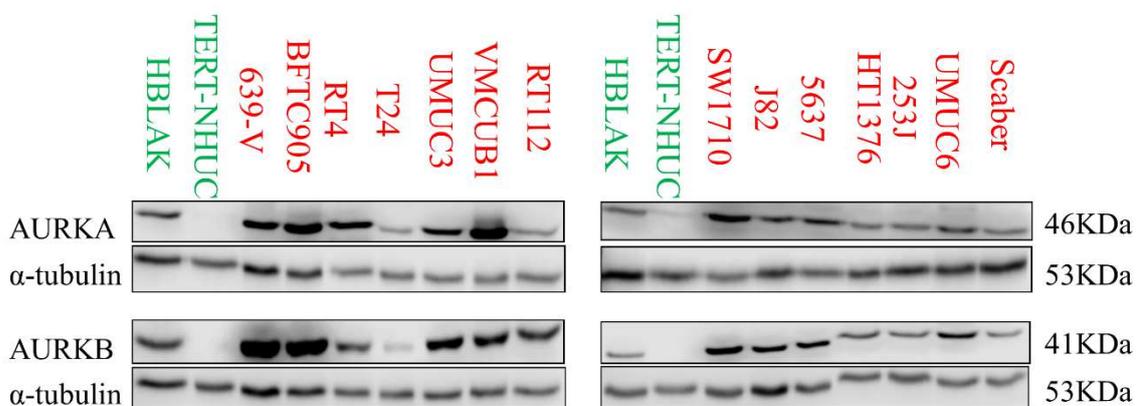


Abb. 2: Expression von Aurora-Kinase A (AURKA) und Aurora-Kinase B (AURKB) in vierzehn UCC und zwei benignen Kontroll-Zelllinien. Zelllinien mit Namen in roter Schriftfarbe sind maligne, solche mit grüner Schriftfarbe benigne. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin. Als Intermembran-Ladekontrollen dienen die beiden benignen Kontroll-Zelllinien.

Des Weiteren überprüften wir die Expression der Aurora-Kinasen nach Behandlung mit Romidepsin, Alisertib und Danusertib in VM-Cub1- und UM-UC-3-Zellen (Abb. 3). Wie bei den Ergebnissen von Pinkerneil et al. [117] auf mRNA-Ebene, kam es auch auf Protein-Ebene zu einer deutlichen Herabregulation der Aurora-Kinasen nach Behandlung mit Romidepsin. Alisertib als Inhibitor der Aurora-Kinase A führte in beiden Zelllinien zu einer Steigerung der Expression der Aurora-Kinase A, nicht jedoch von Aurora-Kinase B. Dies könnte einen Kompensationsmechanismus reflektieren, der die Wirkung von Alisertib abschwächen könnte. Mit Blick auf die Kombinationstherapie könnte sich hier ein Synergismus ergeben, indem Romidepsin diesen Kompensationsmechanismus attenuieren könnte. Der Pan-Aurora-Kinase-Inhibitor Danusertib hingegen führte überraschenderweise ähnlich wie Romidepsin zu einer Herabregulation beider Aurora-Kinasen in beiden untersuchten Zelllinien.

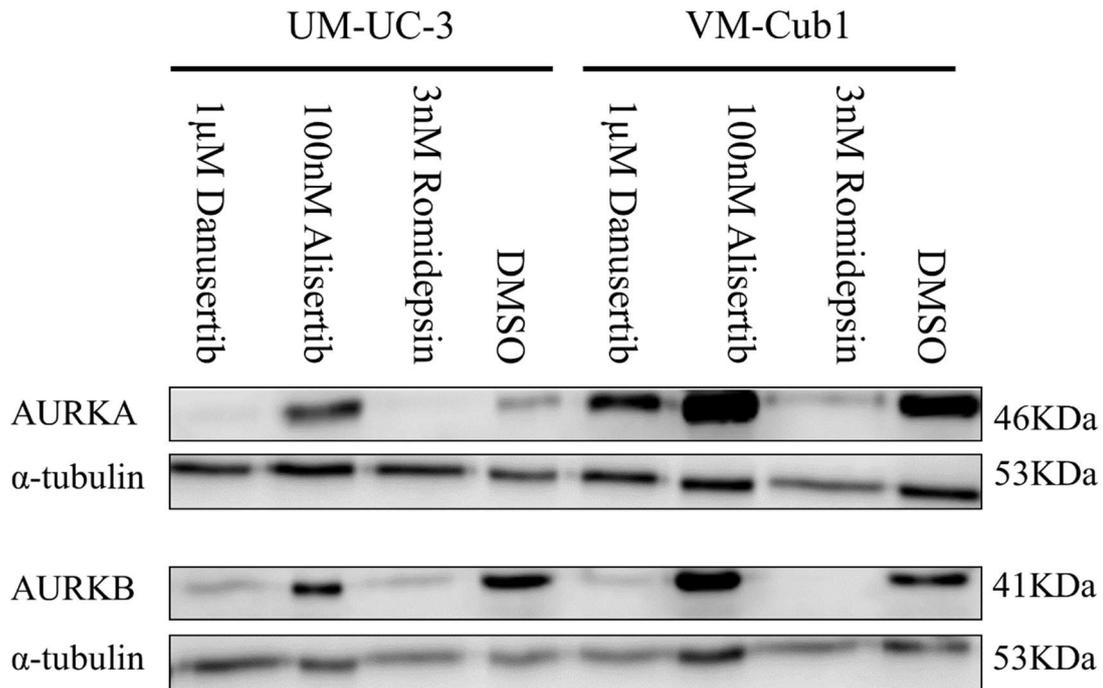


Abb. 3: Expression von Aurora-Kinase A (AURKA) und Aurora-Kinase B (AURKB) in UM-UC-3 und VM-Cub1 Zellen nach Behandlung mit HDAC- oder Aurora-Kinase-Inhibitoren. Als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin. Die Behandlungsdauer betrug 48 h.

Um zu untersuchen, ob die Inhibition von Aurora-Kinase A und HDAC auch in UCC synergistische Effekte verursacht, wurden VM-Cub1- und UM-UC-3 mit verschiedenen kombinierten Konzentrationen der Inhibitoren Alisertib und Romidepsin inkubiert (Abb. 4&5). Die Ergebnisse der Viabilitätstests sind unten jeweils als Säulendiagramm dargestellt.

Außerdem wurden mittels Computersimulation Combination-Index-Plots generiert [150].

Anhand der Combination-Index-Plots lässt sich einschätzen, ob Synergismus, Additivität oder Antagonismus vorliegen. Bei beiden Zelllinien handelt es sich am ehesten um einen additiven Zusammenhang, wenn man die Datenpunkte mit hoher Effektstärke, d.h. mit einer *fraction affected* nahe bei 1, zugrunde legt.

Dieses Ergebnis ist überraschend vor dem Hintergrund der vielen Arbeiten, die einen Synergismus bei der Kombination von HDAC- und Aurora-Kinase-Inhibition in anderen Tumorentitäten erbrachten.

Von einer möglichen klinischen Anwendung dieser Kombination beim Urothelkarzinom sollte nach diesem Ergebnis eher Abstand genommen werden. Zwar „behindern“ die Inhibitoren ihre Wirkung nicht wechselseitig im Sinne eines Antagonismus. Sollten sich aber bei solchen additiven Kombinationen auch die Nebenwirkungen additiv ergänzen, würde sich keinerlei Vorteil gegenüber einer ebenfalls toxischeren Dosissteigerung einer Einzelbehandlung ergeben.

In der klinischen Phase-II-Studie von Necchi et al. [212] wurde Alisertib bei Patienten mit fortgeschrittenen Urothelkarzinomen im Rahmen einer einarmigen Studie getestet. Leider kam es zu zwei Medikamenten-bezogenen Todesfällen durch schwerste Neutropenie, die als häufige Nebenwirkung auftrat. Schwere Mukositis war die häufigste Nebenwirkung. Die beobachteten Effekte auf die Erkrankung waren insgesamt sehr enttäuschend.

Folglich gibt es keine Hinweise auf einen klinischen Nutzen bezogen sowohl auf eine Einzelbehandlung des Urothelkarzinoms mit Alisertib als auch auf eine Kombinationsbehandlung mit HDAC-Inhibitoren. Trotzdem sollte die Rolle der Aurora-Kinasen bei der Wirkung der Klasse-I-HDAC-Inhibition im Urothelkarzinom weiter untersucht werden. Zu klären bleibt unter anderem die Frage, über welchen Mechanismus HDAC-Klasse-I-Inhibitoren zu einer Herabregulation von Aurora-Kinasen in UCC führen.

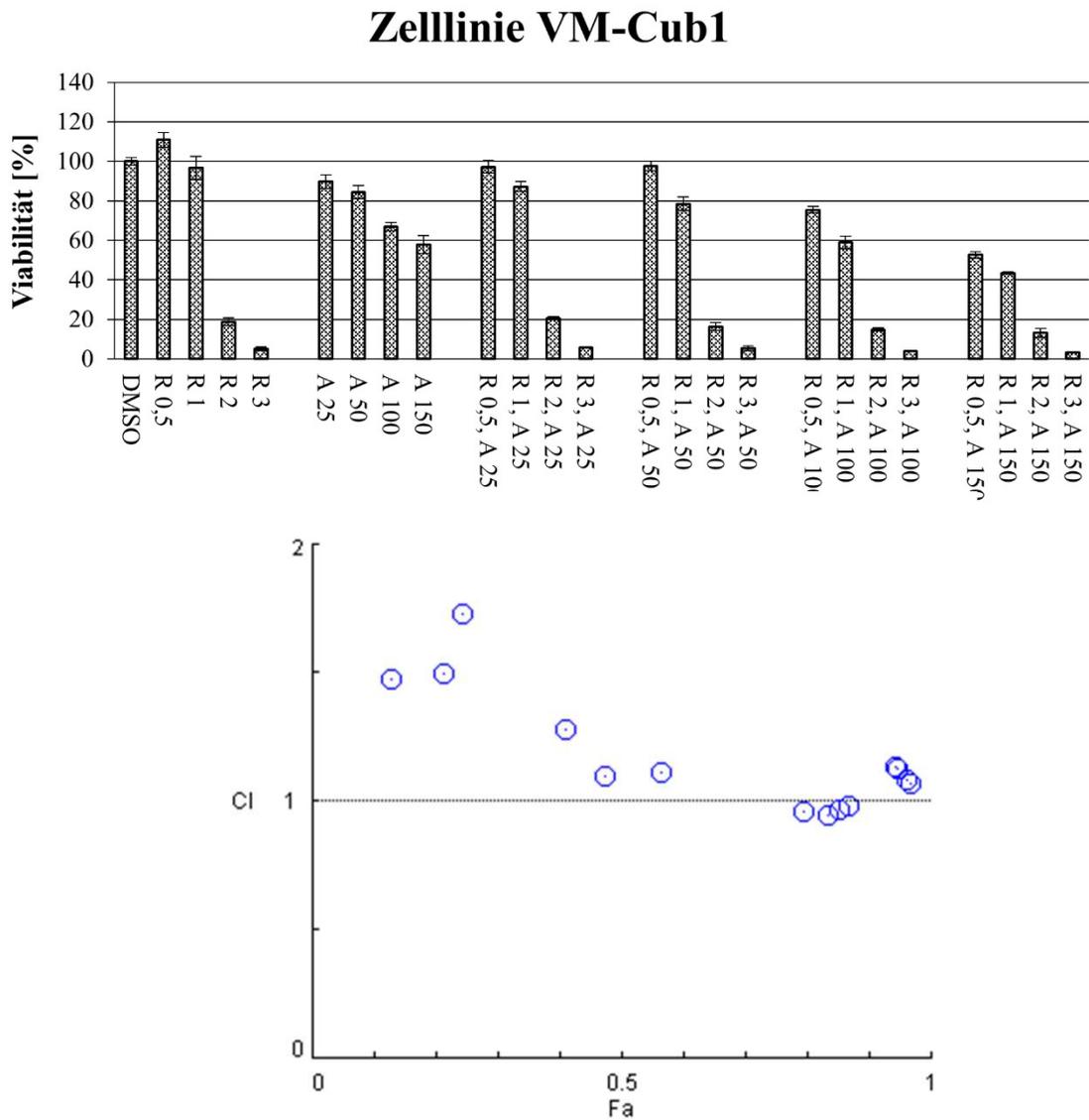


Abb. 4: Kombinationsbehandlung der Zelllinie VM-Cub1 mit Romidepsin und Alisertib. Oben: y-Achse: relative Viabilität [%], x-Achse: R: Romidepsin, A: Alisertib, Konzentrationsangaben in nM. Unten: Combination-Index-Plot, y-Achse: Combination Index, x-Achse: *fraction affected*, blaue Punkte mit blauen Kreisen: Datenpunkte. Die Behandlungsdauer betrug 72 h, als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt.

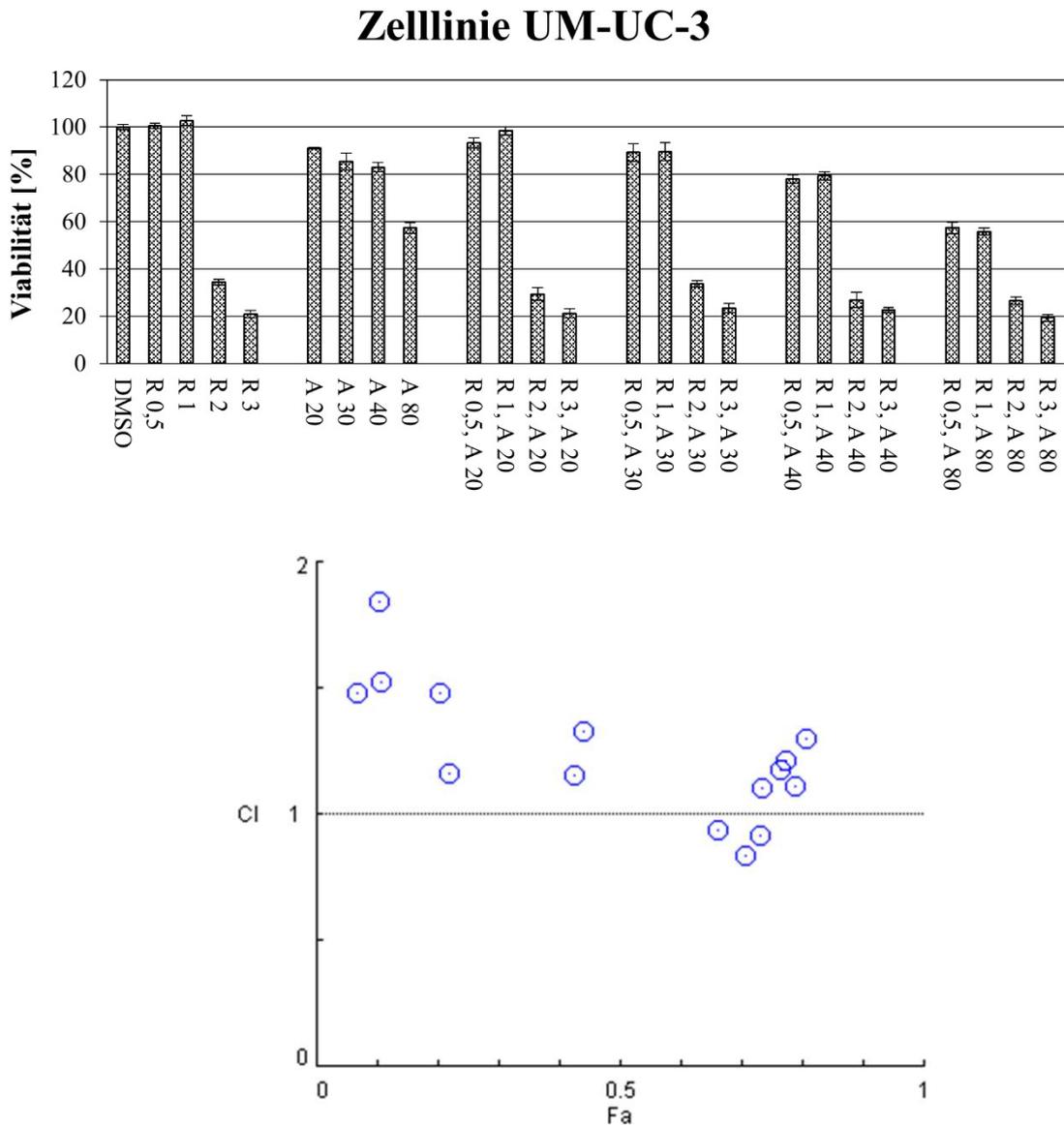


Abb. 5: Kombinationsbehandlung der Zelllinie UM-UC-3 mit Romidepsin und Alisertib. Oben: y-Achse: relative Viabilität [%], x-Achse: R: Romidepsin, A: Alisertib, Konzentrationsangaben in nM. Unten: Combination-Index-Plot, y-Achse: Combination Index, x-Achse: *fraction affected*, blaue Punkte mit blauen Kreisen: Datenpunkte. Die Behandlungsdauer betrug 72 h, als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt.

5 Literaturverzeichnis

1. Antoni, S., et al., *Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends*. Eur Urol, 2017. **71**(1): p. 96-108.
2. Willis, D. and A.M. Kamat, *Nonurothelial bladder cancer and rare variant histologies*. Hematol Oncol Clin North Am, 2015. **29**(2): p. 237-52, viii.
3. Mostafa, M.H., S.A. Sheweita, and P.J. O'Connor, *Relationship between schistosomiasis and bladder cancer*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 97-111.
4. Letasiova, S., et al., *Bladder cancer, a review of the environmental risk factors*. Environ Health, 2012. **11 Suppl 1**: p. S11.
5. Case, R.A. and M.E. Hosker, *Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales*. Br J Prev Soc Med, 1954. **8**(2): p. 39-50.
6. Carreon, T., et al., *Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant*. Occup Environ Med, 2014. **71**(3): p. 175-82.
7. Riedel, K., et al., *Determination of three carcinogenic aromatic amines in urine of smokers and nonsmokers*. J Anal Toxicol, 2006. **30**(3): p. 187-95.
8. Cumberbatch, M.G., et al., *The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks*. Eur Urol, 2016. **70**(3): p. 458-66.
9. Hein, D.W., *N-acetyltransferase 2 genetic polymorphism: effects of carcinogen and haplotype on urinary bladder cancer risk*. Oncogene, 2006. **25**(11): p. 1649-58.
10. Sanli, O., et al., *Bladder cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17022.
11. Wu, X.R., *Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 713-25.
12. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
13. Chou, R., et al., *Treatment of muscle-invasive bladder cancer: A systematic review*. Cancer, 2016. **122**(6): p. 842-51.
14. Stein, J.P., et al., *Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients*. J Clin Oncol, 2001. **19**(3): p. 666-75.
15. Kamat, A.M., et al., *Bladder cancer*. Lancet, 2016. **388**(10061): p. 2796-2810.
16. von der Maase, H., et al., *Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study*. J Clin Oncol, 2000. **18**(17): p. 3068-77.
17. Dash, A., et al., *Impact of renal impairment on eligibility for adjuvant cisplatin-based chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder*. Cancer, 2006. **107**(3): p. 506-13.
18. Galsky, M.D., et al., *Treatment of patients with metastatic urothelial cancer "unfit" for Cisplatin-based chemotherapy*. J Clin Oncol, 2011. **29**(17): p. 2432-8.
19. Bellmunt, J. and D.P. Petrylak, *New therapeutic challenges in advanced bladder cancer*. Semin Oncol, 2012. **39**(5): p. 598-607.

20. Soloway, M.S., *Bladder cancer: Lack of progress in bladder cancer--what are the obstacles?* Nat Rev Urol, 2013. **10**(1): p. 5-6.
21. van Kessel, K.E., et al., *Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research.* Nat Rev Urol, 2015. **12**(12): p. 681-94.
22. Fletcher, A., A. Choudhury, and N. Alam, *Metastatic bladder cancer: a review of current management.* ISRN Urol, 2011. **2011**: p. 545241.
23. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
24. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
25. Nakanishi, J., et al., *Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(8): p. 1173-82.
26. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer.* Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-62.
27. Bellmunt, J., T. Powles, and N.J. Vogelzang, *A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now.* Cancer Treat Rev, 2017. **54**: p. 58-67.
28. Donin, N.M., et al., *Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma.* J Urol, 2017. **197**(1): p. 14-22.
29. Kim, J., et al., *Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise.* Clin Cancer Res, 2015. **21**(20): p. 4514-24.
30. Roberts, S.A., et al., *An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers.* Nat Genet, 2013. **45**(9): p. 970-6.
31. Poon, S.L., et al., *Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention.* Genome Med, 2014. **6**(3): p. 24.
32. Burns, M.B., N.A. Temiz, and R.S. Harris, *Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers.* Nat Genet, 2013. **45**(9): p. 977-83.
33. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma.* Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22.
34. Czerniak, B., C. Dinney, and D. McConkey, *Origins of Bladder Cancer.* Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 149-74.
35. Zieger, K., et al., *Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(21): p. 7709-19.
36. Williams, S.V., C.D. Hurst, and M.A. Knowles, *Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(4): p. 795-803.
37. Czerniak, B., et al., *Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas.* Hum Pathol, 1992. **23**(11): p. 1199-204.
38. Abbosh, P.H., D.J. McConkey, and E.R. Plimack, *Targeting Signaling Transduction Pathways in Bladder Cancer.* Curr Oncol Rep, 2015. **17**(12): p. 58.
39. Puzio-Kuter, A.M., et al., *Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer.* Genes Dev, 2009. **23**(6): p. 675-80.
40. McConkey, D.J., et al., *Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression.* Urol Oncol, 2010. **28**(4): p. 429-40.
41. Gui, Y., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder.* Nat Genet, 2011. **43**(9): p. 875-8.

42. Robertson, A.G., et al., *Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer*. Cell, 2017. **171**(3): p. 540-556 e25.
43. Luger, K., M.L. Dechassa, and D.J. Tremethick, *New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 436-47.
44. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
45. Segal, E. and J. Widom, *What controls nucleosome positions?* Trends Genet, 2009. **25**(8): p. 335-43.
46. Smith, B.C. and J.M. Denu, *Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(1): p. 45-57.
47. Torres, I.O. and D.G. Fujimori, *Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation*. Curr Opin Struct Biol, 2015. **35**: p. 68-75.
48. Fischle, W., Y. Wang, and C.D. Allis, *Histone and chromatin cross-talk*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 172-83.
49. Mujtaba, S., L. Zeng, and M.M. Zhou, *Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5521-7.
50. Winter, G.E., et al., *BET Bromodomain Proteins Function as Master Transcription Elongation Factors Independent of CDK9 Recruitment*. Mol Cell, 2017. **67**(1): p. 5-18 e19.
51. Choudhary, C., et al., *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. Science, 2009. **325**(5942): p. 834-40.
52. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
53. Feinberg, A.P., *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 433-40.
54. Dawson, M.A., *The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities*. Science, 2017. **355**(6330): p. 1147-1152.
55. Xiao, Z.G., et al., *The Roles of Histone Demethylase UTX and JMJD3 (KDM6B) in Cancers: Current Progress and Future Perspectives*. Curr Med Chem, 2016. **23**(32): p. 3687-3696.
56. Ahn, J., et al., *Target sequencing and CRISPR/Cas editing reveal simultaneous loss of UTX and UTY in urothelial bladder cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 63252-63260.
57. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
58. Raman, J.D., et al., *Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8570-6.
59. Tang, S.H., et al., *Pharmacologic down-regulation of EZH2 suppresses bladder cancer in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2014. **5**(21): p. 10342-55.
60. Ler, L.D., et al., *Loss of tumor suppressor KDM6A amplifies PRC2-regulated transcriptional repression in bladder cancer and can be targeted through inhibition of EZH2*. Sci Transl Med, 2017. **9**(378).
61. Ezponda, T., et al., *UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition*. Cell Rep, 2017. **21**(3): p. 628-640.
62. Poyet, C., et al., *Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer*. BMC Clin Pathol, 2014. **14**(1): p. 10.

63. Niegisch, G., et al., *Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers*. Urol Oncol, 2013. **31**(8): p. 1770-9.
64. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
65. Advani, A.S., et al., *Histone H4 acetylation by immunohistochemistry and prognosis in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 387.
66. Archer, S.Y., et al., *p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6791-6.
67. Li, Y. and E. Seto, *HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(10).
68. Eckschlager, T., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
69. Prince, H.M. and M. Dickinson, *Romidepsin for cutaneous T-cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(13): p. 3509-15.
70. Seto, E. and M. Yoshida, *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(4): p. a018713.
71. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
72. Yang, X.J. and E. Seto, *The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 206-18.
73. Moser, M.A., A. Hagelkruys, and C. Seiser, *Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases*. Chromosoma, 2014. **123**(1-2): p. 67-78.
74. Delcuve, G.P., D.H. Khan, and J.R. Davie, *Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors*. Clin Epigenetics, 2012. **4**(1): p. 5.
75. Furumai, R., et al., *FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4916-21.
76. Micelli, C. and G. Rastelli, *Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity*. Drug Discov Today, 2015. **20**(6): p. 718-35.
77. Watson, P.J., et al., *Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11262.
78. Segre, C.V. and S. Chiocca, *Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 690848.
79. Pflum, M.K., et al., *Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47733-41.
80. Gregoretta, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 17-31.
81. Brochier, C., et al., *Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons*. J Neurosci, 2013. **33**(20): p. 8621-32.
82. Kadosh, D. and K. Struhl, *Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5121-7.
83. Wang, Z., et al., *Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 1019-31.

84. Bhaskara, S., et al., *Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control*. Mol Cell, 2008. **30**(1): p. 61-72.
85. Heideman, M.R., et al., *Dosage-dependent tumor suppression by histone deacetylases 1 and 2 through regulation of c-Myc collaborating genes and p53 function*. Blood, 2013. **121**(11): p. 2038-50.
86. Yamaguchi, T., et al., *Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression*. Genes Dev, 2010. **24**(5): p. 455-69.
87. Hagelkruys, A., et al., *A single allele of Hdac2 but not Hdac1 is sufficient for normal mouse brain development in the absence of its paralog*. Development, 2014. **141**(3): p. 604-616.
88. Haberland, M., et al., *Genetic dissection of histone deacetylase requirement in tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 7751-5.
89. Barneda-Zahonero, B. and M. Parra, *Histone deacetylases and cancer*. Mol Oncol, 2012. **6**(6): p. 579-89.
90. Weichert, W., *HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 168-76.
91. Yoon, S. and G.H. Eom, *HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases*. Chonnam Med J, 2016. **52**(1): p. 1-11.
92. Behera, J., V. Jayprakash, and B.N. Sinha, *Histone deacetylase inhibitors: a review on class-I specific inhibition*. Mini Rev Med Chem, 2015. **15**(9): p. 731-50.
93. Holmes, M.A. and B.W. Matthews, *Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis*. Biochemistry, 1981. **20**(24): p. 6912-6920.
94. Drummond, D.C., et al., *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 495-528.
95. Insinga, A., et al., *Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 71-6.
96. Bolden, J.E., et al., *HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e519.
97. Duan, H., C.A. Heckman, and L.M. Boxer, *Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1608-19.
98. Symanowski, J., et al., *A histone deacetylase inhibitor LBH589 downregulates XIAP in mesothelioma cell lines which is likely responsible for increased apoptosis with TRAIL*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(2): p. 149-60.
99. Sandor, V., et al., *P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228*. Br J Cancer, 2000. **83**(6): p. 817-25.
100. Setiadi, A.F., et al., *Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9601-7.
101. Heninger, E., T.E. Krueger, and J.M. Lang, *Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 29.
102. Jeong, J.W., et al., *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell, 2002. **111**(5): p. 709-20.
103. Chelluri, R., et al., *Valproic Acid Alters Angiogenic and Trophic Gene Expression in Human Prostate Cancer Models*. Anticancer Res, 2016. **36**(10): p. 5079-5086.

104. Lin, K.T., et al., *HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4691-701.
105. Halsall, J.A. and B.M. Turner, *Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy: An evolutionarily ancient resistance response may explain their limited success*. Bioessays, 2016. **38**(11): p. 1102-1110.
106. Faleiro, I., et al., *Epigenetic therapy in urologic cancers: an update on clinical trials*. Oncotarget, 2017. **8**(7): p. 12484-12500.
107. Bradley, D., et al., *Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862): trial results and interleukin-6 analysis: a study by the Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trial Consortium and University of Chicago Phase 2 Consortium*. Cancer, 2009. **115**(23): p. 5541-9.
108. Schneider, B.J., et al., *Phase I study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, NSC 701852) in combination with docetaxel in patients with advanced and relapsed solid malignancies*. Invest New Drugs, 2012. **30**(1): p. 249-57.
109. Ueda, H., et al., *FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice*. J Antibiot (Tokyo), 1994. **47**(3): p. 315-23.
110. Mwakwari, S.C., et al., *Macrocyclic histone deacetylase inhibitors*. Curr Top Med Chem, 2010. **10**(14): p. 1423-40.
111. Poligone, B., J. Lin, and C. Chung, *Romidepsin: evidence for its potential use to manage previously treated cutaneous T cell lymphoma*. Core Evid, 2011. **6**: p. 1-12.
112. Kim, H.J. and S.C. Bae, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs*. Am J Transl Res, 2011. **3**(2): p. 166-79.
113. Ceccacci, E. and S. Minucci, *Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia*. Br J Cancer, 2016. **114**(6): p. 605-11.
114. Lehmann, M., et al., *Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**: p. 59.
115. Kaletsch, A., et al., *Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells*. Clin Epigenetics, 2018. **10**(1): p. 100.
116. Rosik, L., et al., *Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(6): p. 742-57.
117. Pinkerneil, M., et al., *Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(2): p. 299-312.
118. Hoffmann, M.J., et al., *The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors*. Bladder Cancer, 2016. **2**(4): p. 449-463.
119. Chapman, E.J., et al., *Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway*. Oncogene, 2006. **25**(36): p. 5037-45.
120. Pinkerneil, M., et al., *Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines*. Target Oncol, 2016. **11**(6): p. 783-798.
121. Haynes, S.R., et al., *The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(10): p. 2603.
122. Kim, S.C., et al., *Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey*. Mol Cell, 2006. **23**(4): p. 607-18.

123. Filippakopoulos, P., et al., *Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family*. Cell, 2012. **149**(1): p. 214-31.
124. Fujisawa, T. and P. Filippakopoulos, *Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(4): p. 246-262.
125. Wang, C.Y. and P. Filippakopoulos, *Beating the odds: BETs in disease*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(8): p. 468-79.
126. Stathis, A. and F. Bertoni, *BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment*. Cancer Discov, 2018. **8**(1): p. 24-36.
127. Dhalluin, C., et al., *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 491-6.
128. Umehara, T., et al., *Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7610-8.
129. Moriniere, J., et al., *Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 664-8.
130. Fukazawa, H. and A. Masumi, *The conserved 12-amino acid stretch in the inter-bromodomain region of BET family proteins functions as a nuclear localization signal*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(11): p. 2064-8.
131. Garcia-Gutierrez, P., M. Mundi, and M. Garcia-Dominguez, *Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 15): p. 3671-80.
132. Schroder, S., et al., *Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1090-9.
133. Itzen, F., et al., *Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 7577-90.
134. Zhang, W., et al., *Bromodomain-containing protein 4 (BRD4) regulates RNA polymerase II serine 2 phosphorylation in human CD4+ T cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 43137-55.
135. Loven, J., et al., *Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers*. Cell, 2013. **153**(2): p. 320-34.
136. Kanno, T., et al., *BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(12): p. 1047-57.
137. You, J., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen interacts with bromodomain protein Brd4 on host mitotic chromosomes*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 8909-19.
138. Rahman, S., et al., *The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2641-52.
139. Devaiah, B.N., et al., *BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(6): p. 540-8.
140. French, C.A., et al., *BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(2): p. 304-7.
141. French, C.A., et al., *BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2237-42.

142. Stathis, A., et al., *Clinical Response of Carcinomas Harboring the BRD4-NUT Oncoprotein to the Targeted Bromodomain Inhibitor OTX015/MK-8628*. *Cancer Discov*, 2016. **6**(5): p. 492-500.
143. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. *Nature*, 2010. **468**(7327): p. 1067-73.
144. Qi, J., *Bromodomain and extraterminal domain inhibitors (BETi) for cancer therapy: chemical modulation of chromatin structure*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(12): p. a018663.
145. Berthon, C., et al., *Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase I study*. *Lancet Haematol*, 2016. **3**(4): p. e186-95.
146. Amorim, S., et al., *Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with lymphoma or multiple myeloma: a dose-escalation, open-label, pharmacokinetic, phase I study*. *Lancet Haematol*, 2016. **3**(4): p. e196-204.
147. Yan, Y., et al., *Bromodomain 4 protein is a predictor of survival for urothelial carcinoma of bladder*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(7): p. 4231-8.
148. Wu, X., et al., *BRD4 Regulates EZH2 Transcription through Upregulation of C-MYC and Represents a Novel Therapeutic Target in Bladder Cancer*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(5): p. 1029-42.
149. Bozic, I., et al., *Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy*. *Elife*, 2013. **2**: p. e00747.
150. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. *Cancer Res*, 2010. **70**(2): p. 440-6.
151. Mazur, P.K., et al., *Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Nat Med*, 2015. **21**(10): p. 1163-71.
152. Bhadury, J., et al., *BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(26): p. E2721-30.
153. O'Toole, C.M., et al., *Identity of some human bladder cancer cell lines*. *Nature*, 1983. **301**(5899): p. 429-30.
154. Warrick, J.I., et al., *FOXA1, GATA3 and PPAR Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 38531.
155. Earl, J., et al., *The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies*. *BMC Genomics*, 2015. **16**(1).
156. Lockwood, W.W., et al., *Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(47): p. 19408-13.
157. Fowler, T., et al., *Regulation of MYC expression and differential JQ1 sensitivity in cancer cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87003.
158. Holscher, A.S., et al., *Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines*. *Clin Epigenetics*, 2018. **10**: p. 1.
159. Delmore, J.E., et al., *BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc*. *Cell*, 2011. **146**(6): p. 904-17.
160. Hogg, S.J., et al., *BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(9): p. 2030-41.

161. Kurimchak, A.M., et al., *Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer*. Cell Rep, 2016. **16**(5): p. 1273-1286.
162. Tanaka, M. and H.B. Grossman, *In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin*. Gene Ther, 2003. **10**(19): p. 1636-42.
163. Fiskus, W., et al., *Highly active combination of BRD4 antagonist and histone deacetylase inhibitor against human acute myelogenous leukemia cells*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1142-54.
164. Borbely, G., et al., *Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 33623-35.
165. Heinemann, A., et al., *Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling*. Oncotarget, 2015. **6**(25): p. 21507-21.
166. Shahbazi, J., et al., *The Bromodomain Inhibitor JQ1 and the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Synergistically Reduce N-Myc Expression and Induce Anticancer Effects*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(10): p. 2534-44.
167. Jostes, S., et al., *The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(7): p. 1300-1314.
168. Pinkerneil, M., et al., *HDACs and HDAC inhibitors in urothelial carcinoma - perspectives for an antineoplastic treatment*. Curr Med Chem, 2017.
169. Chatelut, E., J.P. Delord, and P. Canal, *Toxicity patterns of cytotoxic drugs*. Invest New Drugs, 2003. **21**(2): p. 141-8.
170. Bolden, J.E., et al., *Inducible in vivo silencing of Brd4 identifies potential toxicities of sustained BET protein inhibition*. Cell Rep, 2014. **8**(6): p. 1919-1929.
171. Robert, C. and F.V. Rassool, *HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair*. Adv Cancer Res, 2012. **116**: p. 87-129.
172. Sato, N., et al., *Epigenetic down-regulation of CDKN1C/p57KIP2 in pancreatic ductal neoplasms identified by gene expression profiling*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(13): p. 4681-8.
173. Hoffmann, M.J., et al., *Multiple mechanisms downregulate CDKN1C in human bladder cancer*. Int J Cancer, 2005. **114**(3): p. 406-13.
174. Oya, M. and W.A. Schulz, *Decreased expression of p57(KIP2)mRNA in human bladder cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(5): p. 626-31.
175. Zhao, R., et al., *CDK inhibitor p57 (Kip2) is downregulated by Akt during HER2-mediated tumorigenicity*. Cell Cycle, 2013. **12**(6): p. 935-43.
176. Adhikary, S., et al., *Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7648-57.
177. Kamura, T., et al., *Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10231-6.
178. Guo, J., et al., *EZH2 regulates expression of p57 and contributes to progression of ovarian cancer in vitro and in vivo*. Cancer Sci, 2011. **102**(3): p. 530-9.
179. Stampone, E., et al., *Genetic and Epigenetic Control of CDKN1C Expression: Importance in Cell Commitment and Differentiation, Tissue Homeostasis and Human Diseases*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
180. Borriello, A., et al., *p57(Kip2) and cancer: time for a critical appraisal*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(10): p. 1269-84.

181. Spring, L.M., et al., *CDK 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: Current Controversies and Future Directions*. *Curr Oncol Rep*, 2019. **21**(3): p. 25.
182. Waldman, T., et al., *Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy*. *Nat Med*, 1997. **3**(9): p. 1034-6.
183. Kavanagh, E. and B. Joseph, *The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1816**(1): p. 50-6.
184. Vlachos, P., et al., *The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(8): p. 1497-507.
185. Ma, Y. and W.D. Cress, *Transcriptional upregulation of p57 (Kip2) by the cyclin-dependent kinase inhibitor BMS-387032 is E2F dependent and serves as a negative feedback loop limiting cytotoxicity*. *Oncogene*, 2007. **26**(24): p. 3532-40.
186. Ky, N., et al., *KLF4 suppresses HDACi induced caspase activation and the SAPK pathway by targeting p57(Kip2)*. *Apoptosis*, 2009. **14**(9): p. 1095-107.
187. Guo, H., et al., *p57: A multifunctional protein in cancer (Review)*. *Int J Oncol*, 2010. **36**(6): p. 1321-9.
188. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. *Cell*, 2013. **154**(6): p. 1380-9.
189. Gupta, R., et al., *Synergistic tumor suppression by combined inhibition of telomerase and CDKN1A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(30): p. E3062-71.
190. Shariat, S.F., et al., *Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(22): p. 7012-9.
191. Jeon, C., et al., *Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76719.
192. Kim, S.R., et al., *BET inhibition in advanced cutaneous T cell lymphoma is synergistically potentiated by BCL2 inhibition or HDAC inhibition*. *Oncotarget*, 2018. **9**(49): p. 29193-29207.
193. Badamchi-Zadeh, A., et al., *Combined HDAC and BET Inhibition Enhances Melanoma Vaccine Immunogenicity and Efficacy*. *J Immunol*, 2018. **201**(9): p. 2744-2752.
194. Enssle, J.C., et al., *Co-targeting of BET proteins and HDACs as a novel approach to trigger apoptosis in rhabdomyosarcoma cells*. *Cancer Lett*, 2018. **428**: p. 160-172.
195. Zhang, Y., et al., *Combined HDAC and Bromodomain Protein Inhibition Reprograms Tumor Cell Metabolism and Elicits Synthetic Lethality in Glioblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2018. **24**(16): p. 3941-3954.
196. Knievel, J., et al., *Multiple mechanisms mediate resistance to sorafenib in urothelial cancer*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(11): p. 20500-17.
197. Wu, T., Y.F. Kamikawa, and M.E. Donohoe, *Brd4's Bromodomains Mediate Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Pluripotent Cells through P300 and Brg1*. *Cell Rep*, 2018. **25**(7): p. 1756-1771.
198. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. *Nature*, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
199. Mishra, V.K., et al., *Histone deacetylase class-I inhibition promotes epithelial gene expression in pancreatic cancer cells in a BRD4- and MYC-dependent manner*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(11): p. 6334-6349.
200. Shao, M., et al., *Structure-based design, synthesis and in vitro antiproliferative effects studies of novel dual BRD4/HDAC inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017. **27**(17): p. 4051-4055.

201. Kregel, S., et al., *Functional and Mechanistic Interrogation of BET Bromodomain Degraders for the Treatment of Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(13): p. 4038-4048.
202. Pinkerneil, M., *Charakterisierung der Klasse I Histondeacetylasen als Zielmoleküle für die Therapie des Urothelkarzinoms*. Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf, 2018.
203. Bolanos-Garcia, V.M., *Aurora kinases*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(8): p. 1572-7.
204. Tang, A., et al., *Aurora kinases: novel therapy targets in cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(14): p. 23937-23954.
205. Mobley, A., et al., *Aurora Kinase A is a Biomarker for Bladder Cancer Detection and Contributes to its Aggressive Behavior*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 40714.
206. Zhou, N., et al., *The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(7): p. 1717-28.
207. Li, Y., et al., *Enhanced Cytotoxic Effects of Combined Valproic Acid and the Aurora Kinase Inhibitor VE465 on Gynecologic Cancer Cells*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 58.
208. Muscal, J.A., et al., *Additive effects of vorinostat and MLN8237 in pediatric leukemia, medulloblastoma, and neuroblastoma cell lines*. Invest New Drugs, 2013. **31**(1): p. 39-45.
209. Okabe, S., et al., *Activity of histone deacetylase inhibitors and an Aurora kinase inhibitor in BCR-ABL-expressing leukemia cells: Combination of HDAC and Aurora inhibitors in BCR-ABL-expressing cells*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 32.
210. Paller, C.J., et al., *Combining the pan-aurora kinase inhibitor AMG 900 with histone deacetylase inhibitors enhances antitumor activity in prostate cancer*. Cancer Med, 2014. **3**(5): p. 1322-35.
211. Zullo, K.M., et al., *Aurora A Kinase Inhibition Selectively Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitor through Cytokinesis Failure in T-cell Lymphoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(18): p. 4097-109.
212. Necchi, A., et al., *An open-label, single-arm, phase 2 study of the Aurora kinase A inhibitor alisertib in patients with advanced urothelial cancer*. Invest New Drugs, 2016. **34**(2): p. 236-42.

6 Anhang

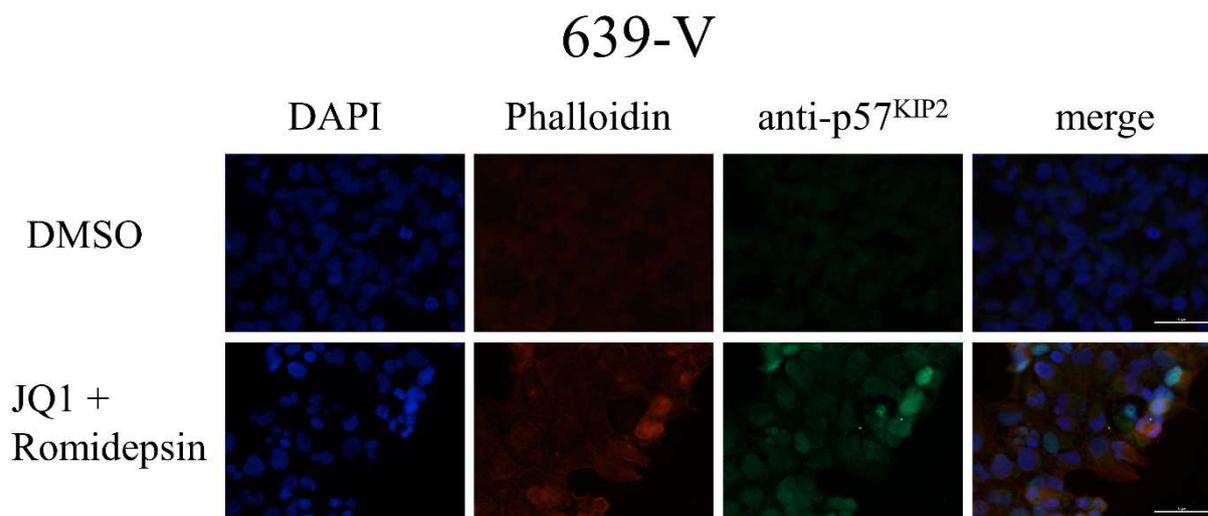
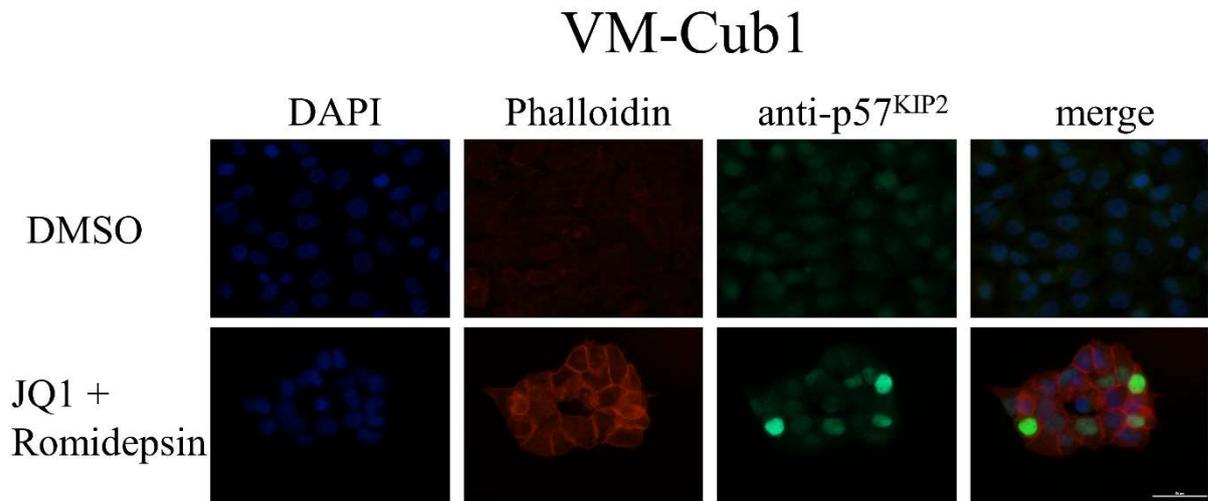


Abb. A1: Nachweis der Induktion von p57^{KIP2} durch Behandlung mit JQ1 und Romidepsin in den UCC VM-Cub1 und 639-V mittels Immunfluoreszenz. Vergrößerung 400-fach, weiße Striche am rechten, unteren Bildrand repräsentieren 50 μm , Behandlungsdauer 48 h, die Konzentrationen der verwendeten Substanzen entsprechen den Angaben in der Originalarbeit.

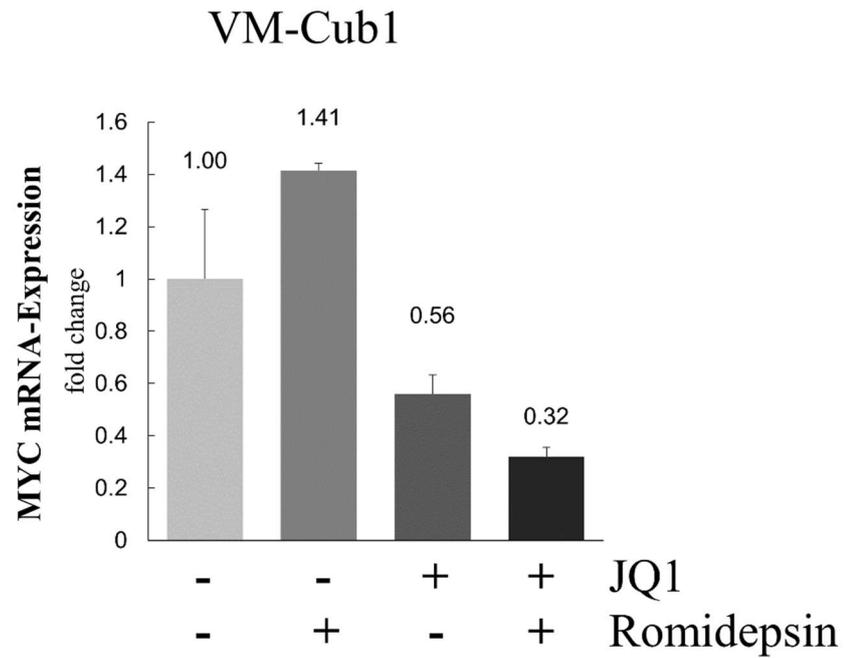


Abb. A2: Veränderung der MYC mRNA-Expression nach kombinierter HDAC- und BET-Inhibition in der UCC VM-Cub1. qRT-PCR, y-Achse: *fold change* relativ zum *Housekeeping*-Gen *TBP*, Behandlungsdauer 48 h, die Konzentrationen der verwendeten Substanzen entsprechen den Angaben in der Originalarbeit.

7 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Wolfgang A. Schulz danken für die Vergabe des Promotionsthemas. Während der Anfertigung der Arbeit im Labor hat er mir viel wissenschaftlichen Freiraum gelassen. Dank seiner ausgezeichneten Unterstützung hatte ich die Gelegenheit die Richtung dieser Arbeit mit zu entwickeln. Ich danke vielmals für die unzähligen wissenschaftlichen Ratschläge und Impulse sowie für die Unterstützung bei der Verschriftlichung dieser Arbeit!

Meiner Betreuerin Dr. Michèle J. Hoffmann möchte ich danken für ihre Anleitung und Unterstützung bei der praktischen Arbeit, für ihre Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse, für ihre vielen Ideen, die sie in die Arbeit mit eingebracht hat, für ihre Hilfe bei der Verschriftlichung und für ihre zum richtigen Zeitpunkt gelegentlich pragmatische Art, die mich wohl davor bewahrt hat, mich zu verzetteln.

Herrn PD Dr. Günter Niegisch und Dr. Maria Pinkerneil danke ich für ihre umfangreichen Vorarbeiten zu HDAC im Urothelkarzinom, die den Grundstein für diese Arbeit legten und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Christiane Hader möchte ich für die Einarbeitung im Labor danken. Die notwendige Sorgfalt und Präzision beim Experimentieren habe ich hier verinnerlicht. Mein Dank gilt Marija Lenzen für ihre technische Hilfe und Einarbeitung.

Ananda Ayyappan Jaguva Vasudevan danke ich für seine experimentelle Hilfe bei der Analyse der Histonacetylierung.

Margaretha, Johanna und allen anderen Labormitglieder danke ich für die großartige Zeit und die gegenseitige Unterstützung im Labor.

Meinen Eltern möchte ich danken für ihre bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums und für die Korrektur des Manuskripts.

Der Düsseldorf School of Oncology (DSO) danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums.