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

# Einfluss der Histondeacetylase HDAC4 auf Urothelkarzinomzelllinien

Dissertationsschrift

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

> Vorgelegt von Michael Leif Christian Beck 2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz Zweitgutacher: PD Dr. med. Jörg Felsberg

# Widmung

Diese Arbeit ist meiner Mutter, Dr. Maj-Helen Stein-Beck gewidmet, die mich stets in meinem kompletten Werdegang und besonders während meines Studiums sowie dieser Dissertation unterstützt hat. Sie hat mich mit ihrem Leistungswillen stets inspiriert und angetrieben. Besonders großen Dank möchte ich auch meiner Partnerin Katina Alva Gebert aussprechen, die mir im Alltag so viel gibt und mir Kraft und Klarsicht für diese Dissertation geschenkt hat. Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Ananda Ayyappan Jaguva Vasudevan, Michèle J. Hoffmann, Michael L. C. Beck, Gereon Poschmann, Patrick Petzsch, Constanze Wiek, Kai Stühler, Karl Köhrer, Wolfgang A. Schulz, Günter Niegisch: "HDAC5 Expression in Urothelial Carcinoma Cell Lines Inhibits Long-Term Proliferation but Can Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition" April 2019 International Journal of Molecular Sciences; 20(9). doi: 10.3390/ijms20092135

# I Zusammenfassung (deutsch)

Harnblasenkarzinome sind die fünfthäufigste Entität unter den bösartigen Neoplasien Europas und Urothelkarzinome (UC) die häufigste histologische Form. Die Therapieaussichten sind für Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (NMIBC) verhältnismäßig gut, jedoch entwickeln diese oft Rezidive mit dem Risiko einer Progression. Die Therapieaussichten für muskelinvasive Harnblasenkarzinome (MIBC) sind schlechter, bedingt auch durch ihre starke Heterogenität. Durch Hochdurchsatzsequenzierungen konnte eine molekularbiologische Typisierung von UC mit Bedeutung für Prognose und die Therapieauswahl erreicht werden. Dabei wurde auch eine Vielzahl von Veränderungen in epigenetischen Regulatoren beobachtet. Zu diesen zählen Histondeacetylasen (HDACs) die wegen ihrer genregulatorischen Eigenschaften von großer Bedeutung für die Proliferation, Differenzierung und Chemoresistenzentwicklung von UC sind. Bei UC und anderen Tumoren wurde vor allem der Einfluss von Klasse I HDACs auf neoplastische Eigenschaften bereits bewiesen. Die Bedeutung der Klasse IIa HDACs ist weniger gut bekannt. Zielsetzung dieser Dissertation war es daher, den Einfluss der Klasse IIa HDAC4 auf neoplastische Eigenschaften von UC-Zellen zu klären. Dazu wurden in UC-Zelllinien gezielte Überexpression oder ein Knockdown mittels siRNA-Interferenz durchgeführt. Sowohl in der Kurzzeitproliferation als auch in der Langzeitproliferation waren Zelllinien mit reduziertem HDAC4 noch in der Lage zu wachsen, jedoch ihren Kontrollen unterlegen. Auch nahm HDAC4 in der Zellzyklusanalyse Einfluss auf die G1 Phase. Zelllinien, die nach lentiviraler Transduktion HDAC4 wiesen keine signifikanten Unterschiede überexprimierten, bezüglich Kurzund Langzeitproliferation gegenüber Zellen mit Leervektor auf, auch bei der Migrationsfähigkeit konnte kein Unterschied festgestellt werden. Das Zellzyklusprofil ergab entsprechend keine Veränderungen. Morphologisch unterschieden sich die HDAC4 überexprimierenden Zelllinien ebenfalls nicht von ihren Leervektor Kontrollen. Western-Blot und Immunzytochemie belegten die Überexpression von HDAC4, wobei ein verändertes Verteilungsmuster mit großen randständigen Aggregaten dargestellt werden konnte. Bei der Differenzierung der benignen Urothelzelllinie HBLAK führte die Überexpression von HDAC4 zu Veränderungen in der Genexpression von KRT14 und KRT20. Dies spricht für eine Funktion von HDAC4 in der Differenzierung hin zu einem basalen Typ von Urothelzellen und passt zu Berichten wonach HDAC4 in einer inversen Beziehung zu FOXA1 steht, welches die Differenzierung zu luminalen Zellen steuert. In UCs könnte HDAC4 so zu einer Differenzierung zum basal-squamösen Subtyp beitragen. Daraus ergibt sich als Fragestellung für zukünftige Untersuchungen, ob eine auf HDAC4 gezielte Therapie in Kombination mit aktuellen auf Cisplatin basierten Chemotherapien anzuraten sein könnte.

Ι

# II Zusammenfassung (englisch)

Bladder cancer is the fifth most common malignant neoplasia in Europe and urothelial carcinoma (UC) is the most frequent histological subtype. The prognosis for patients with non-muscle invasive cancers (NMIBC) is usually favourable, but they often develop recurrences with a risk of progression. Prognosis for patients with muscle-invasive bladder cancers (MIBC) is much worse, caused among others by their pronounced heterogeneity. Based on high throughput sequencing studies UC can now be classified into molecular subtypes with relevance for prognosis and selection of therapy. In the course of these studies frequent alterations were observed in epigenetic regulators. Among these are histone deacetylases (HDACs), which are important for cell proliferation, differentiation and resistance to chemotherapy of UC due to their ability to regulate gene expression. The influence of class I HDACs, in particular, has been demonstrated for neoplastic properties of UC and other cancers. Much less is known about class IIa HDACs in this regard. For that reason, the aim of the present thesis was to elucidate the impact of the class IIa HDAC4 on neoplastic properties of UC cells. To that end, HDAC4 expression was modulated by lentiviral overexpression or siRNA-mediated down-regulation (knockdown) in UC cell lines. In both short-term and long-term proliferation assays, cell lines with down-regulated HDAC4 continued to grow, but were inferior to controls. Cell cycle profiles indicated an increased G1-phase fraction. Cell lines overexpressing HDAC4 following lentiviral transduction did not differ significantly from vector-only controls with respect to short-term and long-term proliferation, or migratory ability. No changes in cell cycle distribution were apparent. Likewise, no differences in morphology were apparent. Western blotting and immunocytochemistry confirmed substantial overexpression which resulted in an altered intracellular distribution with aggregation of HDAC4 at the cell edges. Overexpression of HDAC4 in the benign urothelial cell line HBLAK led to differences in expression of the differentiation markers KRT14 and KRT20 during basal growth and differentiation. This observation suggests a function of HDAC4 in directing urothelial differentiation towards a basal phenotype in keeping with reports that HDAC4 is inversely related to FOXA1, a transcription factor supporting luminal differentiation. In UC, therefore, HDAC4 might favour the basal-squamous subtype. The present findings could be extended by investigations on the therapeutic value of combining HDAC4 targeting with conventional cisplatin-based chemotherapy.

# III Abkürzungsverzeichnis

- AK = Antikörper
- APC = Adenomatous-polyposis-coli Protein
- ARID1A = AT-rich interactive domaincontaining protein 1A
- AS = Aminosäure
- ATM = ATM serine/threonine kinase
- BC = Harnblasenkarzinom
- BCG = Bacillus Calmette-Guérin
- Bkw = backward
- BSQD = Basal squamous differentiated
- CDKN1A= cyclin dependent kinase 1A
- CDKN2A= cyclin dependent kinase 2A
- CIS = Carcinoma in situ = TNM Abkürzung Tis
- CNV = Copy number variation
- CoA = Coenzym A
- DMEM = Dulbecco's Modified Eagle
- DMSO = Dimethylsulfoxid
- DNA = Desoxyribonukleinsäure
- EMT = Epithelial-mesenchymale Transition
- EP300 = Histone acetyltransferase p300
- FCS = Fetales Kälberserum
- FOXA1 = Forkhead box protein A1
- Fw = forward
- GATA = GATA-binding protein
- GC = Gemcitabine-Cisplatin
- HAT = Histon-Acetyltransferase
- HDAC = Histondeacetylase
- HIF-1 $\alpha$  = Hypoxia-inducible factor 1 alpha
- HRAS = Harvey-Rat-Sarcoma Protein
- kDa = Kilodalton
- KMT2D = Histone-lysine N-methyltransferase 2D
- LV = Leervektor
- MB = Megabasen
- MEF2 = Myocyte enhancer factor 2
- MGRI = molecular grade risk Index
- MIBC = Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
- miRNA = Micro Ribonukleinsäure
- MLL2 = Histone-lysine N-methyltransferase 2D

- mRNA = Messenger Ribonukleinsäure
- MVAC = Methotrexat-Vinblastin-Adriamycin-Cisplatin
- N-CoR = Nuclear receptor corepressor
- NAD+ = Nicotinamide adenine dinucleotide
- NMIBC = Nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom
- PARP1 = Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
- PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung
- PCR = Polymerase-Kettenreaktion
- PEST = Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) reiche Region
- PI = Propidium Jodide
- PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase
- PTEN = Phosphatase and Tensin homolog
- RB1 = Retinoblastom-Protein
- rcf = relative centrifugal force
- SD = standard deviation = Standardabweichung
- SDS = sodium dodecyl sulfate
- SCCs = squamous cell carcinomas; Plattenepithelkarzinom
- SNV = Einzelnukleotid-Varianten
- TCC = Transitional cell carcinoma = Übergangszellkarzinom = Urothelkarzinom
- TP53 = Protein p53
- TSC1 = Tuberous sclerosis 1 (hamartin)
- TUR-B = Die Transurethrale Resektion der Harnblase
- UCC = urothelial carcinoma = Urothelkarzinom

# Disclaimer

Aufgrund der besseren Lesbarkeit werden in der folgenden Dissertation bei Personen bezogenen Formulierungen auf eine Unterteilung des Genus verzichtet und auch wenn in der Regel der Maskulin verwendet wird sind hierbei, wenn nicht anders erwähnt, beide Geschlechter zu verstehen.

Des Weiteren werden zur besseren Unterscheidung Gennamen kursiv und Proteinnamen in Normalfont geschrieben, Zitate werden mit "…" und Eigennamen besonders aus dem englischen mit "…' dargestellt. Signifikante Ergebnisse werden mit einem \* gekennzeichnet.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung1
	1.1	Harnblasenkarzinome und Einblicke über ihre molekularen Mechanismen 1
	1.2	Therapie von Harnblasenkarzinomen 4
	1.3	HDACs als epigenetische Regulatoren5
	1.4	Klasse-IIa-HDAC4 im Urothel9
	1.5	Ziel der Arbeit 11
2	Mat	erial und Methoden 12
	2.1	Verwendete Urothelzelllinien
	2.2	Materialien
	2.3	Zellkultivierung 22
	2.4	Zellzahlbestimmung für funktionelle Experimente
	2.5	Dauerhafte Überexpression von HDAC4 in Zelllinien
	2.6	RNA-Interferenz zur Herabregulation von HDAC4
	2.7	MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung 24
	2.8	CellTiter-Glo zur Viabilitätsbestimmung25
	2.9	LIVE/DEAD Cell Viability Assays zur Zellzählung mit Bestimmung des Anteils toter
	zu leb	enden Zellen 25
	2.10	Bestimmung der Fähigkeit zur Koloniebildung und Langzeitproliferation
	2.11	Soft Agar Assay zur Bestimmung der Fähigkeit zur verankerungsunabhängigen
	Langze	ertproliferation
	2.12	Migrations-Assay zur Motilitätsbestimmung 27
	2.13	Durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung der Zellzyklus-Phasen 27
	2.14	Immuncytochemie zur Untersuchung der intrazellulären HDAC4-Verteilung 28
	2.15	Induktion der urothelialen Differenzierung in HBLAK-Zellen

	2.16	6 He	rstellung von Proteinlysaten aus Zellen	29
	2.17	' Pro	oteinkonzentrationsbestimmung in Proteinlysaten	29
	2.18	8 Pro	oteinnachweis über SDS-Page Gelelektrophorese und Western Blot	30
	2.19	) Str	ipping von Membranen und Reprobing von Proteinen	31
	2.20	) RN	A-Extraktion aus Zelllysat	31
	2.21	. Rev	verse Transkription zur Umwandlung von mRNA in cDNA	32
	2.22	Ge	nexpressionsbestimmung über Quantitative Echtzeit-PCR	32
	2.23	S Sta	tistik	33
3	B Er	gebni	sse	34
	3.1	Na	chweis der HDAC4 Expression im Western Blot	34
	3.2	Na	chweis der HDAC4 Überexpression mittels qPCR	36
	3.3	Au	swirkungen der HDAC4 Überexpression auf verschiedene Zelllinien	37
	3.	3.1	Proliferationsmessung mittels MTT-Test	38
	3.	3.2	Bestimmung der Zellproliferation mittels CellTiter Glo <sup>®</sup>	39
	3.	3.3	Fluoreszenzbasiertes Hochdurchsatz-Screening LIVE/DEAD Cell Viability Assa	ау
	(P	rolife	ration)	40
	3.	3.4	Proliferation im Vergleich	43
	3.	3.5	Klonogenität (Langzeitproliferation)	44
	3.	3.6	Koloniebildungsfähigkeit im Soft Agar Test	46
	3.	3.7	Migration	47
	3.	3.8	Immuncytochemie	49
	3.	3.9	Zellzyklusanalyse	51
	3.4	Dif	ferenzierung von HBLAK Zellen nach HDAC4 Überexpression	52
	3.5	HD	AC4 Herabregulation durch siRNA-Interferenz	55
	3.	5.1	Nachweis über siRNA Interferenz von HDAC4 Knockdowns	55
	3.	5.2	Proliferative Wirkung nach negativer Interferenz gegen HDAC4	57
	3.5.3		MTT-Test nach HDAC4 siRNA Interferenz	57

	3.5.	4 CellTiter-Glo <sup>®</sup> Test bei HDAC4 siRNA Interferenz 5	9
	3.5.	5 Klonogenität nach HDAC4 Knockdown 6	0
	3.5.	6 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse nach HDAC4 Interferenz	3
4	Disk	kussion	5
	4.1	HDAC4-Expression in urothelialen Zellen 6	6
	4.2	Proliferation im Urothel im Bezug zum HDAC4 Expressionsniveau	9
	4.3	Migration in Urothelkarzinomzellen im Bezug zum HDAC4 Expressionsniveau 7	3
	4.4	Einfluss von HDAC4 auf die Differenzierung7	4
	4.5	Klinische Relevanz von HDAC4 und Therapiemöglichkeiten	5
	4.6	Schlussfolgerung	6
5	Lite	ratur7	7

# 1 Einleitung

### 1.1 Harnblasenkarzinome und Einblicke über ihre molekularen Mechanismen

Harnblasenkarzinome (engl. *bladder carcinoma* = BC) sind die fünfthäufigste Tumorentität in westlichen Industrieländern. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen (2,8–3,2:1) (1, 2). Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 74 Jahren für Männer und 76 Jahren für Frauen erkranken Männer auch etwas früher (3). Menschen in Industriestaaten sind öfter betroffen als Menschen aus Entwicklungsländern (2). Das Erkrankungsrisiko erhöhen vor allem externe Risikofaktoren wie der Tabakabusus, aromatische Amine, verschiedene Medikamente und chronische Entzündungen.

Die meisten Harnblasenkarzinome sind histologisch Urothelkarzinome, daneben existieren noch die eher selten vorkommenden Plattenepithel- und Adenokarzinome. Das Urothel kommt in den Bereichen der ableitenden Harnwege vor, das heißt vom Nierenbecken über die Harnleiter und die Harnblase bis hin zu den oberen Abschnitten der Harnröhre. Es besteht aus mehrschichtigem Epithel und gliedert sich in drei Zellebenen, die mit der Basallamina in Verbindung stehen. Oberhalb der Stammzellen liegen dabei Basalzellen gefolgt von den Intermediärzellen und den luminal gelegenen Deckzellen, die wiederum mittels verschiedener Oberflächenstrukturen die Oberfläche des Gewebes versiegeln; dabei kann das Gewebe je nach Füllungszustand eine plattenepithelähnliche bis hochprismatische Struktur annehmen. Seine Hauptaufgabe ist es, das umgebende Gewebe vor Infiltration von Noxen der harngängigen Substanzen zu schützen. Dies wird vor allem durch die Crusta realisiert, welche den luminalen Teil der Deckzellen ausmacht und durch das Zusammenspiel von Uroplakinen, Glycanen, Lipiden und den `Tight Junctions` gebildet wird und die Oberfläche versiegelt. Das Urothel ist somit Teil der indirekten Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts.

Urothelkarzinome werden klinisch vor allem nach ihrem Grading und ihrem Staging eingeteilt. Das klassische Grading nach WHO über histopathologische Eigenschaften wird von G1 (Low Grade) bis G3 (High Grade) klassifiziert. Es ist inzwischen weitgehend durch eine dichotome Einteilung in *low grade* und *high grade* ersetzt worden. Neuerdings ist für nichtmuskelinvasive Tumoren auch ein molekularbiologisches Grading von I bis III (*molekular grade risk index,* MGRI) von Hedegaard et al. (4) vorgeschlagen worden. Das molekularbiologische Grading weist signifikante Ähnlichkeiten zum pathologischen Grading auf und könnte zielgerichtete Therapien anhand der molekularbiologischen Eigenschaften der Tumoren vereinfachen.

Das Staging wird nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, dabei werden die Ausbreitung des Primärtumors = T, der noduläre Lymphknotenbefall = N und die metastatische Ausbreitung = M bewertet. Für die Prognose ist vor allem entscheidend, ob die Urothelkarzinome nichtmuskelinvasiv (pTa, Cis, T1a/b; engl. *non muscle invasive bladder cancer* = NMIBC), also oberflächlich auf die Mucosa begrenzt, bis zur Lamina propria wachsen oder ob die Urothelkarzinome muskelinvasiv (ab pT2, engl. *muscle invasive bladder cancer* = MIBC) die Lamina propria durchbrechend wachsen. Die Inzidenz der NMIBC wird auf 70 %, die der MIBC auf 30 % geschätzt (5). Mit der Infiltration der Lamina muscularis mucosae gehen häufig Lymphknotenbefall und Metastasen einher.

Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten gibt es wesentlich mehr Aberrationen im Genom von Urothelkarzinomen (7,7 bis 5,5 pro MB), lediglich Lungenkarzinome und Melanome sind noch häufiger mutiert (2, 5, 6). Überraschenderweise ist diese hohe Mutationsrate in vielen Tumoren auf eine Fehlaktivität von *APOBEC3A/B* zurückzuführen (5). Jedoch kommen nicht nur Einzelnukleotid-Varianten (SNV), wie Punkt-, Deletions-, und Insertionsmutationen, sondern auch Chromosomenmutationen, in Form von Genkopienzahlvariationen (GCNV) oder Translokationen, vor. Das Chromosom 9p ist besonders häufig betroffen, in der Regel durch Deletionen.

In den letzten Jahren haben mehrere Forschungsgruppen versucht, eine einheitliche molekularbiologische Typisierung des Urothelkarzinoms zu etablieren, was sich jedoch aufgrund der ausgeprägten inter- und intratumoralen Heterogenität als schwierig herausgestellt hat, besonders bei MIBCs (7, 8). Invasive Urothelkarzinome lassen sich in mehrere Subtypen unterteilen, primär in basale, luminale sowie neuroendokrine/kleinzellige (9). In den allgemein aggressiveren basalen Karzinomen (basal squamous differentiated, BSQD) mit den Markern KRT14, KRT5 und KRT6 kommen morphologische und molekulare Differenzierungsmuster von Plattenepithelien vor. Die luminalen Urothelzellkarzinome sind oftmals durch FGFR3-Genmutationen bzw. aktivierende Genfusionen charakterisiert (10). Luminale Urothelkarzinome lassen sich weiter untergliedern, beispielsweise in papilläre, infiltrative und Zwischenformen. Der Subtyp der neuroendokrinen Tumoren macht weniger als 5 % der Fälle aus (5, 8, 9). Zelllinien aus Urothelkarzinomen können anhand molekularer und morphologischer Parameter ähnlich in drei Hauptgruppen, basal, luminal und ,non-type', klassifiziert werden (8). Dieser Typisierung folgend, wurden in dieser Arbeit folgende Urothelkarzinomzelllinien verwendet: basal: BFTC-905, VMCUB-1, SCaBER, 647 V, HT1376, 5637, KU1919, HT1197, HT1376; luminal: RT112, RT4, RT1128, UM-UC-1, ,non-type': SW1710\*, UMUC3, 253J\*, T24, 639V, J82 (10).

Differenziert zwischen muskelinvasiven und -nichtinvasiven Tumoren konnten molekularbiologische Veränderungen in Form von Mutationen ausfindig gemacht werden. In beiden Fällen ist die Regulation des Zellzyklus und seiner Kontrollpunkte durch *TP53* und *RB1* gestört (2), durch direkte Mutationen dieser Gene, *MDM2*-Überexpression oder *CDKN2A*-Deletion. Beiden gemeinsam sind auch aktivierende Promotormutationen im Telomerase-Gen *hTERT*.

Als eher für NMIBC typisch erwiesen sich die Mutationen von *FGFR3, PIK3CA, CDKN2A*(p16), *CREBBP*, *KDM6A*(UTX), *STAG2*, *TSC1*, *ERCC2*, *RBM10*, *HRAS*, *KRAS*(7, 8, 11). In NMIBC kommen insgesamt häufiger Mutationen vor, die zu einer gesteigerten Proliferation führen. Zu den epigenetischen Regulatoren gehören *CREBBP* (HAT) und *KDM6A* (Histon-Demethylase).

Bei MIBC finden sich Mutationen von *RB1*, *PTEN*, *TSC1*, *CDKN2A*(p16), *TP53*, *ATM*, *ARID1A*, *EP300*, *KMT2D*, MLL2, APC, *CDKN1A* (*p21*), *ELF3*, *FBXW7*, *KLF5*, *MDM2*, *NFE2L2*, *TSC2*, *TXNIP* sowie Amplifikationen wie die Expression der Onkogene *FGFR3*, *PIK3CA*, *EGFR*, *AKT1*, *CCND1*, *ERBB3*, *E2F3*, *FDFR1*, *HRAS*, *KRAS*, *RXRA* (7, 8, 11, 12). Auffällig häufig sind epigenetische Regulatoren wie die HATs *EP300*, *CREBBP* und die Histon-Methyltransferasen *KMT2C* und *KMT2D*, die Histondemethylase *KDM6A* (UTX) und das Chromatin-Remodellierungsprotein *ARID1A* betroffen.

Aufgrund der Heterogenität wird vermutet, dass die Neoplasien im Rahmen ihrer molekularbiologischen Stadien Entwicklung verschiedene durchlaufen und einzelne kontrollpunktartig Genmutationen mutieren, um so unterschiedliche Differenzierungswege einzugehen (Abbildung 1-1). So wird postuliert, dass



Abbildung 1-1 Flowchart zur schematischen Darstellung einer möglichen Tumorgenese basierend auf mehreren Zwischenschritten und variablen Tumorsubtypen

aus Metaplasien des Urothels mit noch intakter Zellzyklusregulation für den weiteren Verlauf zunächst eine grundlegende Richtung festgelegt wird, z. B. durch einen Verlust von *RB1* oder *CDKN2A*(p16), wodurch eine Differenzierung in jeweils eine urotheliale oder unstabile Vorstufe mit noch nicht karzinomatösem Charakter entsteht. Anschließend würden durch weitere Mutationen Differenzierungen in die weiteren Subtypen, wie die basalen, luminalen und unstabilen Typen, möglich (7). Hinweisgebend hierfür sind häufig gemeinsam vorkommende Mutationsmuster in allen Typen wie Mutationen von FGFR3, HRAS, KRAS und PIK3CA. Zudem legt dies die Vermutung einer fortlaufenden Entwicklung von NMIBC zum MIBC nahe. Durch molekularbiologische Expressionsanalyse kann so auf die einzelnen Typen geschlossen werden. Typische Expressionsmuster sind für den luminalen (urothelialen) Typen hohes FOXA1, PPARy, KRT20 FGFR3, RB1, UPK und niedriges CDKN2A (p16), unstabile Typen weisen wiederum wenig FGFR3, CCND1, KRT5, KRT14 sowie RB1 und viel CDKN2A (P16) auf und basale (squamöse) Typen exprimieren wenig FOXA1 sowie GATA3 und viel KRT5 und KRT14 (2, 7, 13).

#### 1.2 Therapie von Harnblasenkarzinomen

Nichtmuskelinvasive BCs können häufig gut chirurgisch mit einer transurethralen Resektion der Blase (TUR-B) therapiert werden; bei Hochrisikotumoren (bspw. Tis oder pT1 G2) kann eine adjuvante Therapie mittels attenuierter Mykobakterien vom Stamm Bacillus Calmette-Guérin (BCG) oder intravesikal applizierter Chemotherapie folgen. Jedoch kommt es häufig zu Rezidiven, weshalb eine intensive Nachsorge über viele Jahre notwendig ist (8). Aus diesem Grund gilt die Behandlung von BCs auch als besonders kostenintensiv. In höheren TNM-Stadien, vor allem bei MIBCs mit Metastasen, gibt es trotz radikaler Zystektomie mit bilateraler Lymphadenektomie aktuell nur wenig Aussicht auf eine kurative Behandlung. In Abhängigkeit vom Stadium der Erstdiagnose sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate von pT1 mit 95 %, über pT2 mit 63 % und pT3 mit 46 % bis auf niedrige 16 % bei pT4-Tumoren (2, 8) (14). Für die Prognose ist auch relevant, an welchem Subtyp von Harnblasentumor der Patient erkrankt ist. Luminale Tumoren haben dabei einen günstigeren Verlauf als basale Tumoren. Adjuvante oder neoadjuvante Kombinationschemotherapien mit Cis-Platin sind sehr nebenwirkungsbehaftet und haben nur limitierte Aussicht auf kurativen Erfolg. Zudem entwickeln BCs aufgrund ihrer Heterogenität häufig Resistenzmechanismen gegen Cis-Platin. In den letzten zwanzig Jahren hat sich wenig an dieser Behandlungsstrategie verändert (2, 15, 16). Eine Weiterentwicklung der Therapieschemata ergab sich durch die Umstellung von Methotrexat-Vinblastin-Adriamycin-Cisplatin (MVAC) auf die schonendere Gemcitabine-Cisplatin (GC)-Therapie (2, 17). Neuerdings sind Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen PD-1 / PD-L1 zugelassen worden, die bei einem Teil der Patienten mit metastasierten UC lebensverlängernd wirken (18–20).

In den letzten Jahren entwickelte sich neben der morphopathologischen/histopathologischen auch die molekularbiologische Diagnostik. Diese könnte es in Zukunft ermöglichen, jedem einzelnen Patienten eine angepasste, zielgerichtete (targeted) Therapie zukommen zu lassen. Es gibt dabei viele Ansatzpunkte, wobei im Fokus der Forschung die Suche nach Zielgenen steht, welche die neoplastischen Eigenschaften wie gesteigerte Proliferation oder die Progression hin zu besonders aggressiven Tumoren fördern. Auch wird anhand der molekularbiologischen Typisierung erforscht, welche Patienten von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitieren. Wichtig ist auch die Weiterentwicklung der aktuellen Cis-

platinbasierten Therapie, vor allem bei Tumoren, die eine Resistenz entwickeln, da trotz Immuncheckpoint-Inhibitoren die Aussichten schlecht sind und die Ein-Jahres-Überlebensrate lediglich bei 60 % liegt (2, 21, 22).

Vor diesem Hintergrund und wegen der häufigen Veränderungen in epigenetischen Regulatorproteinen werden auch zunehmend ,epigenetische Medikamente' in Betracht gezogen. Zu diesen gehören speziell Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDAC). Bisherige Untersuchungen über HDAC-Inhibitoren (HDACi), wie Vorinostat, Romidepsin und Obinostat, ergaben, dass diese zu einer Dekompaktierung des Chromatins führen, was terminale Differenzierung, Zellzyklus-Arrest oder DNA-Schäden zur Folge haben kann. Diese Veränderungen können von gesunden Zellen langfristig besser kompensiert werden als von neoplastischen (12, 23–27). Die meisten zurzeit in Erforschung befindlichen HDACi sind Pan-Inhibitoren oder wirken sogar auf weitere Zielmoleküle (28). Alle etablierten und noch in Forschung befindlichen Inhibitoren, speziell panHDACi, wiesen jedoch auch hohe Nebenwirkungsraten auf (29). Nach der Behandlung traten bislang vor allem Thrombozytopenie, Herzrhythmusstörungen, Abgeschlagenheit, Schwindel sowie Übelkeit und Erbrechen auf. Daher ergibt es Sinn, die HDAC-Inhibitoren auf bestimmte Isoenzyme zuzuschneiden (12). Besonders deuten bisherige Arbeiten an, dass die Hemmung von Klasse IIA HDACs im UC kontraproduktiv sein könnte. Inhibitoren dieser Klasse von HDACs (wie 2-Trifluoroacetyl-thiophen) sind Thema aktueller Forschung, woraus auch spezielle HDAC4-Inhibitoren resultieren können (30).

#### 1.3 HDACs als epigenetische Regulatoren

Die Epigenetik beschreibt die Mechanismen, die stabile Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, ohne dabei die DNA-Sequenz zu verändern, und zusätzlich noch vererbt werden können; dies gibt den Zellen die Möglichkeit, eine prinzipiell hohe phänotypische Plastizität zu erreichen, jedoch gleichzeitig stabile Phänotypen in einzelnen Zelltypen zu gewährleisten. Dieses wird durch Veränderungen der Chromatinstruktur realisiert, wobei u. a. durch Modifikationen der DNA und der Histone die Ablesemöglichkeit für einzelne Gene verändert wird. Dadurch können trotz derselben genomischen Sequenz verschiedene Phänotypen ausgebildet werden. Beteiligt sind vier Hauptmechanismen: die DNA-Methylierung vor allem an CpG-Dinukleotiden, nichtkodierende RNAs wie lncRNA und miRNA, Strukturveränderungen des Chromatins durch Remodellierung, vermittelt beispielsweise durch den SWI/SNF-Komplex, und die Modifikation von Histonen z. B. durch kovalente Methylierung und Acetylierung verschiedener Lysinreste (31, 32). Auf diese Weise nimmt die Epigenetik

einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften von Zellen, auch denen von Harnblasenkarzinomen. Neben Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressoren, die signifikant zur Tumorgenese beitragen, sind in dieser Tumorart häufig Gene von epigenetischen Regulatoren mutiert, was die Zelleigenschaften in karzinogener Weise verändert. Es wird geschätzt, dass so ca. 10 % der Genexpression beeinflusst werden (30). Im Vergleich zu anderen Tumoren weisen Urothelkarzinome dabei die höchste Rate an Mutationen in epigenetischen Regulatoren auf (28, 33). In einer Untersuchung des TCGA-Konsortiums waren in mindestens 76 % der Fälle mindestens ein epigenetischer Regulator und in 41 % der Fälle zwei oder mehr mutiert (34); dabei waren besonders häufig CREBBP, EP300, MLL (2/3), NCOR1, KDM6A/C(UTX/Y) als Histonmodifizierer und ARID1A und CHD2/4/5/6 als Chromatin-Remodellierer betroffen. Vermehrt treten solche Mutationen bei chemotherapieresistenten Tumoren auf (2, 28, 34). Neben dem Gleichgewicht aus De-/Methylierung, De-/Ubiquitinierung und De-/Phosphorylierung von Histonen ist vor allem auch der Acetylierungsgrad von entscheidender Bedeutung und eine der häufigsten epigenetischen Aberrationen in Tumoren (2).

Bedingt durch die Länge der DNA wird diese im Zellkern verpackt, dabei wickelt sie sich aufgrund ihres negativgeladenen Phosphat-Rückgrates um die Histonoktamere, welche mit freiem Arginin und Lysin-Enden eine positive Ladung aufweisen; so bilden sich Nukleosomen. Auf molekularer Ebene führt eine Hyperacetylierung der ε-Aminoseitengruppen durch Acetyltransferasen zur Neutralisierung dieser elektrostatischen Anziehungskräfte, wodurch sich das Chromatin in heterochromatischer Weise auflockert und zu einer gesteigerten Transkription der dort vorhandenen Gene führt. Vice versa führt eine Hypoacetylierung durch Deacetylasen zu einer reduzierten Expression. Im Nukleus übernehmen so Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) die Aufgabe die Lesbarkeit von Chromatin zu regulieren. Chemisch wird durch HATs dem Lysin aus Acetyl-CoA eine Acetylgruppe angefügt (35). HDACs nutzen dann Zn<sup>2+</sup> oder NAD+ als Coenzym für die Hydrolyse dieser Bindung. Durch die Hemmung der Genexpression erfüllen HDACs ihre Funktion als Korepressor, dabei wirken HDACs sowohl auf die Gene selbst als auch auf deren Promotorregion (30). So stehen die HAT- und HDAC-Enzyme als ,Writer' (HAT) oder ,Eraser' (HDAC) in Wechselwirkung zueinander. Je nach Gewebe- und Bedarfszustand sind beide Arten von Enzymen mehr oder weniger aktiv, um eine Erkennung (,Reading') acetylierter Histone durch Proteine mit einer Bromodomäne zu ermöglichen, was die Transkription einzelner Gene stimuliert. Die Bromodomäne umfasst einen ca. 110 AS langen Abschnitt, der acetylierte Lysine erkennt. Über verschiedene Bromodomänen enthaltende Proteine kann sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Zellen beeinflusst werden.

Typische Angriffsorte für die Acetylierung sind an den Histonen H3 und H4 zu finden, beispielsweise die Lysine H4K16, H3K9 und H3K27 (2, 30). Die Deacetylierung durch HDAC beeinflusst allerdings auch die Aktivität anderer Proteine, die durch Acetylierung als posttranslationale Modifikationen (PTM) reguliert werden. Dies erfolgt sowohl direkt, indem sie Lysine von ihrer Acetylgruppe befreien und damit für andere Modifikationen wie Methylierung zugänglich machen, als auch indirekt, indem sie über einen so genannten ,Crosstalk' Einfluss auf andere Enzyme nehmen, die andere PTM-Mechanismen wie Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung einführen oder entfernen. So wird beispielsweise durch die Deacetylierung von H3K9 die Methylierung von H3K4 reduziert (36). Daher ist der Begriff Histondeacetylasen insofern ungenau, als Acetylierungen und Deacetylierungen nicht nur an Histonen stattfinden; deshalb wäre der Begriff KDAC (K für Lysin) zutreffender. Es wurden viele weitere Proteine entdeckt, die ebenfalls unter dem Einfluss von HDACs acetyliert bzw. deacetyliert werden. Darunter sind neben den nukleären auch viele mitochondriale Proteine, aber auch Proteine der Signaltransduktion wie PI3K. An nukleären Proteinen seien p53, RB1, PTEN, Ku70 (XRCC6), p65 (RELA), c-Myc und p300 genannt. p300 (EP300) ist eine Histon-Acetyltransferase, deren Acetylierung zur Autoregulation beiträgt, und ein Beispiel dafür, wie HDACs in vielen Fällen andere epigenetische Regulatoren modulieren, darunter DNMT1, HATs, HMTs und sogar andere HDAC-Isoformen. Dies sind nur einige von den geschätzt 1 750 Proteinen, die von Mitgliedern der HDAC-Familie deacetyliert werden können (30, 37). HDACs weisen dabei jedoch keine spiegelbildliche Spezifität zu HATs auf. Zudem kann in vielen Fällen dasselbe Substrat bei Ausfall einer HDAC durch eine andere HDAC derselben Klasse oder sogar einer anderen Klasse deacetyliert werden (30).

Die HDACs bei Säugetieren werden anhand ihrer Ähnlichkeit zu ihren Äquivalenten (Orthologen) in der Hefe in vier Klassen eingeteilt (I–IV). Dabei wird die Klasse II subklassifiziert in IIa und IIb. Die Klasse III Enzyme, die Sirtuine, nehmen eine Sonderrolle ein, da sie NAD+ als Co-Enzym nutzen und nicht, wie die anderen drei Hauptklassen, ein Zn<sup>2+</sup>-Ion als prosthetische Gruppe besitzen. Insgesamt umfassen die HDACs 18 homologe Isoenzyme. Klasse-I-HDAC (verwandt mit Rpd3 der Hefe) besteht aus HDAC1, 2, 3 und 8, ist vornehmlich im Nukleus zu finden und weist in allen Geweben ähnliche Expressionsspiegel auf. Klasse IIa besteht aus HDAC4, 5, 7 und 9, Klasse IIb aus HDAC6 und 10, welche eine Verwandtschaft mit Hda1 der Hefe aufweisen. Die HDACs der Klasse II haben in unterschiedlichen Geweben spezifische Expressionsspiegel. So ist HDAC4 beispielsweise vor allem in quergestreifter Herzmuskulatur und dem Gehirn stark exprimiert. Die Klasse IV besteht nur aus HDAC11 (38, 39).

Der Einfluss von HDACs auf neoplastische Eigenschaften von Tumoren konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden. HDACs der Klasse I greifen unter anderem in den Zellzyklus ein und sind so von

entscheidender Bedeutung für die Proliferation (12). Über Experimente mit HDACi wurde ein Einfluss auf die Neovaskularisation über den Hypoxie-induzierten Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) und Chemokinrezeptoren 4 (CXR4) nachgewiesen. Auch bei resistenten UCCs konnte eine niedrige Konzentration von Klasse-IIa-HDACs festgestellt werden. Nach der Behandlung mit Vorinostat wiesen Zelllinien mit niedriger Expression von HDACs der Klasse IIa keine sonst üblichen Zellzyklusveränderungen auf, Veränderungen in der Expression von *CDKN1A, TS*- sowie EZH2 und Spaltung von *PARP* blieben aus; dies legt Resistenzmechanismen nahe (40). HDAC4 weist innerhalb von BCs eine negative Korrelation zu EZH2 auf, was zu zwei unterschiedlichen phänotypischen BCs führt. EZH2-dominierte BCs haben eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität, wohingegen HDAC4 eher zu einer Chemokin-induzierten Signaltransduktion mit Immunzellinfiltration führt (12). Diese Zusammenhänge könnten Hinweise sein dafür, dass hohe HDAC4-Niveaus eher tumorprotektive Wirkung haben (27, 41).

HDAC6 nimmt besonders Einfluss auf die Migration, durch die Dysregulation wurde eine veränderte F-Aktin-Expression festgestellt, welche mit einer erhöhten Motilität einhergeht (42). Einen besonders großen Beitrag zur Motilität und zu einer damit zusammenhängenden Infiltration leistet die epithelialmesenchymale Transition (EMT). Sie führt zu einem Verlust des epithelialen Charakters von Zell, primär gehen die Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen verloren. Im Urothel führt dies zum Verlust der Barrierefunktion und erleichtert die Dissemination und Infiltration des Gewebes führt. HDACs führen zu einer verstärkten EMT über die Verstärkung von EMT-Transkriptionsfaktoren (EMT-TF) wie Maelstrom Spermatogenic Transposon Silencer (MEAL) (43). Dieser Prozess ist jedoch reversibel durch mesenchymale-epitheliale Transition (MET), was einen möglichen Therapieansatz darstellt (44).

HDAC4 hat seinen Genlocus auf 2q37.3, ist 1.084 Aminosäuren (AS) lang und hat ein Molekulargewicht von 119 kDa. HDAC4 enthält drei Domänen. In der 620 AS (1– 620) umfassenden N-terminalen Domäne wirken verschiedene Effektoren modulierend. Hier wird die Aktivität von HDAC4 reguliert, so dass diese Domäne Einfluss auf den Transport zwischen Nukleus und Cytoplasma hat. Darauf folgt das katalytische Zentrum mit einer Länge von 420 AS (621–1039), welches aus vier  $\alpha$ -Helices besteht, in deren Zentrum Zinkionen gebunden sind



HDAC4 Abbildung 1-2 3D-Modell von HDAC4. Neben der Gesamtstruktur von HDAC4 sind die α-Helices und das katalytische Zentrum gut zu erkennen; aus: Seto, Yoshida 2014 (1) - Cold Spring Harbor Laboratory Press ©.

(Abbildung 1). Dieses übt die eigentliche Funktion als HDAC aus, nämlich die Deacetylierung der AS Lysin.

Ihm folgt ein C-terminaler Rest aus 44 AS (1040–1084) (39, 45). Zur Ausübung seiner enzymatischen Fähigkeit bildet HDAC4 häufig einen Komplex zusammen mit HDAC3 und SMRT/N-CoR als Korepressor (30, 45).

### 1.4 Klasse-IIa-HDAC4 im Urothel

Vorarbeiten im Urologischen Forschungslabor hatten sich mit Klasse-I-HDACs (46), speziell mit HDAC8 (47) und der Klasse-IIb-HDAC6 (48) beschäftigt. In dieser Arbeit liegt der Fokus nun auf HDACs der Klasse IIa, im Speziellen auf dem Enzym HDAC4. Grund dafür ist auch, dass dieses von anderen Forschungsgruppen als besonders relevant für das Harnblasenkarzinom postuliert wurde (12, 27, 28). Chromatin-Immunpräzipitation-Untersuchungen ergaben, dass HDAC4 auf mehrere Genabschnitte regulierend wirkt. Diese weisen ein heterogenes Verteilungsmuster auf und es ergibt sich so eine komplexe Wirkung von HDAC4 in vielen Genen, wobei die Mehrzahl der Gene stummgeschaltet wird (49). Zu bedenken ist auch, auf welche Gene HDAC4 wirkt; die Herabregulation eines Repressors kann auch zu einer verstärkten Proliferation führen (50).

Die Transkription von HDAC4 wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert; so binden Sp1 und Sp3 an CG-reiche Abschnitte des *HDAC4*-Promotors (39, 51). Die HDAC4-Expression kann durch miRNAs am 3'-UTR-Ende seiner mRNA posttranskriptionell reguliert werden. Auf diese Weise können miR-1, miR-29, miR-140, miR-155, miR-200a, miR-206 und miR-365 zur posttranslationalen Degradation und Translationshemmung von HDAC4 in unterschiedlichen Geweben führen. Besonders hervorzuheben ist miR-200a, da vermehrtes HDAC4 selbst die Transkription von miR-200a hemmt, was auf einen Feedbackmechanismus schließen lässt. Ob jedoch eine ähnliche Wirkung im Urothel zu erwarten ist, ist unbekannt (39). HDAC4 wird auch durch weitere posttranskriptionelle Einflussfaktoren stark reguliert. MEF2, welches sich Ca<sup>2+</sup> als Co-Faktor bedient, interagiert mit dem N-terminalen Ende von HDAC4; es wird vermutet das es auch im Urothel als Transkriptionsaktivator agiert. Der SMRT/N-CoR-Komplex, mit dem HDAC4 interagieren kann, wirkt wiederum reprimierend auf die HDAC4-Expression (2, 11, 52).

Die **Aktivität** von HDAC4 kann durch enzymatische Veränderungen beeinflusst werden. So kann HDAC4 durch posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM) wie Phosphorylierung, aber auch durch Sumoylierung, Ubiquitinierung oder Carbonylierung in seiner Funktion beeinflusst werden oder Caspaseabhängig gespalten werden (39).

Proteine der 14-3-3-Familie, speziell YWHAA/YWHAB und YWHAG, binden direkt an HDAC4, wenn an dessen Nterminalem Ende drei Serin-Reste phosphoryliert vorliegen. Durch die Phosphorylierung hemmen die Proteine der 14-3-3-Familie den Transport in den Nucleus wodurch HDAC4 in seiner Funktion als Korepressor gehemmt wird.



Abbildung 1-3 Seto, Yoshida 2014 – Erasers of histone acetylation – Shuttling von HDAC4 zwischen Nucleus und Cytoplasma vermittelt durch Proteine der 14-3-3-Familie Seto, Yoshida 2014 (1) - Cold Spring Harbor Laboratory Press ©.

Die Phosphorylierung von HDAC4 an Serin (S) 246, S467 und S632 und weiteren AS wird durch verschiedene Proteinkinasen, CaMK, PKA, PKD, GSK3, SIK, CHEK1 und MARK, katalysiert. Ein Gegenspieler ist PP2A, welche HDAC4 dephosphorylieren kann (30, 39, 52). Bei Mutanten von HDAC4, bei denen das N-terminale Ende mit seinen letzten AS 180 fehlt, befand sich HDAC4 überproportional stark im Cytoplasma, was auf eine regulierende Rolle auch dieser Domäne hinweist (52). PKA wiederum phosphoryliert HDAC4 an Tyrosin (Y) 207 und vermittelt damit seine Spaltung. GSK vermittelt die Phosphorylierung von S302 und führt zu einem proteasomalen Abbau von HDAC4. Eine Sumoylierung durch SUMO1 findet am Lysin K559 statt und reduziert die transkriptionelle Repression von HDAC4 (38, 39). Der dominierende Abbauweg von HDAC4 unterscheidet sich von dem Abbau anderer HDACs; HDAC4 kann über Spaltung an dem in den PEST-Sequenzen gelegenen Asp289 von Caspase 3 vermittelt abgebaut werden (53, 54). Die Halbwertszeit liegt somit bei weniger als 8 h (39, 55). Die Halbwertszeit der mRNA beträgt weniger als 4 h (39, 55).

HDAC4 wird nach RNA-Sequenzierdaten in gesunden urothelialen Geweben mit einer Häufigkeit von 7,1 RPKM exprimiert, damit hat es eine eher durchschnittliche Expression im Vergleich zu den anderen Vertretern der HDAC-Familie (von HDAC9 0,6 RPKM bis HDAC1 37,5 RPKM) (2). Grundsätzlich ist HDAC4 mRNA bei Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs) geringer exprimiert als bei normalen Urothelzellen (NUC) (27). Hohe mRNA-Konzentrationen von HDACs spiegeln jedoch nicht immer auch eine hohe Translation zu den entsprechenden HDAC-Protein-Konzentrationen wider (27). Wie die Familie der HDACs insgesamt weist HDAC4 in Urothelkarzinomen nur sehr geringe Mutationsraten (0,2 % – 2,4 %) auf, fällt innerhalb der Familie jedoch mit einem hohen Anteil von Deletionen auf (2). Beachtenswert ist auch, dass NCORE1, welches u. a. HDAC4 reguliert, relativ häufig mutiert ist (28).

Im Gegensatz zu HDACs der Klasse I, die ubiquitär in den Geweben exprimiert sind, weisen HDACs der Klasse II spezifischere Expressionsmuster auf. Nicht nur zwischen Geweben gibt es Unterschiede in der

Expression von HDAC4, sondern auch innerhalb von Urothelkarzinomen scheint die Expression nach Subtyp zu differieren. Demnach sollen HDAC4 und HDAC9 vermehrt in UCCs des basal-squamösen Typs und non-types vorkommen (8).

Die Expression von HDAC4 und HDAC9 korreliert entsprechend invers zum Peroxisom-Proliferatoraktivierten Rezeptor Gamma (PPARy) und Forkhead-Box-Protein A1 (FOXA1), deren hohe Expression für die Differenzierung hin zu luminalen Zelltypen entscheidend ist. HDAC4 und HDAC9 korrelieren stattdessen mit hohen Expressionen von KRT14 und KRT5, welche den basal-squamösen Subtyp charakterisieren, kommen jedoch auch häufig in neuroendokrinen Tumoren vor (8).

#### 1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund der eingangs erwähnten begrenzten Therapieaussichten mit schlechter Prognose für Patienten mit MIBC, der Chemotherapieresistenzen bei diesen Tumoren und der häufigen Rezidive von NMIBCs ist weitere Forschung zum Harnblasenkarzinom wichtig. In dieser Arbeit soll der Einfluss von HDAC4 auf die Eigenschaften von Zelllinien aus invasiven Harnblasenkarzinomen bestimmt werden.

Aufgrund der häufigen Mutation von HATs wie EP300 und CREBBP in BCs könnte die pharmakologische Inhibition von HDACs einen guten Ansatz in der Therapie bilden, um zur veränderten Aktivität der HATs ein Gegengewicht zu schaffen. In klinischen Studien erwies sich, dass (Pan)-HDAC-Inhibitoren in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen starke Nebenwirkungen aufweisen. Eine Überlegung ist daher, ob eine gezielte Inhibition von HDAC4 zu einer besseren oder zumindest verträglicheren Therapie beitragen kann. Eine gezielte pharmakologische Hemmung von HDAC4 könnte in Kombination mit anderen Medikamenten durch synergistische Effekte die Wirksamkeit steigern und nebenwirkungsärmere Dosen erlauben. Dazu muss aber die biologische Funktion von HDAC4 im BC besser verstanden werden. Vor diesem Hintergrund wurden im Einzelnen folgende Ziele verfolgt:

- Bislang war insgesamt wenig über die Expression von HDAC4 auf mRNA- und Proteinebene im Urothel bekannt. Deshalb wurde die relative mRNA-Expression über qPCR und die Protein-Expression von HDAC4 über Western-Blot-Analysen über mehrere Zelllinien hinweg untersucht. Daraus lässt sich schließen, ob die mRNA-Expression mit der des Proteins korreliert. Weiterhin ist interessant, ob die HDAC4-Expression in den einzelnen Zelllinien mit molekularen Subtypen korreliert.
- Da HDAC4 in Urothelkarzinomen vergleichsweise eher vermindert exprimiert ist, wurde HDAC4 in Urothelkarzinomzelllinien über einen lentiviralen Vektor überexprimiert, so dass die Auswirkung

eines hohen HDAC4-Niveaus auf die neoplastischen Eigenschaften von HDAC4 untersucht werden kann.

- Inhibition von HDACs der Klasse I verändert den Zellzyklus ebenso wie Lang- und Kurzzeitproliferation von UCC (12). Die Fragestellung in dieser Arbeit war nun, ob auch HDAC4 einen Einfluss auf die Zellzyklusregulation und das proliferative Verhalten von UCC nimmt. Diese Eigenschaften werden nach Überexpression bzw. nach siRNA-mediiertem Knockdown von HDAC4 analysiert. Dabei wurden jeweils mehrere Zelllinien eingesetzt, um die Heterogenität des UC zu berücksichtigen und Unterschiede erfassen zu können.
- Die Migration von Karzinomzellen oft im Zusammenhang einer EMT führt zu einem infiltrativen Wachstum und verstärkt so die Metastasierungsfähigkeit. Neben den morphologischen Veränderungen in der Zellkultur wurde ein besonderer Fokus auf die Untersuchung des Migrationsverhaltens gelegt und auch die Invasionsfähigkeit untersucht.
- Nach einem erfolgreichen Lösen maligner Zellen aus dem ursprünglichen Gewebe ist für die Metastasierungsfähigkeit wichtig, ob die nun frei zirkulierenden Zellen auch außerhalb ihres angestammten Zellverbunds fähig sind zu proliferieren. Daher wurden die Urothelkarzinomzelllinien über den Soft Agar Assay dahingehend getestet, ob sie auch zu verankerungsunabhängigem Wachstum in der Lage sind.
- HDAC4 scheint einen besonderen Einfluss auf die Differenzierung verschiedener Zelltypen zu haben. Im Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom könnte weiterhin eine unterschiedliche Expression zwischen unterschiedlich differenzierten molekularen Subtypen postuliert werden. Daher wurde untersucht, wie sich eine Veränderung der HDAC4-Expression auf die Differenzierung urothelialer Zellen in der Kultur auswirkt.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Verwendete Urothelzelllinien

Untersucht wurden kommerziell erhältliche Urothelkarzinomzelllinien sowie immortalisierte nichtkarzinomatöse Urothelzelllinien aus dem Urologischen Forschungslabor am Universitätsklinikum Düsseldorf. In den Versuchen zur Überexpression von HDAC4 kamen die Urothelkarzinomzelllinien RT-112, SW1710 und UM-UC-3 sowie spontan immortalisierte Urothelzellen der Zelllinie HBLAK (56) zur Anwendung, die jeweils mit einem Vektor lentiviral transduziert wurden (siehe Kap. 2.5). Dabei gab es von jeder Zelllinie jeweils eine Kontrolllinie mit einem Leervektor (i. F. auch Vektor) sowie eine Linie mit HDAC4-Überexpression (i. F. HDAC4); beide enthielten jeweils ein Puromycinresistenz-Gen. Zu beachten ist, das UM-UC-3 Wildtypen eine Punktmutation in HDAC4 aufweisen (8).

In den Untersuchungen zur Herabregulation von HDAC4 kamen die Urothelkarzinomzelllinien SW1710, BFTC-905, 253J sowie T24 zum Einsatz.

Zum Vergleich wurden zusätzlich Proteinextrakte weiterer Urothel(karzinom)zelllinien verwendet (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Name	Geschlecht	Alter	Referenz	Morphologie	TNM, G
Primäre Zellen (*Immortalisierte)					
*HBLAK	m	80	Hoffmann et al. 2016	epithelial	
UP242			Swiatkowski 2013	epithelial	
*TERT-NHUC		?	Chapman et al., 2006)	epithelial	
Urothelkarzing	omzelllinien (	UCCs)			
RT-112	m	?	Marshall et al. 1977	epithelial	G2
SW1710	w	84	Wright et al. 1981	elongiert, epithel-ähnlich	G3
UM-UC-3	m	?	Grossman et al.1986	mesenchymal	G3
BFTC-905	w	51	Tzeng et al. 1996	epithelial; bilden Inseln	Ta, G3
253J	m	53	Elliott et al. 1974	epithel-ähnliche	T4, G4
BC61	m	?	Koch et al. 2012	epithelial	pTaG2
HT-1197	m	44	Rasheed et al. 1977	epithel-ähnlich	G4
HT-1376	w	44	Rasheed et al. 1977	epithelial	T2, G3
J82	m	58	Fogh et al. 1977	epithel-ähnlich	TCC, G3
KU-19-19	m	76	Tachibana et al. 1995	epithel-ähnlich	
MGH-U4	m	57	Lin et al. 1985		
RT-4	m	63	Rigby et al. 1970	epithel-ähnlich	рТ2, G1
SCaBER	m	58	O'Toole et al. 1976	epithelial	SCC
SD	m	?	Paulie et al. 1983	epithelial	TCC
T24	w	82	Bubenik et al. 1973	mesenchymal	TCC, G3

Tabelle 2-1 Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften

UM-UC-6	m	?	Grossman et al. 1986		TCC
VM-CUB-1	m	?	Fogh et al. 1978	epithelial	тсс
5637	m	68	Fogh et al. 1977	epithelial	TCC, G2
639V	m	69	Elliott et al. 1976	epithel-ähnlich	TCC, G3
647V	m	59	Elliott et al. 1976	epithelial	T1, G2

# 2.2 Materialien

#### Tabelle 2-2 Labortechnische Geräte

Hersteller	Bezeichnung
Zellkultur	
Gelaire Flow Laboratories	BSB 4A
Gelaire Flow Laboratories	BSB
Thermo Fisher Scientific Inc.	HeracelITM 150i
Kendro Laboratory Products	Heraeus B6030
Tuttnauer Systec	3870 ELV
Mikroskope/Zellzähler	
Nikon GmbH	Eclipse Ts2
Nikon GmbH	Eclipse TE2000-S
Nikon GmbH	Eclipse 400
Bio-Rad Laboratories, Inc.	TC20 <sup>™</sup> Automated Cell Counter
NIS Elements	
Western Blot	
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Power PAC 200
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Power PAC Basic
Bio-Rad Laboratories, Inc.	ChemiDoc Imagin System
Bio-Rad Laboratories, Inc.	ImageLab
C-digit	Li-Cor 3600
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Trans-Blot Turbo Transfer System
	Mini Protean <sup>®</sup> Tetra Cell
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Gelelektrophoresetank
Scanner	
Canon	CanoScan 4400F

BMG Labtechnologies       Fluostar Optima         CellTiter-Glo®       Marshall Scientific         Marshall Scientific       Wallac Victor 2- Multilabel Counter         Software Wallarc 1420       Perkin Elmer Life Science         RNA-Spektralphotometrie       Intermo Fisher Scientific Inc.         Nanodrop 2000       Parkin Elmer Life Science         Zentrifugen / Vortex- mischer/Schüttler       Nanodrop 2000         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS2 Sobasic         Durchflusszytometrie (FACS)       Mitenyi Biotec GmbH         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuantify <sup>me</sup> GPCR       Improvement Case         Roche       LightCycler® 96         Biometra       Trio Thermoblock         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       GT140         Revco Scientific <th>MTT / BCA</th> <th></th>	MTT / BCA	
CellTiter-Glo®       Wallac Victor 2- Multilabel Counter         Software Wallarc 1420       Perkin Elmer Life Science         RNA-Spektralphotometrie       Image: Construct Science         RNA-Spektralphotometrie       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex-       mischer/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5418 (mini)         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS2 Sobasic         Durchflusszytometrie (FACS)       Durchflusszytometrie (FACS)         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant full weige Content Plattform         QPCR       PrayScan XTI Live High Content Plattform         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       GT140         Revco Scientific       ULT390-3-V12         Pipetterhilfen       2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl         Eppendorf AG       S000 µl<	BMG Labtechnologies	Fluostar Optima
CellTiter-Glo®       Wallac Victor 2- Multilabel Counter         Software Wallarc 1420       Perkin Elmer Life Science         RNA-Spektralphotometrie       Interno Fisher Scientific Inc.         Thermo Fisher Scientific Inc.       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex-       imischer/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS250basic         Durchfluszytometrie (FACS)       Miltenyi Biotec GmbH         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuantify"         City/Dead Assay       Thermo Fisher Scientific Inc.         ArrayScan XTI Live High Content Plattform       GFL         Soft Agar       GGL         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       GT140         Revco Scientific       UL'1390-3-V12         Pipettierhilfen       2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl         Eppendorf AG       Soto0 µl		
Marshall Scientific       Wallac Victor 2- Multilabel Counter         Software Wallarc 1420       Perkin Elmer Life Science         RNA-Spektralphotometrie       Image: Construct Science         Rnew Scientific Inc.       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex- mischer/Schüttler       Image: Construct Science         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge S810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       MS2 Minisphaker         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS250basic         Durchflusszytometrie (FACS)       Image: Construct Scientific Inc.         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Malyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Ymmetrie         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Scientific Inc.         ArrayScan XTI Live High Content Plattform       Image: Construct Scientific Inc.         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       Image: Construct Scientific         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       Cattal         Air Liquide       Cattal </td <td>CellTiter-Glo<sup>®</sup></td> <td></td>	CellTiter-Glo <sup>®</sup>	
Software Wallarc 1420 Perkin Elmer Life Science RNA-Spektralphotometrie Thermo Fisher Scientific Inc. Nanodrop 2000 Zentrifugen / Vortex- mischer/Schüttler Beckmann Coulter Allegra 21R Centrifuge Beckmann Coulter Allegra 25 Centrifuge Eppendorf AG Centrifuge 5815 Eppendorf AG Centrifuge 5810 IKA*-Werke GmbH & CO. KG MS2 Minishaker IKA*-Werke GmbH & CO. KG MS2 Minishaker IKA*-Werke GmbH & CO. KG MS2 Minishaker IKA*-Werke GmbH MACSQuant Analyzer* Miltenyi Biotec GmbH MACSQuantify <sup>™</sup> Itive/Dead Assay Thermo Fisher Scientific Inc. ArrayScan XTI Live High Content Plattform QPCR GFL Soft Agar GFL Soft Agar GFL Saft Liquide ARPEGE 110 Air Liquide ARPEGE 110 Air Liquide ARPEGE 110 Air Liquide Eppendorf AG Suppendorf AG Suppendorf Suppendorf Suppendorf AG Suppendorf AG Suppendorf AG Suppendorf AG ARPEGE 110 Air Liquide ARPEGE 110 Air Liquide Eppendorf AG Suppendorf AG Suppendorf AG AG Multipette* E3x	Marshall Scientific	Wallac Victor 2- Multilabel Counter
RNA-Spektralphotometrie         Thermo Fisher Scientific Inc.       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex-       Imischer/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Minispin         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       MS2 Minishaker         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS250basic         Durchflusszytometrie (FACS)       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant fy™         QPCR       IghtCycler® 96         Biometra       Trio Thermoblock         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       ArrayO-3-V12         Pipettierhilfen       2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl         Eppendorf AG       S000 µl	Software Wallarc 1420	Perkin Elmer Life Science
RNA-Spektralphotometrie       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex-       mischer/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Minispin         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         KA®-Werke GmbH & CO. KG       MS2 Minishaker         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS2 Sobasic         Durchflusszytometrie (FACS)       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant filter         Ver/Dead Assay       Itive/Dead Assay         Thermo Fisher Scientific Inc.       ArrayScan XTI Live High Content Plattform         GPCR       GR         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       ARPEGE 110         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       GT140         Revco Scientific       ULT390-3-V12         Pipetterhilfen       2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl         Eppendorf AG       S000 µl		
Thermo Fisher Scientific Inc.       Nanodrop 2000         Zentrifugen / Vortex-       Imascher/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Minispin         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       MS2 Minishaker         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS250basic         Durchflusszytometrie (FACS)       Miltenyi Biotec GmbH         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuantify™         Live/Dead Assay       Itive/Dead Assay         Thermo Fisher Scientific Inc.       ArrayScan XTI Live High Content Plattform         GPCR       GFL         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       Kühlung/Stickstofftank         Air Liquide       ARPEGE 110         Air Liquide       GT140         Revco Scientific       ULT390-3-V12         Pipettierhilfen       2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl         Eppendorf AG       S000 µl	RNA-Spektralphotometrie	
Zentrifugen / Vortex- mischer/Schüttler         Beckmann Coulter       Allegra 21R Centrifuge         Beckmann Coulter       Allegra 25 Centrifuge         Eppendorf AG       Minispin         Eppendorf AG       Centrifuge 5815         Eppendorf AG       Centrifuge 5810         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       MS2 Minishaker         IKA®-Werke GmbH & CO. KG       KS250basic         Durchflusszytometrie (FACS)       MACSQuant Analyzer®         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuant fy™         Miltenyi Biotec GmbH       MACSQuantify™         GPCR       IghtCycler® 96         Biometra       Trio Thermoblock         GFL       1038         Sartorius       LC3201D         Kühlung/Stickstofftank       Kitluide         ArrEGE 110       Air Liquide         ARPEGE 110       Air Liquide         Arrey Scientific       ULT390-3-V12         Eppendorf AG       S000 µl         Eppendorf AG       S000 µl         Eppendorf AG       S000 µl         Eppendorf AG       S000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc.	Nanodrop 2000
Zentrifugen / Vortex- mischer/SchüttlerAllegra 21R CentrifugeBeckmann CoulterAllegra 25 CentrifugeBeckmann CoulterAllegra 25 CentrifugeEppendorf AGMinispinEppendorf AGCentrifuge 5815Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayItem Content PlattformgPCRItem Content PlattformGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankGT140Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 1000 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGS000 µlEppendorf AGMultipette® E3x		
Beckmann CoulterAllegra 21R CentrifugeBeckmann CoulterAllegra 25 CentrifugeEppendorf AGCentrifuge 5815Eppendorf AGCentrifuge 5810Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant fullMiltenyi Biotec GmbHMACSQuant fullLive/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformGPCRIghtCycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Eppendorf AGS00 µlEppendorf AGMultipette® E3x	Zentrifugen / Vortex- mischer/Schüttler	
Beckmann CoulterAllegra 25 CentrifugeEppendorf AGMinispinEppendorf AGCentrifuge 5815Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA*-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA*-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer*Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant fiyTMUPGPCRArrayScan XTI Live High Content PlattformQPCRIBiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificGT140Revco Scientific2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGMultipette* E3x	Beckmann Coulter	Allegra 21R Centrifuge
Eppendorf AGMinispinEppendorf AGCentrifuge 5815Eppendorf AGCentrifuge 5810Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)Miltenyi Biotec GmbHMiltenyi Biotec GmbHMACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant fy™Live/Dead AssayItive/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformgPCRRocheBiometraTrio ThermoblockSoft AgarIti38GFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Beckmann Coulter	Allegra 25 Centrifuge
Eppendorf AGCentrifuge 5815Eppendorf AGCentrifuge 5418 (mini)Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayItive/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformgPCRItightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarIti38GFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankArPEGE 110Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Eppendorf AG	Minispin
Eppendorf AGCentrifuge 5418 (mini)Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayItive/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformgPCRItightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μl 5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Eppendorf AG	Centrifuge 5815
Eppendorf AGCentrifuge 5810IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformgPCRRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Eppendorf AG	Centrifuge 5418 (mini)
IKA®-Werke GmbH & CO. KGMS2 MinishakerIKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)MACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayIterv/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRIteght Cycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Eppendorf AG5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Eppendorf AG	Centrifuge 5810
IKA®-Werke GmbH & CO. KGKS250basicDurchflusszytometrie (FACS)Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl 5000 µlEppendorf AGMultipette® E3x	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	MS2 Minishaker
LineImage: style	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	KS250basic
Durchflusszytometrie (FACS)Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayIThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRIRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGMultipette® E3x		
Miltenyi Biotec GmbHMACSQuant Analyzer®Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayIThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRIRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarIGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGMultipette® E3x	Durchflusszytometrie (FACS)	
Miltenyi Biotec GmbHMACSQuantify™Live/Dead AssayIThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRIRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarIGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGMultipette® E3x	Miltenyi Biotec GmbH	MACSQuant Analyzer <sup>®</sup>
Live/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCR	Miltenyi Biotec GmbH	MACSQuantify™
Live/Dead AssayThermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCRIRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarIGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGMultipette® E3x		
Thermo Fisher Scientific Inc.ArrayScan XTI Live High Content PlattformqPCR	Live/Dead Assay	
qPCRRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarIntermoblockGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankArr LiquideAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGMultipette® E3x	Thermo Fisher Scientific Inc.	ArrayScan XTI Live High Content Plattform
qPCRRocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft AgarGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 µl, 10 µl, 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µlEppendorf AGS000 µlEppendorf AGMultipette® E3x		
RocheLightCycler® 96BiometraTrio ThermoblockSoft Agar	qPCR	
BiometraTrio ThermoblockSoft Agar	Roche	LightCycler <sup>®</sup> 96
Soft AgarGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μl 5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Biometra	Trio Thermoblock
Soft AgarGFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12PipettierhilfenEppendorf AG2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGMultipette® E3x		
GFL1038SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGS000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Soft Agar	
SartoriusLC3201DKühlung/StickstofftankArAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGS000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	GFL	1038
Kühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGS000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Sartorius	LC3201D
Kühlung/StickstofftankAir LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AG5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x		
Air LiquideARPEGE 110Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AG5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Kühlung/Stickstofftank	
Air LiquideGT140Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AG5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Air Liquide	ARPEGE 110
Revco ScientificULT390-3-V12Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AG5000 μlEppendorf AGMultipette® E3x	Air Liquide	GT140
Pipettierhilfen2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μlEppendorf AGEppendorf AGMultipette® E3x	Revco Scientific	ULT390-3-V12
Pipettierhilfen         2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μl           Eppendorf AG         5000 μl           Eppendorf AG         Multipette <sup>®</sup> E3x		
2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μl           Eppendorf AG         5000 μl           Eppendorf AG         Multipette® E3x	Pipettierhilfen	
Eppendorf AG Multipette® E3x	Eppendorf AG	2,5 μl, 10 μl, 20 μl 100 μl 200 μl 1000 μl 5000 μl
	Eppendorf AG	Multipette <sup>®</sup> E3x

	Eppendorf Research <sup>®</sup> plus
Gilson	2 μl, 10 μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1000 μl
Hirschmann Laborgeräte	Pipetus

#### Tabelle 2-3 Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Bezeichnung	REF
	T-75 Cell Culture Flask 75 cm <sup>2</sup> red	
Greiner Bio-One International GmbH	filter screw	658 175
	T-25 Cell Culture Flask 25 cm <sup>2</sup> red	
Greiner Bio-One International GmbH	filter screw	690 175
	T-25 HBLAK Cell Culture Flask 25	
Greiner Bio-One International GmbH	cm <sup>2</sup> blue filter screw	690 975
Greiner Bio-One International GmbH	6-Well	83.3920
Greiner Bio-One International GmbH	24-Well Cell Culture Plate	662 160
Greiner Bio-One International GmbH	96-Well Cell Culture Plate	655 180
Greiner Bio-One International GmbH	96-Well Advance TC Plate (HBLAK)	655 980
Greiner Bio-One International GmbH	96-Well HBLAK CtG	655983
Greiner Bio-One International GmbH	96-Well CtG	655098
Greiner Bio-One International GmbH	Cell Culture Dish 145 mm	639160
Greiner Bio-One International GmbH	Cell Culture Dish 60 mm	628160
Sarstedt AG & Co. KG	TC-Schale	83.3902
Sarstedt AG & Co. KG	Tube 5 ml	60.558.001
Sarstedt AG & Co. KG	Tube 15 ml	60.732
Sarstedt AG & Co. KG	Tube 5 ml FACS	55.476
Greiner Bio-One International GmbH	Tubes 15 ml	188 271
	Tubes 50 ml conical bottom with	
Greiner Bio-One International GmbH	sup. Skirt	210 261
Greiner Bio-One International GmbH	Tubes 50 ml conical bottom	227 261
	Cell Counting Slides TC20™ Cell	
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Counter, Dual-Chamber	#1450011
		Z763667-
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Nunc <sup>®</sup> CryoTubes <sup>®</sup>	2000EA
Engelbrecht medizin- und	Objektträger	6122
	Nitril Classia	200420
ABENA	Nitrii Classic	290420
Greiner Bio-One International GmbH	1000 µl Pipettenspitzen (gestopft)	750261
Greiner Bio-One International GmbH	100 µl Pipettenspitzen (gestopft)	/3/261
Greiner Bio-One International GmbH	10 μl Pipettenspitzen (gestopft)	771261
Star Lab	1000 µl Pipettenspitzen	51111-2820
Star Lab	100 µl Pipettenspitzen	S1120-8810
Star Lab	10 μl Pipettenspitzen	S1120-380
		CLS4486-
Costar <sup>®</sup> Sigma-Aldrich Corp.	Stripetten 2 mL	1000EA

Costar <sup>®</sup> Sigma-Aldrich Corp.	Stripetten 5 mL	CLS4487-200EA
Costar <sup>®</sup> Sigma-Aldrich Corp.	Stripetten 10 mL	CLS4488-200EA
Costar <sup>®</sup> Sigma-Aldrich Corp.	Stripetten 25 mL	CLS4489-200EA
BRAND GMBH + CO KG	Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	747720
Sarstedt AG & Co. KG	Zellschaber	83.1830
	Culture-Inserts 2 Well for self-	
ibidi GmbH	insertion	80209
	MicroAmp <sup>™</sup> Fast Optical 96-Well	
Applied Biosystems ™	Reaction Plate	4346907

### Tabelle 2-4 Reagenzien

Hersteller	Chemikalie (Abkürzung)	REF
QIAGEN GmbH	QIAzol <sup>®</sup> Lysis Reagent	79306
Merck KGaA	Formaldehyd 37 %	K50921303901
VWR Chemicals	Ethanol absolut	20821.33
Merck KGaA	Giemsa azur eosin methyline	1.09204.0500
Merck KGaA	Kristall violett	15940
GIBCO	DMEM+ Glutamax + EDTA	31966-021
Biochrom AG	Fetal Bovine Serum (FCS)	S0115
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537-500ML
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Kollagen IV Lyophilisat	c5533-5
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Accutase	a6964-100ml
Becton Dicson	Difco™ Agar - Noble	214220
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Trypan Blue (TB)	#1450021
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Trypan Blue (TB)	T8154
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	P8340
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Proteaseinhibitorcocktail (PIC)	P-8340
Merck KGaA	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	s7368584709
Carl Roth GmbH + Co. KG	Tween-20	2326.2
Merck KGaA	Tween <sup>®</sup> 20 (Polysorbat)	8.221840500
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Chlarity™ Western ECL Substrat	Cat# 1705061
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Chlarity Max™ Western ECL Substrat	Cat# 1705062
Merk	PVDF-Transfere Membrane	IPVH000010
Bio-Rad Laboratories, Inc.	10x Tris/Glycine/SDS Buffer	161-0732
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Ponceau Solution	P-7170
Invitrogen AG	Lipofectamine <sup>®</sup> RNAiMAX	REF 13778-150
GIBCO	Trypsin -EDTA 0,25 %	25200-056
CELLnTEC Advanced Cell Systems AG	Cryo-define	CnT-Cryo-50
Thermo Fisher Scientific Inc.	Hoechst 33342	H1399
	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-	
	Diphenyltetrazoliumbromid (MTT	
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Formazan)	57360-69-7

Dako	Fluorescence Mounting Medium	S3023
CELLnTEC Advanced Cell Systems AG	CnT Prime	CnT-PR
Carl Roth GmbH + Co. KG	Milchpulver Blotting-Grade, pulv., fettarm	68514-61-4
GIBCO	Opti-MEM <sup>®</sup> + Glutamax <sup>™</sup>	Ref 51985-026
	PageRuler™ Prestained 10-180 kDa Protein	
Thermo Fisher Scientific Inc.	Ladder	PI26617
Thermo Fisher Scientific Inc.	Calcein-AM	C3100MP
Invitrogen	Puromycin	A1113802
GIBCO	Defined Keratinocyte-SFM	# 10744019
Carl Roth GmbH + Co. KG	Polyacrylamid (PAA)	3029.1
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Ammoniumpersulfat (APS)	A3678
	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
Fluka	(TMED)	T9281
Merck KGaA	Essigsäure	100063
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Dimethylsulfoxid (DMSO)	1.02952
GIBCO	Penicillin/Streptomycin	15140122
Sigma-Aldrich Corp. (Merck KGaA)	Triton X-100	9002-93-1
VWR Chemicals	Glycin	56-40-6
Merck KGaA	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108382
Merck KGaA	Salzsäure 25 % (HCl)	100316
Merck KGaA	Glycerol	137028
QIAGEN GmbH	HotStarTaq DNA Polymerase	203203
Cytoskeleton Inc.	Rhodamin Phalloidin	# PHDR1

Tabelle	2-5	Puffer,	Gemische
---------	-----	---------	----------

Puffer	Inhalt		
Nicoletti	PBS		
	Triton X-100	0,1 %	
	Natriumcitrat	0,1 %	
	Ethanol	70 %	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 M	
	ddH <sub>2</sub> O		
RIPA	NaCl	150 mM	
	NP-40/Nonident p40	1%	
	DOC/Na- Desoxycholat	0,5 %	
	SDS	0,1 %	
	EDTA	1 mM	
	EGTA	1 mM	
	Na-Vanadat	1 mM	
	Tris pH 7,6	50 mM	
	NaF	10 mM	

	Na-Pyrophosphat	10 mM
	ddH2O	
Laemmli	DTT	216 mM
	Tris-HCl	348 mM
	Glycerol	30 %
	SDS	10 %
	Bromphenolblau	0,1 %
Blotting/ Transfer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 %
	ddH20	ad 1 L
TBS	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	150 mM
TBS-T	NaCl	150 mM
	Tris-HCl	100 mM
	Tween-20	0,1 %
	ddH <sub>2</sub> 0	ad 1 L
Elektrophorese/		
Laufpuffer	10x Tris, Glycin SDS	100 ml
	ddH <sub>2</sub> 0	ad 1 L
1,5 M Tris pH 6,8	Tris-HCl	500 mM
	SDS	4 %
1,5 M Tris pH 8,8	Tris-HCl	1500 mM
	SDS	4 %
Stripping	Glycin	1,5 %
	Tween-20	1 %
	SDS	0,01 %
	ddH <sub>2</sub> 0	Ad 1 L

Tabelle 2-6 Kits

Hersteller	Bezeichnung	REF
Promega	CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Ref G7571
	CellTiter-Glo <sup>®</sup> Substrat	G755A
	CellTiter-Glo <sup>®</sup> Buffer	G756A
QIAGEN GmbH	Rneasy <sup>®</sup> Mini Kit (250)	Ref 74106
	RPE Buffer	
	Collection Tubes	
	Mini Spin Collum	
QIAGEN GmbH	QIAshredder	79656

QIAGEN GmbH	QuantiTect <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit (200)	205313
	gDNA Wipeout Buffer, 7x	
	RNase-free water	
	Quantiscript Reverse Transcriptase	
	Quantiscript RT Buffer, 5x	
	RT Primer Mix	
QIAGEN GmbH	QuantiTect SYBR Green PCR	204145
Miltenyi Biotec GmbH	MACSQuant <sup>®</sup> Running Buffer	130-092-747
	MACSQuant <sup>®</sup> Storage solution	130-092-748
Pierce <sup>™</sup> /Thermo Scientific <sup>™</sup>	BCA Protein Assay Kit	23225

#### Tabelle 2-7 Verwendete siRNAs

Hersteller	Bezeichnung	# Cat
	siRNA silencer select	
Ambion™	single HDAC7	43924420
	siRNA silencer select	
Ambion™	single HDAC4	4392420
	On-Target plus Smart	
Dharmacon™	Pool HDAC4	4392L-003497-00-0005
Ambion™	neg siRNA	4390846

#### Tabelle 2-8 Verwendete Primer

Hersteller	Name	Primer Sequenz	REF
biomors not CmbU	QRT HDAC4		
	fwd	5GACCCAATGCGCTGTC3	00233365-10
biomers.net GmbH	QRT HDAC4 rev	5TGAGCCTCGAADAACG3	00233365-11
biomers.net GmbH	QRT HDAC7 rev	5GGATGGCATTTTGGGT3	00233365-9
biomors not CmbH	QRT HDAC7		
biomers.net GmbH	fwd	5CCATGACCTCCATCTG3	00233365-8
biomers.net GmbH	KRT14 fwd	5GCGCACCATGAACCTG3	00242223-22
Eurofins Scientific SE	KRT14 rev	5CCTCCAGCGTGCCAATCATC3	41-4087-10/14
Eurofins Scientific SE	TBP fwd	5ACAACAGCCTGCCACCTT3	47-2168-17/18
biomers.net GmbH	TBP rev	5GAATAGGCTGGTCAGT3	00260454-8
Eurofins Scientific SE	KRT20 fwd	5GAACTGAGGTTCAACTAACGGAGC3	h24315 7-4122-24/39 0
Eurofins Scientific SE	KRT20 rev	5TGGCTAACTGGCTGCTGTAACG3	/39 0

Hersteller	Name	Funktion		Verdünnung
Santa Cruz		Mouse Anti		1:500
Biotechnology	1. AK HDAC4	HDAC4	#sc-48390	
Santa Cruz		Mouse Anti		1:1.000
Biotechnology	1. AK HDAC4	HDAC4	#sc-46672	
Santa Cruz				1:1.000
Biotechnology	1. AK HDAC7	Anti HDAC7	#sc-74565	
	1. AK Rabbit Anti α-	Rabbit Anti α-		1:50.000
Abcam	Tubulin	Tubulin	#ab 4074	
Santa Cruz				1:5.000
Biotechnology	2. AK Goat Anti-Mouse	Goat Anti-Mouse	#sc-2005	
Abcam	2. AK Goat Anti-Rabbit	Goat Anti-Rabbit	# ab 6721	1:5.000
Bio-Rad Laboratories,	2. AK Goat Anti Mouse			1:5.000
Inc.	lgG	Goat Anti Mouse	#170-6516	
Cytoskeleton Inc.	Rhodamin Phalloidin	Anti F-Aktin	# PHDR1	1:1.000
Invitrogen	Alexa Fluor 488	Anti-mouse IgG	#Z25002	1:500

#### Tabelle 2-9 Verwendete Antikörper

#### Tabelle 2-10 Gele

Gel	Reagenz Anteil	
Sammelgel	ddH2O	4,6 ml
	PAA 30 %	2,7 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
	10 % SDS	0,1 ml
	10 % APS	0,1 ml
	TEMED	10 µl
Trenngel	ddH2O	3,4 ml
(8 % PAA)	PAA 30 %	0,83 ml
	1,5 M Tris pH 6,8	0,63 ml
	10 % SDS	50 μl
	10 % APS	50 μl
	TEMED	5 μΙ

### 2.3 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die Kulturen wurden regelmäßig auf mikroskopisch erkennbaren Keimbefall, sowie per PCR auf Mycoplasmen-Kontamination getestet. Urothelkarzinomzelllinien wurden in Zellkulturplastikgefäßen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) und GlutaMAX<sup>™</sup> (modifiziertes L-Glutamin) mit 10 % hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (iFCS) gehalten. Die Kulturgefäße für die HBLAK-Zelllinie wurden mit Kollagen-IV (1 mg/ml in 0,1 % Essigsäure) mindestens 30 Minuten beschichtet. Als Nährmedium für HBLAK wurde Cnt Prime (CELLnTEC Advanced Cell Systems AG) verwendet. Cnt-Prime ist ein chemisch definiertes Nährmedium mit Zusätzen an zellspezifischen Wachstumsfaktoren ohne pH-Indikator. Zur Selektionierung des eingebrachten Vektors wurde 0,5-1 µg/ml Puromycin zugesetzt.

Um die Zellen für funktionelle Experimente und Passagen abzulösen, wurde Trypsin 0,5 % + EDTA bzw. für HBLAK Accutase® verwendet. Dabei wurden die Kulturen nach Waschen in PBS jeweils für 3-10 Minuten bis zur Auflösung des Zellverbandes bei 37 °C mit der jeweiligen Proteaselösung inkubiert. Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert. Accutase® ist ein kollagenolytisches und proteolytisches Enzym für eine schonendere Ablösung der Zellen. Das Enzym inaktiviert im Verlauf der Inkubation und wurde letztendlich mittels Zentrifugation und Verdünnung der Zellsuspension physikalisch entfernt. Die Kultivierung fand in einem Inkubator Heracell<sup>™</sup> 150i (Thermo Scientific) bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C bei 100 % Wasserdampfsättigung (0,179 hPa) statt. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 2 bis 4 Tage beim Erreichen einer subkonfluenten Kulturdichte. Die Zellen wurden dann in Kulturflaschen mit entsprechender Menge Nährmedium (T-25 8 ml, T-75 12 ml) und entsprechenden Zusätzen gehalten. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen nach dem Ablösen zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in einer 1:1 Mischung aus DMSO und Kryomedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend schrittweise tiefgefroren, nämlich 24 h bei -20 °C, weitere 24 h bei -80 °C und abschließend in flüssigem Stickstoff endgelagert.

## 2.4 Zellzahlbestimmung für funktionelle Experimente

Für funktionelle Experimente wurden mittels *TC20™ Automated Cell Counter* (BioRad) in einem 1:1-Gemisch aus Trypanblau (TB) und Zellsuspension die Zahl der vitalen, also nicht

Trypanblau-gefärbten Zellen bestimmt, um diese anschließend entsprechend der gewünschten Zellzahl auszusäen. In Einzelfällen wurde die Zellzahl manuell nach Trypanblau-Färbung in standardisierten Zählkammern nach Neubauer ermittelt. Dabei wurden 9 µl der Zellsuspension in die Zählkammer aufgebracht und vier Quadranten unter einem Mikroskop gezählt, gemittelt und entsprechend der Normierung x1000 in die Zellkonzentration umgerechnet.

### 2.5 Dauerhafte Überexpression von HDAC4 in Zelllinien

Zur dauerhaften Überexpression von HDAC4 wurden die Zelllinien mit einem Lentivirus infiziert, der die cDNA von HDAC4 enthält; als Kontrolle wurden Zelllinien mit einem Lentivirus ohne diese cDNA (Leervektor) infiziert. Zur Herstellung des lentiviralen Vektors diente das Plasmid pic2CL12Ipwo, das außerdem einen Selektionsmarker für Puromycin-Resistenz enthält. Das entstandene Plasmid puc2CL12IPwo-HDAC4-FLAG bzw. das Kontrollkonstrukt wurde in HEK-293T Zellen transfiziert, zusammen mit dem Helferplasmid (pCD/NL-BH) (57) und dem Hüllvektor (pczVSV-G) (58). Die entstehenden Viren sind replikationsdefizient, können aber die Zielzellen infizieren und die übertragene virale Sequenz mit der HDAC4 cDNA in deren Genom integrieren. Auf diese Weise wurden die Zelllinien RT-112, UM-UC-3, SW1710 und HBLAK transduziert. Das DNA-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Maria Pinkerneil (Urologisches Forschungslabor der Uniklinik Düsseldorf) hergestellt, die Transduktion wurde im Forschungslabor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde von Dr. Constanze Wiek durchgeführt (59); die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin und die Expansion der transduzierten Zelllinien führte Dr. Jaguva Vasudevan Ananda Ayyappan (Urologisches Forschungslabor der Uniklinik Düsseldorf) der Senten Se

## 2.6 RNA-Interferenz zur Herabregulation von HDAC4

RNA-Interferenz ist eine Methode, durch welche mit Hilfe von kurzen RNA-Oligonukleotid Sequenzen, bezeichnet als small interfering RNA (siRNA), die Translation einer mRNA unterbunden wird; in der Regel wird die mRNA dann abgebaut.

Zu Beginn wurden die Zelllinien mit einer Zelldichte von 150.000 Zellen/Well in Triplikaten auf 6 Well-Platten ausgesät. Zur Transfektion über Liposomen (20 μM *Lipofectamine® RNAiMAX*,

Invitrogen AG) wurde siRNA (10 nM) gegen HDAC4 (Target) in einem *Opti-MEM* Nährmedium den kultivierten Zellen beigemischt. Als Kontrolle wurde jeweils mit siRNA behandelt, die nicht spezifisch an mRNA bindet (non-Targeting). Die siRNA überwindet in den liposomalen Transportvesikeln die Zellmembran, bindet an ihre komplementären Sequenzen in der mRNA und führt zum Abbau über den RNA-induced silencing complex (RISC). Die eingesetzte siRNA gegen HDAC4 stellt eine Mischung (i. F. Pool) aus mehreren einzelnen siRNA-Sequenzen dar, dies Mischung erhöht die Wahrscheinlichkeit die mRNA abzubauen dadurch, dass diese an mehreren sich ergänzenden Punkten angegriffen werden. Nach der Transfektion inkubierten die Zellen je nach Experiment 1-3 Tage. Die berichtete Halbwertszeit für HDAC4 Protein beträgt unter 8 h, für die HDAC4 mRNA weniger als 4 h (55). Zur Qualitätskontrolle wurde die Verminderung der HDAC4-Expression mittels Western Blot nachgewiesen.

#### 2.7 MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Kurzzeitproliferation, beispielsweise zum Vergleich von mit Leervektor oder HDAC4 transduzierten Zelllinien, kam der MTT-Assay zum Einsatz. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und zu Formazan umgewandelt. Der Assay schätzt also die Zahl der vitalen Zellen über ihre metabolische Aktivität ab, wobei primär die Menge der Zellen und in gewissem Umfang deren relativer metabolischer Umsatz relevant sind. MTT wird zum Teil von der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase reduziert, z.T. durch NADH und NADPH aus dem endoplasmatischem Retikulum, welches den Farbumschlag bedingt (60). Zur Durchführung wurden je 1.500 Zellen (HBLAK 3.000 Zellen) in 100 μl Kulturmedium je Well auf einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. Es wurden entsprechend für jeden Messtag eine 96-Wellplatte mit allen zu messenden Zelllinien in jeweils vier technischen Replikaten ausgesät. Daraufhin wurde im Verlauf von jeweils 4 Tagen (in den zeitlichen Intervallen von 24, 48, 72 und 96 Stunden) gemessen (4x 4 Proben). Pro Platte wurde zusätzlich jeweils eine Leerkontrolle nur mit Medium (Blank) ausgesät. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die peripheren Wells mit PBS gefüllt. Vor der Messung wurde den jeweiligen Kulturen 10 µl des MTT-Reagenz hinzugefügt und dann jeweils für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei Wasserdampfsättigung Inkubator inkubiert. Anschließend im wurde das MTT/Mediengemisch verworfen und 50 µl DMSO für weitere 5 Minuten auf die Zellen gegeben, um die Formazankristalle zu lösen und detektierbar zu machen. Daraufhin wurde

eine Messung der Adsorption bei 550 nm in Referenz zu 620 nm in einem Microplate Reader Fourstar Optima (BMG <sup>™</sup>) durchgeführt, um das blau-violette Formazan, welches aus dem gelblichen MTT entsteht, zu detektieren. Die Messungen wurden jeweils in Form eines Vergleichs zwischen Testzelllinie und der jeweiligen Kontrollzelllinie dargestellt (Überexpression vs. Leerektor und Targeting siRNA Knockdown vs. non-Targeting siRNA Knockdown). In den grafischen Darstellungen ist jeweils die Absorption in der Kontrolle am ersten Messtag, bezeichnet als Tag 1, als 100 % gesetzt; die Werte an den darauffolgenden Messtagen sind dazu ins Verhältnis gesetzt.

## 2.8 CellTiter-Glo zur Viabilitätsbestimmung

Ein zweites Verfahren zur Bestimmung der Kurzzeitproliferation ist der CellTiter-Glo Assay der Fa. Promega; er misst die Gesamtmenge an ATP mittels einer Luciferase aus Photinus Pyralis, unter der Annahme, dass die Menge an ATP proportional zur Zahl vitaler Zellen ist.

Zur Durchführung wurden je 1.500 Zellen in 100 µl je Well auf einer 96-Well Zellkulturplatte und vier Replikate jeder Probe sowie vier Medium-Leerproben (Blank) pro Messtag erstellt. Anschließend wurde über vier Tage hinweg gemessen. Die Messungen fanden jeweils im Abstand von 24 Stunden statt. Vor der Messung wurde den jeweiligen Kulturen 100 µl das CelTiter-Glo<sup>®</sup>-Reagenz hinzugefügt, danach inkubierten sie für jeweils 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei Wasserdampfsättigung im Inkubator. Daraufhin wurde die Lumineszenz in einem *Wallac Victor 2 Multilabel Counter* (Marshall Scientific) gemessen.

# 2.9 LIVE/DEAD Cell Viability Assays zur Zellzählung mit Bestimmung des Anteils toter zu lebenden Zellen

Die Zellen wurden auf 96-Well Platten in vier Aliquots ausgesät, jeweils für HDAC4 und Leervektor Zellinien. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Zellzahlen je nach Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellinie eingesetzt (SW1710 = 1000 Zellen/Well, UM-UC-3 = 800 Zellen/Well, RT112 = 2500 Zellen/Well). Jeweils einen Tag vor der Messung wurde - als Positivkontrolle für Apoptose - eine Hälfte der Replikate mit JQ1 0,5 µmol/l und 2 µmol/l Romidepsin behandelt, um Apoptose zu induzieren (61). Gemessen wurde jeweils am 1.-4. Tag nach Aussaat. Am Tag der jeweiligen Untersuchung wurden die Zellen mit den
Fluoreszenz-Farbstoffen Hoechst 33342, Calcein-AM und Propidiumiodid für 20 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen in 50 μl PBS/Well gemessen. Gemessen wurde in einer ArrayScan XTI Live High Content Plattform (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit eingestellten Extinktionsfiltern von 386 nm, 485 nm und 560 nm. Analysen erfolgten dann mit dem Programm HCS Studio Cellomics Scan (Thermo Fisher Scientific Inc.) (62).

#### 2.10 Bestimmung der Fähigkeit zur Koloniebildung und Langzeitproliferation

Die Fähigkeit zur Langzeitproliferation sowie die Fähigkeit aus einzelnen Zellen neue Kulturen zu bilden, wurde über den Klonogenitäts-Assay geprüft (63). Nach Auflösen des Zellverbandes wurden die Zellen jeweils in einer Konzentration von 1.500 Zellen/2 ml je Well auf 6-Well Platten ausgesät und über einen Zeitraum von 7-10 Tagen (je nach Zelllinie) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung inkubiert. Es wurden jeweils drei Replikate der Test- und der Kontrollgruppe auf einer Platte inkubiert. Bei RNA-Interferenzexperimenten waren die Zellen vorher mit entsprechender siRNA vorbehandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in PBS gewaschen, mittels Methanols fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mittels Giemsa Azur-Eosin- Methylenblaufärbung für 5 Minuten gefärbt und dann unter fließendem Wasser gewaschen. Die gefärbten Schalen wurden über einen CanoScan 4400F dokumentiert und die Auswertung wurde mittels ImageJ (Vers 1.52n) und dem Macro "Klonogenität" (siehe Anhang) erstellt.

# 2.11 Soft Agar Assay zur Bestimmung der Fähigkeit zur verankerungsunabhängigen Langzeitproliferation

Um die Fähigkeit zur Koloniebildung bei verankerungsunabhängigem Wachstum zu prüfen, kam ein Soft Agar-Assay zum Einsatz. In einer 6 cm Durchmesser betragenden Kulturschale wurde ein 0,6 % Agar Boden (Bottom Layer) und ein 0,4 % Agar Deckschicht (Top Layer) gegossen. Dazu wurde Nobel Agar (Becton Dicson) 1,2 % ad ddH<sub>2</sub>O in einer Mikrowelle thermisch gelöst, anschließend autoklaviert und bei 40 °C im Wasserbad bei Arbeitstemperatur gehalten. Die Agar-Lösung wurde 1:1 mit 2x DMEM vermischt in die Kulturschale gegeben, um den Bottom Layer zu bilden. Nach Erkalten des Bottom Layers wurde der Top Layer auf dieselbe Art unter Zugabe der Zellensuspension (50.000 Zellen/ml) erstellt und darüber ausgesät. Über einen Zeitraum von 10 bis 14 Tagen wurde beobachtet, ob die Zellen in der Lage waren, Kolonien zu bilden. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt, alle 2 Tage wurde 700 µl Nährmedium hinzugegeben, um dem Eintrocknen der Kulturen vorzubeugen. Die Kulturen wurden mittels einer Färbelösung (0,001 % Kristallviolett in 10 % MeOH ad 1 ml ddH2O) über 1 Stunde inkubiert und anschließend gewaschen. Abschließend fand eine fotomikroskopische Dokumentation statt. Dabei wurden jeweils 9 Sichtfelder nach Anzahl von Kolonien (>20 Zellen) ausgezählt.

## 2.12 Migrations-Assay zur Motilitätsbestimmung

Um die Motilität der Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Migrations-Assay genutzt. Es wurden dabei in 24-Wellplatten jeweils eine Trennkammer mit je zwei Kompartimenten gesetzt und zwei orthogonale Hilfslinien zwischen den Kompartimenten auf

der außenliegenden Seite der Platte gezogen. Die Kompartimente wurden jeweils mit 25.000 Zellen/100 µl je gefüllt und jeweils 4 technische Kopien erstellt. Nach 24 Stunden, sobald sich die Zellen am Untergrund verankert hatten, wurde die Trennkammer vorsichtig entfernt, wodurch ein zellloser, 500 µm großer Spalt zwischen den Kompartimenten entsteht. Um nicht angeheftete Zellen zu

entfernen, wurden die Wells mit PBS gewaschen und anschließend 500 μl DMEM + GlutaMax zugegeben. Fotomikroskopisch wurde

Abbildung 2-1 Schematische Darstellung Migrations Assay

X4

alle 2 Stunden, jeweils an den Hilfslinien, der Abstand zwischen den Zellfronten gemessen, bis zu ihrem Aufeinandertreffen.

## 2.13 Durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung der Zellzyklus-

#### Phasen

Um die Verteilung der Zellen zwischen den Zellzyklusphasen quantitativ zu messen, kam die Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) zur Anwendung. Dazu werden die Zellen aus ihrem Verbund getrennt. Anschließend wird in den vereinzelten Zellen über einen DNA-interkalierenden Farbstoff der Gehalt an DNA gemessen und anhand dessen die Zellzyklusphase geschätzt. Nach dem Lösen der Zellen aus ihrem Kulturgefäß wurden die Zellen zusammen mit ihrem Überstand bei 1.000 rcf abzentrifugiert. Dieser wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und der Überstand nach einer Zentrifugation erneut abgesaugt. Zur Fixierung und Färbung wurden die Zellen in 500 µl *Nicoletti-Puffer* mit 50 µg/ml Propidium-Iodid resuspendiert und für 30 Minuten bei ca. 20 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem MACSQuant Analyzer® (Miltenyi Biotec GmbH) und dem Programm MACSQuantify<sup>™</sup> Vers 2.12.0 (Miltenyi Biotec GmbH) auf die Propidium-Iodid-Fluoreszenz analysiert. Die Ergebnisse wurden in einem Histogramm (Y: Häufigkeit/X Intensität) dargestellt (64). Dabei wurden immer insgesamt 40.000 Zellen gezählt.

## 2.14 Immuncytochemie zur Untersuchung der intrazellulären HDAC4-Verteilung

Zur antikörpervermittelten Lokalisationsbestimmung über Fluoreszenz kam die Immuncytochemie zum Einsatz. Dabei kann fluoreszenzmikroskopisch die Verteilung eines Moleküls, wie in diesem Fall HDAC4, in Zellkompartimenten dargestellt werden. Die Zellstrukturen, z.B. Zellkern oder Zytoskelett, können dabei durch zusätzliche Anfärbungen dargestellt werden.

Es wurden Objektträger in 6 Wellplatten ausgelegt, die Zellen auf diesen ausgesät und bis zum Erreichen einer präkonfluenten Dichte kultiviert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und in 4 %-igem Formaldehyd für die Dauer von 20 Minuten fixiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C in PBS.

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese zwanzig Minuten in 1 % PFA/Triton-100 0,02 %/PBS behandelt und anschließend dreißig Minuten mit 1 % -igem BSA und 0,1 % Saponine geblockt. Der Primär-AK (1:50) inkubierte für 1 Stunde bei 22 °C. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. In der Kontrolle wurde kein Primär AK-angewandt. Es folgte dann eine Färbung mit den Immunfluoreszenzstoffen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 (DNA im Zellkern über AT Basenpaarbindung = blau) für 5 Minuten mit anschließender Waschung, gefolgt von einer Färbung mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 1:500 (grüne Fluoreszenz, HDAC4-spezifische Antikörperbindung) und Phalloidin 1:1000 (rote Fluoreszenz, bindet an F-Aktin) für weitere 60 Minuten und einer Waschung mit PBS. Anschließend wurden die Objektträger mittels Mountingmedium (Dako) luftblasenfrei versiegelt und dunkel bei 4 °C bis zur Detektion

gelagert. Betrachtet und fotografisch dokumentiert wurde mit einem Eclipse 400 (Nikon) Mikroskop bei Verwendung der Fluoreszenzfilter (Ex 400-500, DM 505, BA 510) und dem Programm NIS-Elements Advance Dokumentation.

## 2.15 Induktion der urothelialen Differenzierung in HBLAK-Zellen

Jeweils drei Replikate der HDAC4 und Leervektor HBLAK-Zelllinie wurden auf zwei 6-Well Platten ausgesät. Bei Erreichen eines präkonfluenten Zustands wurde das Nährmedium bei der Testgruppe durch ein Nährmedium mit einem Zusatz von CaCl<sub>2</sub> 2 mM und 5 % FCS ersetzt. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin CnT-Prime. Nach fotomikroskopischer Dokumentation der Ausgangsmorphologie wurde alle zwei Tage das Differenzierungsmedium erneuert sowie die morphologische Veränderung festgehalten. Nach 10 Tagen wurde abschließend RNA extrahiert und die Expression von CK20 und CK14 mittels qPCR quantifiziert.

## 2.16 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte fanden bei 4 °C statt. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer mit *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) lysiert und nach mechanischem Ablösen in ein passendes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Extrakte in einer 24 Gauge Nadel geschert und durch zehn-minütige Zentrifugation bei 12.000 rcf ungelöstes Material abgetrennt. Die obere flüssige Phase, in der sich der Proteinanteil befindet, wurde aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung fand bei -80 °C statt.

## 2.17 Proteinkonzentrationsbestimmung in Proteinlysaten

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde über das *BCA Protein Assay Kit* (Pierce<sup>TM</sup>) durchgeführt. BCA bindet dabei an die Peptidbindung der Proteine und durch die folgende Reduktion der Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>  $\rightarrow$  Cu<sup>1+</sup>) entsteht ein violetter Farbumschlag, der photometrisch quantifiziert werden kann (65). Dabei wurden die Proteinproben zunächst 1:5 verdünnt und in Triplikaten zu je 10 µl auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Als Standard wurde BSA in RIPA-Puffer in einer Verdünnungsreihe von 2.000 µg bis 32 µg in Zweifach-

Verdünnungsschritten mitgeführt, wie auch vier Leerproben (RIPA-Puffer), um die Hintergrundreaktion zu erfassen. Anschließend wurden jeweils 200 µl des BCA-Reagenz jedem befüllten Well hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. In einem *Microplate Reader Fourstar Optima* (BMG <sup>™</sup>) wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und nach Abzug des Hintergrundwertes anhand der Standardkurve die Konzentration berechnet.

## 2.18 Proteinnachweis über SDS-Page Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Auftrennung der Proteinproben nach ihrer Größe wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) genutzt. Nach Transfer auf eine Folie und Antikörperfärbung wurde das Ergebnis luminometrisch erfasst und dokumentiert.

Zunächst wurden SDS-Polyacrylamidgele hergestellt. Dazu wurde zwischen zwei abgedichteten Glasplatten mit Abstandshaltern (1,5 mm) jeweils ein unten liegendes Trenngel und ein darauf liegendes Sammelgel gegossen und in einem gekühlten Laufmodul mit entsprechendem Puffer eingespannt (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden w erden.**).

Je 15 µg Protein je Probe wurden mit 4 µl *6x Laemmli Puffer* versetzt, dann ad 20 µl mit RIPA Puffer aufgefüllt und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Das SDS lagert sich dabei an die denaturierten Proteine an und gibt ihnen eine negative Außenlandung, welche eine Auftrennung nach Molekülgröße ermöglicht. Nach Aufbringen der Proben sowie eines Markers mit farbmarkierten Proteinen bekannter Größe (Proteinleiter) auf 8 %-ige SDS-Polyacrylamidgele, wurden die Proteine nach SDS-Page bei einer initialen Spannung von 50 V für 15 Minuten und einer anschließenden Laufspannung von 130 V bis zum Erreichen des gewünschten Aufteilungsgrades (ca. 2-3 Stunden) aufgetrennt.

Der Transfer fand mittels *semi-dry* Transfer auf eine mit Methanol aktivierten PVDF Membran zwischen vier *Whatmanpapieren* (0,9 mm) in einem *Trans-Blot Turbo Transfer System* (BioRad) bei 2 A für 30 Minuten statt.

Beladungskontrollen wurden mittels Ponceau Färbung durchgeführt.

Zum spezifischen Proteinnachweis wurden die Membranen mit 5 %-iger Milch (hergestellt aus Milchpulver und TBS-T) geblockt und jeweils 3x für10 Minuten in TBS-T gewaschen.

Primärantikörper wurden jeweils über Nacht (14 -20 Stunden) bei 4 °C oder 1-2 Stunden bei ca. 20° Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Dabei wurden die Antikörper aus Tabelle 2-9 Verwendete Antikörper genutzt.

Sekundärantikörper wurden jeweils über Nacht (14-20 Stunden) bei 4 °C oder 1-2 Stunden bei ca. 20 °C Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal 10 Minuten mit *TBS-T* gewaschen. Dabei kamen Antikörper aus Tabelle 2-9 Verwendete Antikörper zum Einsatz.

Detektiert wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenz Reaktion über ECL mittels ECL Scanner oder ChemiDoc™ Imaging System.

## 2.19 Stripping von Membranen und Reprobing von Proteinen

Zum konsekutiven Nachweis von unterschiedlichen Proteinen auf derselben Membran kam das Strippingverfahren zum Einsatz. Dabei wurden durch den Strippingpuffer die gebundenen Antikörper entfernt, während die auf der Membran gebundenen Proteine weitgehend erhalten bleiben. Dazu wurde die Membran zweimal 10 Minuten in Strippingpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal je 10 Minuten in TBS-T gewaschen und in 5 %-iger Milch geblockt um anschließend erneut mit Antikörpern beladen zu werden.

## 2.20 RNA-Extraktion aus Zelllysat

Zur Bestimmung der Genexpression wurde mRNA extrahiert und diese mittels qPCR quantitativ bestimmt.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen in PBS gewaschen; anschließend wurden die Zellen mittels TRIzol<sup>TM</sup> 50  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> (500  $\mu$ l/Well) lysiert. Im Weiteren wurde die RNA mittels *RNeasy*<sup>®</sup> *Mini Kit* (Protokoll: fourth Edition June 2012; Qiagen) (66) aufgereinigt.

Dazu wurde 200 µl Chloroform /ml TRIzol<sup>™</sup> in einem Reaktionsgefäß zugesetzt, per Vortexer gemischt und bei 12.000 rcf und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert, in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und mittels Vortexens gemischt. Anschließend wurde die Lösung 1:1 mit 70 % Ethanol gemischt. 700 µl des Gemisches wurden in die *RNeasy spin column* übertragen und bei 8.000 rcf zentrifugiert. RW1 Puffer wurde hinzugefügt und erneut bei 8000 rcf 15 Sekunden zentrifugiert, um restliche Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule jeweils zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer beladen und für 30 Sekunden bei 8.000 rcf zentrifugiert, um Reste von Salzen und Ethanol zu entfernen. Abschließend wurde die *RNeasy spin column* in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser für 60 Sekunden bei 8.000 rcf zentrifugiert, um die RNA zu eluieren (67).

Die RNA Konzentration wurde über Spektralphotometrie im Nanodrop 2.000 (Thermo Scientific) bestimmt. RNA Konzentrationen ab 80 ng/µl wurden als verwertbar eingestuft. Gemessen wurden die Absorption bei 260 nm und 280 nm; die Konzentration wurde aufgrund der Absorption von 260 nm berechnet; das 260/280 nm-Verhältnis wurde verwendet, um den Reinheitsgrad der Probe zu bestimmen. Ein Quotient von nicht wesentlich geringer als 2 wurde als rein angenommen.

Das RNA-Lysat wurde bei -80 °C verwahrt.

## 2.21 Reverse Transkription zur Umwandlung von mRNA in cDNA

Zur Quantifizierung der mRNA wurde diese nach Herstellerangaben mittels *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) unter Einsatz des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Je 1 µg RNA wurde in *Wipeout Buffer* versetzt, um restliche genomische DNA zu entfernen. Mittels Reverser Transcriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), entsprechenden Primern und den Nucleotiden, wurde nun bei 42 °C über 30 Minuten die cDNA hergestellt und danach die Reaktion bei 95 °C gestoppt (68). Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.22 Genexpressionsbestimmung über Quantitative Echtzeit-PCR

Mittels qPCR lässt sich die Konzentration bestimmter DNA oder cDNA messen. Es wird ein Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR Green<sup>®</sup>) eingesetzt, der sich in die kleine Furche der DNA einlagert, und während der Amplifikation proportional intensiv zu den gebildeten doppelsträngigen PCR-Produkten leuchtet. So kann im Verhältnis zum Standard auf die Ausgangskonzentration geschlossen werden.

Die gewonnenen cDNA-Proben wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Sie wurden in Duplikaten auf 96-Well Analyseplatten ausplattiert. Jedem Well wurde dabei fwPrimer (100 pM), bkwPrimer (100 pM) (Biomers.net), der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green (10 μl) in Puffer und Desoxynukleotidtriphosphate zugesetzt, sowie die temperaturstabile HotStarTag DNA Polymerase (QIAGEN). Die Analyse fand in einem Lightcycler (Roche) statt, dabei wurde die Fluoreszenz von SYBR Green gemessen. Vor der Amplifikation wurde die cDNA für 15 Minuten (Preinkubation). denaturiert Bei einer den jeweiligen Primern angepassten Hybridisierungstemperatur (siehe Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) f anden die Amplifikationszyklen, bestehend aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation mit Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus statt. Es wurden 35 bis 40 Replikationszyklen durchlaufen.

Phase		Temperatur (°C)	Zeit (Sek)
Preincubation		95	900
Amplification	Denaturierung	95	20
	Primerhybridisierung	siehe Tab. Primer	20
	Elongation	72	30
Melting		95	60
Cooling		37	30

Als Standard kamen jeweils Triplikate in den Verdünnungsverhältnissen 1:20, 1:200, 1:2000 von UM-UC-3 (HDAC4, HDAC7, TBP) und HT1376 (CK20, CK14, TBP) cDNA zum Einsatz, anhand derer die Standardkurve erstellt und die Effizienz überprüft wurde. Zum Ausschluss etwaiger Verunreinigungen und von Primerdimeren wurde abschließend eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Anhand der gemessenen Ct-Werte und des Vergleichs zum Haushaltsgen (*TBP*) konnte so eine relative Konzentration geschätzt werden.

## 2.23 Statistik

Zur Untersuchung auf Signifikanz wurden die Messwerte mittels t-Test ausgewertet; p-Werte von < 0,05 wurden als signifikant und Werte von < 0,01 als hochsignifikant gewertet. Werte von > 0,05 wurden als nicht signifikant angenommen. Alle Vergleiche mit signifikanten Ergebnissen sind in den Grafiken mit einem Sternchen \* gekennzeichnet.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Nachweis der HDAC4 Expression im Western Blot

Zu Beginn wurden eine größere Serie kommerziell erhältlicher Urothelkarzinomzelllinien sowie immortalisierter Urothelzelllinien untersucht. Die Urothelkarzinomzelllinien stammten sowohl von männlichen als auch weiblichen Patienten und umfassten solche mit mesenchymalem und epithelialem Phänotyp sowie verschiedene molekulare Subtypen. Um einen Überblick über den endogenen HDAC4-Gehalt zu bekommen, wurden Western Blots angefertigt. In allen zur Verfügung stehenden Zelllinien konnte HDAC4 nachgewiesen werden, doch unterschieden sie sich quantitativ in ihrer Expression. Dabei wiesen vor allem die Zelllinien T24 und 253J einen geringeren HDAC4-Gehalt und BFTC-905 und SW1710 einen besonders hohen HDAC4-Gehalt auf (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** u



Abbildung 3.1 **Western Blot Analyse der HDAC4 Expression in Urothel(karzinom)zelllinien**. Proteinlysate (je 15 μg) aus den Urothel(karzinom)zelllinien wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen HDAC4 und α-Tubulin als Beladungskontrolle detektiert. Zu sehen sind Banden bei 140 kDa, der erwarteten Größe von HDAC4. Wegen der Unterschiede in der Ladungskontrolle hat die Bestimmung über die Bandenintensität einen semiquantitativen Charakter. HBLAK dienten als benigne Kontrolle und RT-112 HDAC Zellen als Positivkontrolle mit starker HDAC4 Expression. Y-Achse: molekulare Größe der Proteine in kDa anhand von farbcodiertem Leitermaßstab; zusätzlich gekennzeichnet sind Proteingrößen von HDAC4 und α-Tubulin.

#### nd Abbildung 3-4).

Um die Konsequenzen einer Überexpression von HDAC4 zu untersuchen, wurden die Zelllinien RT-112, SW1710 und UM-UC-3 ausgewählt und mittels lentiviraler Transduktion entweder ein Leervektor mit Resistenz gegen Puromycin in das Genom eingefügt oder ein

entsprechender Vektor mit eingefügter HDAC4 cDNA, um eine verstärkte Expression von HDAC4 zu erzielen. Parallel wurden Kontrollzelllinien mit demselben Vektor ohne die für HDAC4 kodierende cDNA-Sequenz hergestellt. Durch regelmäßige Selektion mit in dieser Konzentration auf humane Zellen toxisch wirkenden Puromycin wurde sichergestellt, dass die Zelllinien ihre HDAC4-Überexpression bzw. den Leervektor beibehielten.

Der Nachweis der erfolgreichen Überexpression wurde mittels Western Blot erbracht (Abbildung 3-2). Dabei ist ein deutlicher Anstieg des HDAC4-Gehaltes in den mit HDAC4-Vektor transduzierten Zellen zu erkennen. Bei den mit Leervektor transduzierten Zelllinien blieb der Gehalt an HDAC4 hingegen näherungsweise unverändert. Bei den überexprimierenden Zelllinien wurden zusätzliche Banden sichtbar. Hierbei könnte es sich prinzipiell um Nebenbanden, Isoenzyme von HDAC4, Spaltprodukte von HDAC4 oder unspezifische Bindungen des Antikörpers handeln.



Abbildung 3-2 Western Blot Analyse der HDAC4 Expression in Urothelkarzinomzelllinien, z. T. nach lentiviraler Transduktion. Darstellung nach SDS-Page Auftrennung der Proteinlysate mit Antikörperfärbung von HDAC4. Auswahl von Proteinlysaten (je 15 μg) in Urothelkarzinomzelllinien sowie HDAC4 überexprimierenden und Leervektorzellen, mit α-Tubulin als Beladungskontrolle. Zu sehen sind die erwarteten Banden bei 140 kDa sowie Nebenbanden. Wegen der Unterschiede in der Ladungskontrolle hat die Bestimmung über die Bandenintensität einen semiquantitativen Charakter. Y-Achse: molekulare Größe in kDa der Proteine anhand von farbcodiertem Leitermaßstab; zusätzlich sind die Proteingrößen von HDAC4 und α-Tubulin gekennzeichnet.

Da jedoch bei den Wildtypen keine Nebenbanden auftreten, ist eine unspezifische Bindung unwahrscheinlich. Am ehesten bindet der Antikörper an HDAC4-Spaltprodukten, da alle zusätzlichen Banden ein niedrigeres Molekulargewicht aufweisen. Diese können durch Proteolyse der Proteine bei der Gewinnung von Lysaten entstanden sein, oder wahrscheinlicher, durch eine fehlerhafte oder zum Teil abgebrochene Produktion des Enzyms aufgrund seiner massiv gesteigerten Produktion des Proteins oder folgender Proteolyse innerhalb der Zelle.

## 3.2 Nachweis der HDAC4 Überexpression mittels qPCR

Zur weiteren Quantifizierung von HDAC4 wurde RNA aus den Zellen extrahiert und mittels RTqPCR analysiert. Die HDAC4-Expression wurde auf das Housekeeping-Gen *TBP* normiert. Immortalisierte Primärzellen wiesen dabei im Mittel einen durchschnittlichen HDAC4-Gehalt von 0,12 relativ zu TBP (HBLAK 0,14; UP-242 = 0,12; TERT-NHUK = 0,1) mit einer moderaten Varianz (SD = 0,015) auf. Ähnliche Mittelwerte ergaben sich für den HDAC4-Gehalt in Urothelkarzinomzelllinien, diese schwankten dabei allerdings stärker in ihrer Ausprägung (SD = 0,8). Gegliedert nach den Subtypen zeigt sich dabei folgendes Bild: Basal ( $\overline{X}$  = 0,18; SD = 0,04 p = 0,71), Non-Type ( $\overline{X}$  = 0,18; SD = 0,1; p = 0,37), Luminal ( $\overline{X}$  = 0,21; SD = 0,03; p = 0,04), also insgesamt kein deutlicher Unterschied (Abbildung 3-3).





SW1710 imponierte mit einer starken HDAC4 Expression und T24 wies eine relativ schwache Expression von HDAC4 auf. Die mRNA Konzentration korreliert dabei nicht immer zu den

Ergebnissen aus den Western Blots: so wiesen UM-UC-3 und BFTC-905 im Western Blot eine starke Expression auf, sind auf mRNA Ebene jedoch nur durchschnittlich stark exprimiert, umgekehrt verhält es sich bei 253J.

In den HDAC4-transduzierten Zelllinien konnte eine deutliche Überexpression gegenüber den Kontrollen bestätigt werden. Dabei wurde bei RT-112 eine 72,6-fache, bei UM-UC-3 eine 37,6-fache und bei SW1710 eine 19,3-fache Steigerung im Vergleich zu Zellen mit Leervektoren festgestellt (Abbildung 3-4).



Abbildung 3-4 **Relative HDAC4 Expression von lentiviral transduzierten Urothelkarzinomzelllinien.** HDAC4 Konzentrationsbestimmung mittels qPCR normiert auf TBP in gepaarten (blaue Klammern) Urothelkarzinomzelllinien. Die mRNA Konzentration wurde für jede Zelllinie in Dreifachmessung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. TBP als Housekeeper wurde als 1 definiert und HDAC4 dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind drei Zelllinien, bei denen jeweils die mit Leervektoren zu mit HDAC4-transfizierten Zelllinien verglichen werden. Mit \* gekennzeichnete Paare wiesen einen signifikanten Unterschied auf.

## 3.3 Auswirkungen der HDAC4 Überexpression auf verschiedene Zelllinien

In den Zelllinien mit nachgewiesener Überexpression von HDAC4 wurden verschiedene Tests zur Überprüfung von zellulären Eigenschaften durchgeführt, die bei Tumoren wichtig sind. Darunter waren Tests zur Beurteilung von Kurzzeit- und Langzeitproliferation, der Migration sowie der Zellzyklusverteilung.

#### 3.3.1 Proliferationsmessung mittels MTT-Test

Im MTT-Test zur Analyse der Kurzzeitproliferation wiesen alle Zelllinien eine exponentielle Steigerung der gemessenen Absorption, also eine Vermehrung der metabolisch aktiven Zellen auf. Im gemessenen Zeitraum von 96 Stunden stieg die Absorption in HBLAK um etwa den Faktor 3,7, in RT-112 um etwa 7,5, in UM-UC-3 um etwa 10,2 und in SW1710 um etwa 10,5 (Abbildung 3-5). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen HDAC4 überexprimierenden Zellen und den zugehörigen Vektor-Kontrollen festgestellt werden.



Abbildung 3-5 **MTT-Test mit transduzierten Urothelkarzinomzelllinien.** Es wurden vier Zelllinien (Teilabbildungen A - D) auf Ihre Viabilität getestet. Dabei sind in der Abbildung, nach Zelllinien getrennt, die zusammengefassten Ergebnisse aus mehreren Experimenten zu sehen. Die Viabilität wurde für jeden Messtag in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Absorption zu sehen, welche in Abhängigkeit zur metabolischen Aktivität als indirekter Indikator der Viabilität der Zellen steht. Die Viabilität wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie: **A HBLAK** p = 0,26 - 0,73; n = 6 **B RT-112** p = 0,37 - 0,81; n = 5 **C UM-UC-3** p = 0,52 - 0,71; n = 6 **D SW1710** p = 0,59 - 0,84; n = 5

#### 3.3.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels CellTiter Glo®

Im Kurzzeitproliferationsexperiment über CellTiter-Glo<sup>®</sup> wiesen alle Zelllinien ein exponentielles Wachstum auf. Über den Verlauf von vier Tagen wurde hier in den verschiedenen Zellen eine 5- (HBLAK) bis 12-fache (UM-UC-3) Steigerung der ATP Konzentration gemessen.



Abbildung 3-6 **CellTiter-Glo®-Test mit transduzierten Urothelkarzinomzelllinien.** Es wurden vier Zelllinien auf Ihre Viabilität getestet. Dabei sind in der Abbildung, nach Zelllinien getrennt, die zusammengefassten Ergebnisse wiederholter Experimente zu sehen. In der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz zu sehen, welche in Abhängigkeit zur metabolischen Aktivität als indirekter Indikator der Viabilität der Zellen steht. Die Viabilität wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. Signifikante Ergebnisse sind mit \* gekennzeichnet. **A** HBLAK p = 0,13 - 0,34; n = 5 **B RT-112** p = 0,57 - 0,99, n = 5 **C UM-UC-3** p = 0,04\*-0,71; n = 4 **C SW1710** p = 0,24 - 0,42. n = 5

Mit lediglich einer Ausnahme (Tag 3 UM-UC-3) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den HDAC4- und den Leervektorzelllinien. Die Ergebnisse im CellTiter Glo spiegeln die Ergebnisse des MTT-Tests wider und bestätigen diese. Hier dargestellt werden die zusammengefassten Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten (Abbildung 3-6).

## 3.3.3 Fluoreszenzbasiertes Hochdurchsatz-Screening LIVE/DEAD Cell Viability

#### Assay (Proliferation)

Im LIVE/DEAD-Assay kann neben dem Anstieg der Anzahl lebendiger Zellen zusätzlich die Menge an toten Zellen detektiert werden. Gemessen wurde über einen Verlauf von vier Tagen. Es konnte bei den unbehandelten Zellen ein exponentielles Wachstum nachgewiesen werden. Dabei entsprechen die Ergebnisse weitestgehend denen aus den Messungen mittels MTT und CellTiter-Glo bei RT-112 und UM-UC-3. SW1710 wies in diesem Test eine stärkere Steigerung der Zellzahl auf, deutlicher als in den Tests über Zellmetabolismus-Messungen. Ein Unterschied zwischen HDAC4 und Leervektorzellen war wiederum in keiner Zelllinie festzustellen (Abbildung 3-7).



40



Abbildung 3-7 Anzahl der lebenden Zellen nach LIVE/DEAD Cell Viability Assay mit transduzierten Zelllinien. Es wurden drei Zelllinien (Teilabbildungen A - C) über ein bildanalytisches Zählverfahren auf Ihre Anzahl an lebenden Zellen detektiert. Dabei sind in der Abbildung, nach Zelllinien getrennt, die zusammengefassten Ergebnisse aus mehreren Experimenten zu sehen. Ihre Anzahl wurde für jeden Messtag in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Anzahl zu sehen, welche in Abhängigkeit zur Viabilität der Zellen steht. Die absolute Zahl lebender Zellen wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien, sowie zusätzlichen mit JQ1 + Romidepsin behandelte Kontrollen (graue Linien) per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. A RT-112 p = 0,49 - 0,99; n = 3 B UM-UC-3 p = 0,69 - 0,91; n = 3 C SW1710 p = 0,14 - 0,77; n = 3.

In diesem Experiment wurden zusätzlich mit JQ1 und Romidepsin behandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Diese wiesen erwartungsgemäß ab dem zweiten Tag nach Behandlung einen deutlichen Abfall in der Zellzahl auf.

Die unbehandelten Zelllinien wiesen einen relativ geringen Anteil toter Zellen auf. Dieser betrug zwischen 2- 6 % über den gesamten zeitlichen Verlauf, dabei war keine auf- oder abfallende Tendenz festzustellen (Abbildung 3-8). Auch die behandelten Zellen behielten einen relativ variablen Anteil an apoptotischen Zellen, der an Tag 3 zunahm und sich nicht deutlich von den Unbehandelten unterschied. Dies ist unerwartet, da mit dieser Behandlung deutlich Apoptose induziert wurde. Aus technischen Gründen (vermutlich Waschen der Zellen) scheint die Zahl der apoptotischen Zellen unterschätzt zu werden.



Abbildung 3-8 Anzahl der apoptotischen Zellen nach LIVE/DEAD Cell Viability Assay mit transduzierten Zelllinien. Es wurden drei Zelllinien (Teilabbildungen A - C) über ein bildanalytisches Zählverfahren auf ihre Anzahl an toten Zellen detektiert. Dabei sind in der Abbildung, nach Zelllinien getrennt, die zusammengefassten Ergebnisse aus mehreren Experimenten zu sehen. Ihre Anzahl wurde für jeden Messtag in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Anzahl zu sehen, welches in Abhängigkeit zur Apoptose der Zellen steht. Die absolute Zahl toter Zellen wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien, sowie mit JQ1 + Romidepsin behandelte negativ Kontrollen (graue Linien) per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie A RT-112 n = 3 B UM-UC-3 n = 3 C SW1710; n = 3.

## 3.3.4 Proliferation im Vergleich

Über alle Zelllinien hinweg konnte in den Tests der Kurzzeitproliferation ein vergleichbares exponentielles Wachstum zwischen Zellen mit oder ohne HDAC4-Expression festgestellt werden. Der Anstieg war in RT-112 dabei am geringsten und erreichte nach vier Tagen durchschnittlich das 7,8- 9,4-fache. UM-UC-3 und SW1710 hingegen waren deutlich aktiver mit Steigerungsfaktoren von 10,8- 12,7 (SW1710) und 11,4- 12,2 (Abbildung 3-9).



Abbildung 3-9 **Zusammenfassender Vergleich der Daten zur Kurzzeitproliferation.** Es wurden drei Zelllinien (Teilabbildungen A - C) mit ihren jeweiligen HDAC4 und Leervektorpaaren dargestellt. Gezeigt wird der relative Anstieg über vier Tage, wobei die Viabilität an Tag 1 als 1 definiert wird. Demonstriert wird, wie sich die Assays der Kurzzeitproliferation MTT-, CellTiter Glo und LIVE DEAD Cell Viability-Test unterscheiden. **A** RT-112, **B** UM-UC3, **C** SW1710.

Über die Tests hinweg war die inter-experimentelle Variation bei RT-112 am geringsten mit 40 % und bei SW1710 mit 182 % am stärksten. Es zeigt sich, dass Im Live / Dead Assay die Anzahl detektierter Zellen etwas stärker steigt als die Messung über MTT und CellTiter Glo hätte vermuten lassen.

## 3.3.5 Klonogenität (Langzeitproliferation)

Um die Fähigkeit zum Wachstum von einzelnen Zellen, die sich nicht mehr in ihrem Zellverbund befinden, nachzuweisen, wurde der Klonogenitäts-Assay durchgeführt.

Bei einer Aussaat von jeweils 1.500 Zellen pro 6-Well-Platte betrug der Zeitpunkt, an dem die Klone optimal zu erkennen waren und an dem die Fixierung mit anschließender Färbung vorgenommen wurde, 9 Tage für HBLAK, 10 Tage für RT-112 und je 7 Tage für SW-1710 und UM-UC-3.

HBLAK als immortalisierte Primärzelllinie wächst nur unter optimalen Bedingungen. Dies unterscheidet sie deutlich von den Karzinomzelllinien, die bereits viele physiologische Prozesse für eine kontrollierte Apoptose umgehen und sogar unter widrigen Bedingungen eine erhöhte Proliferation aufweisen. Mikroskopisch bildete HBLAK viele kleine Einzelkolonien die makroskopisch ein diffuses Muster ergeben. Unter den Karzinom-Zelllinien wies RT-112 einen epithelialen Phänotyp und SW1710 sowie UM-UC-3 einen mesenchymalen Phänotyp auf. Mikroskopisch wies keine Zelllinie einen morphologischen Unterschied zwischen mit HDAC4 oder Leervektoren transduzierten Zelllinien auf. RT-112 hatte eine relativ runde Zellform und wuchs in engen Verbänden in gut abgrenzbaren Kolonien, die sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch gut sichtbar waren. Unter den Karzinomzelllinien wies sie das langsamste Wachstum auf.

Nach Auswertung der Färbeintensität stellte sich in den meisten Zellen kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen mit HDAC4 oder Leervektoren transduzierten Zelllinien ein. Nur bei der Zelllinie SW1710 waren die Leervektorzellen den HDAC4-Zellen signifikant unterlegen.



Abbildung 3-10 Klonogenitäts-Assays mit transduzierten Zelllinien. Untersuchung der Langzeitproliferation durch bildanalytische Farbintensitätsmessung nach Giemsa Azur Eosin-Färbung. Die gemessene Intensität von HDAC4 Kolonien wurde als 1 definiert und die Leervektoren dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist jeweils der relative Vergleich zwischen den gepaarten Zelllinien mit HDAC4 Überexpression vs. Leervektor (eckige Klammer). Signifikante Unterschiede gekennzeichnet durch \*. A HBLAK p = 0,8; n = 9 B RT-112 p = 0,42; n = 15 C SW1710 p = 0,001\*; n = 13 D UM-UC-3 p = 0,51; n =19.

## 3.3.6 Koloniebildungsfähigkeit im Soft Agar Test

Der Soft Agar-Test wurde angewandt, um die Fähigkeit der Zellen nachzuweisen, in verankerungsunabhängigen Medien Kolonien zu bilden. Dieser Test hängt bei Karzinomzellen noch enger mit der Malignität zusammen als der Koloniebildungsassay (63). Dabei stellte sich heraus, dass die Zelllinien HBLAK, RT-112 und SW1710 innerhalb von 14 Tagen nicht in der Lage waren, Kolonien zu bilden. UM-UC-3 hingegen bildete deutliche und große Kolonien (Abbildung 3-11).



Abbildung 3-11 **Wachstum von UM-UC3 im Soft Agar.** 6-Well-Platte mit UM-UC-3 Besiedelung in einer 3D Matrix aus Nobel-Agar. Obere Reihe mit HDAC4- untere Reihe mit Leervektor Zelllinien. Die Leervektorzelllinien wiesen mehr wachstumsfähige Kolonien auf als die mit HDAC4 transduzierten. Gefärbt mit 0,01 prozentiger Kristallviolett Lösung.

Sowohl die UM-UC-3 Zelllinien mit HDAC4 als auch die mit Leervektor waren in der Lage, Kolonien zu bilden. Dabei waren die HDAC4 Zelllinie den Leervektorzelllinien jedoch unterlegen. In einer Auszählung der Versuche, bei denen jeweils 9 Sichtfelder bei zwanzigfacher Vergrößerung durchgemustert worden sind, zeigte sich, dass die Leervektor-Zelllinie im Durchschnitt etwa doppelt (2,16x) so viele Kolonien wie die HDAC4-Zelllinie bildete (Abbildung 3-12).



Abbildung 3-12 Kolonisierungsfähigkeit von transduzierten Zellen in Soft Agar. Vergleich der Kolonisierungsfähigkeit von HDAC4 und Leervektor transduzierten UM-UC-3 Zelllinien in verankerungsunabhängigen Nährmedien. Die Kolonienzahl von jeder Zelllinie wurde bei zwei unabhängigen Versuchen jeweils in Triplikaten gezählt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. Die Kolonienzahl von HDAC4-transduzierten Zellen wurde als 1 definiert und die Leervektoren dazu ins Verhältnis gesetzt. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet durch \*.

## 3.3.7 Migration

Um den Einfluss von HDAC4 auf die Beweglichkeit der Zellen zu messen, wurde ein Migrations-Assay mit den Zelllinien RT-112, SW1710 und UM-UC-3 durchgeführt. Zu erkennen war eine gleichförmige Bewegung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, je nach Zelllinie. Dabei benötigten die Zellen der RT-112 am längsten (> 48 Stunden), um einen Verschluss des Spalts zu vollziehen. Schneller waren SW1710 und UM-UC-3, die jeweils nach ca. 10 Stunden einen Zusammenschluss erreichten. Im Hinblick auf eine verändertes Migrationsverhalten bei HDAC4 Überexpression konnte lediglich in der Zelllinie SW1710 bei 4 und bei 8 Stunden ein signifikanter Unterschied mit geringfügig schnellerer Migration festgestellt werden. Bei RT-112 und UM-UC-3 konnte kein Einfluss von HDAC4 festgestellt werden. RT-112 bildete im Verlauf dauerhaft eine geschlossene Front mit einigen asymmetrischen Ausläufern Richtung Front. Die Zelllinien UM-UC-3 und SW1710 mit ihrem mesenchymalen Charakter wiesen dabei eine wesentlich ungleichmäßigere Front auf mit asymmetrischen Ausläufern im Verbund und besetzten so bereits frühzeitig den Spalt bis die Front der restlichen Zellen nachzog (Abbildung 3-13).



Abbildung 3-13 Einfluss von HDAC4 Überexpression auf das Migrationsverhalten von Urothelzelllinien. Gemessen wurde die Migration in drei Zelllinien (A-C), bei denen jeweils HDAC4 transduzierte und Leervektoren im Vergleich stehen. Dargestellt wird der Abstand zwischen zwei Zellfronten (Y-Achse) über den zeitlichen Verlauf (X-Achse). Der Abstand zum Zeitpunkt 0 Stunden wurde als 1 definiert, der Abstand beim Aufeinandertreffen der Zellfronten ist als 0 definiert. Vergleichende Grafik zwischen HDAC4 überexprimierenden Urothelzelllinien vs. Leervektorkontrollen. Gezeigt wird der relative Abstand zwischen zwei Zellfronten (und damit die Annäherungsgeschwindigkeit) im zeitlichen Verlauf über mehrere Stunden bis zum Zusammentreffen der Fronten. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien zu definierten Zeitpunkten (im Abstand von 2 Std.) per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet A RT-112 p = 0,83- 1; n = 9; B UM-UC-3 p = 0,08-0,6; n = 10 C SW1710 p = 0,01\* - 0,11; n = 8.

#### 3.3.8 Immuncytochemie

Immuncytochemisch wurde die Lokalisation von HDAC4 in den Zelllinien RT-112 (HDAC und Leervektor) und UM-UC-3 (Leervektor) analysiert.

Die Fluoreszenzmikroskopie ließ bei den untersuchten Zelllinien eine ubiquitäre Verteilung von HDAC4 erkennen; das Signal war sowohl im Zytoplasma als auch verstärkt im Nucleus präsent. Dabei kann eine verstärkte Konzentration von HDAC4 jeweils an einem Pol des Nucleus erkannt werden. In den HDAC4 überexprimierenden Zellen werden HDAC4 Aggregate in den Randbereichen der Zellen sichtbar; teilweise scheinen diese Aggregate außerhalb der Zelle lokalisiert. Zusätzlich können im Zellkern HDAC4-arme, rundliche Areale erkannt werden, welche vermutlich den Nucleoli entsprechen; diese sind bei den Leervektorzelllinien in dem Maß nicht ausgeprägt. In der Färbung von Zytoskelett und Nukleus sind keine Unterschiede zwischen RT-112 Leervektor und HDAC4 Zellen zu erkennen. In den Leervektorzelllinien werden im Cytoplasma jedoch kleine Foci mit HDAC4 sichtbar, die bei den HDAC4 überexprimierenden Zellen so nicht vorhanden sind (Abbildung 3-14).

#### A) RT112 HDAC4



#### B) RT-112 Leervektor



## C) UM-UC-3 Leervektor



Abbildung 3-14 **Immunzytochemie in Urothelkarzinomzellen für HDAC4**. Immersionsmikroskopie bei 40-facher Vergrößerung inkl. Maßstab von Urothelzellen (Teilabbildung A – C) mit Immunfluoreszenzfärbung. Darstellung von Zellkompartimenten und HDAC4 Verteilungsmustern innerhalb der Urothelzellen. Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4 überexprimierenden Zelllinien (A vs. B). Die Färbung zeigt in Blau den DNAreichen Zellkern, in Rot das Aktinzytoskelett des Zellkörpers und in Grün die Verteilung von HDAC4 innerhalb der Zelle. Rechts wird ein zusammengerechnetes Bild aller drei Farbkomponenten gezeigt (merge). v. o. n. u. A) RT112 HDAC4, **B)** RT-112 Vektor, **C)** UM-UC-3; Färbung v. I. n. r. DAPI, Alexa Fluor® 488, TRITC-Phalloidin, computerberechnete Zusammensetzung aller drei Komponenten.

## 3.3.9 Zellzyklusanalyse

In der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie erschienen in allen Zelllinien nach HDAC4 Überexpression die Zellzyklen unverändert, mit leichten zelllinienbedingten Variabilitäten. Es konnte auch bei quantitativer Auswertung kein signifikanter Unterschied in der Zyklusphasenverteilung zwischen den HDAC4-überexprimierenden und den Leervektorzelllinien festgestellt werden. Abbildung 3-15 spiegelt gemittelt über mehrere Experimente die Zelllinien-spezifische prozentuale Verteilung wider.



Abbildung 3-15 Zellzyklus-Analyse HDAC4 überexprimierender Urothelkarzinomzelllinien: Die Zyklusphasenverteilung wurde für vier Zelllinien (A - D) per FACS in Mehrfachmessung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In jeder Zelllinie stehen sich jeweils die HDAC4 transduzierten und die Leervektoren im Vergleich gegenüber. In dem geschichteten Säulendiagramm wird farblich kodiert der prozentuale Anteil der jeweiligen Zyklusphase dargestellt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusverteilung zwischen den Zellpaaren gemessen werden. In jedem Einzelexperiment wurden je 40.000 Zellen analysiert. n: Wiederholungen je Zelllinie A HBLAK n = 10 B RT-112 n = 5 C UM-UC-3 n = 7 D SW-1710 n = 7.

## 3.4 Differenzierung von HBLAK Zellen nach HDAC4 Überexpression

Unter Behandlung von 5 % FCS und CaCl<sub>2</sub> ändert sich die Morphologie von HBLAK Zellen deutlich, behandelte und unbehandelte Zellen sind bereits nach einem Tag deutlich zu unterscheiden. Durch die Behandlung werden die Zellen stärker epitheloid und flacher. Es hat den Anschein, als ob sie Zugkräften ausgesetzt sind. So sind Aussparungen (wie in Abbildung 3-16) zu sehen, sowie trabekelförmige Zugstrukturen (Abbildung 3-17). Der morphologische Wandel wird im weiteren Verlauf bis Tag 10 noch deutlicher. Ab dann werden die Effekte durch die Konfluenz mitbestimmt. Demgegenüber war eine optische Unterscheidung zwischen den HDAC4- und Leervektor-Zelllinien nicht möglich (Abbildung 3-16 & 3-17).



Abbildung 3-16 **Induktion urothelialer Differenzierung in HBLAK Zellen.** Lichtmikroskopische Aufnahme mit 40x Vergrößerung von HBLAK Zellen HDAC4 vs. Leervektor an **Tag 2** nach Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> und FCS im Vergleich. In den behandelten Zelllinien wurden inselartige Freiräume sichtbar so wie eine Veränderung in der Morphologie; bei den Kontrollen war weiterhin ein normales epitheloides Wachstumsmuster zu erkennen (v. l. n. r. HDAC4 + FCS/ CaCl<sub>2</sub>; HDAC4 Kontrolle; Leervektor + FCS CaCl<sub>2</sub>; Leervektorkontrolle).



Abbildung 3-17 Induktion urothelialer Differenzierung in HBLAK Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahme mit 40x Vergrößerung von HBLAK Zellen HDAC4 vs. Leervektor an Tag 5 nach Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> und FCS. In den behandelten Zelllinien waren Strukturen zu erkennen die auf Zugkräfte im Verband hindeuten. Im Vergleich war bei den Kontrollen weiterhin ein normales epitheloides Wachstumsmuster zu erkennen (v. l. n. r. HDAC4 + FCS CaCl<sub>2</sub>; HDAC4 Kontrolle Leervektor + FCS CaCl<sub>2</sub>; Leervektorkontrolle).

In der qPCR konnten hingegen signifikante Unterschiede in der Expression der Zytokeratine KRT20 und KRT14 bei HBLAK Zellen mit HDAC4 im Vergleich zu der Leervektor Kontrollzelllinie gemessen werden. CK14 ist in Vorläuferzellen stark exprimiert und nimmt während der urothelialen Differenzierung ab. Die Expression von CK20 ist in den Ausgangszellen kaum nachweisbar, nimmt aber während der Differenzierung zu (**Fehler! V erweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Abbildung 3-18).

53



Abbildung 3-18 Expression von KRT20 und KRT14 in HBLAK Urothelzellen im Verlauf bei induzierter Differenzierung. KRT20 und KRT14 Konzentrationsbestimmung in HBLAK Zelllinien mittels qPCR, normiert auf TBP. Die mRNA Konzentration wurde in Triplikaten in zweifacher Wiederholung mittels qPCR bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. TBP wurde als 1 definiert und KRT20 bzw. KRT14 wurden dazu in Relation gesetzt. HDAC4 und Leervektorzelllinien wurden jeweils mittels Ca/FCS einer Differenzierung ausgesetzt, dem gegenüber stand eine Kontrolle ohne Ca/FCS. Verglichen wurden jeweils HDAC4 vs. Leervektor bei gleicher Behandlung (Ca/FCS = orange Klammer; Kontrolle = blaue Klammer). Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet. A KRT20 Ca/FCS p = 0,0001; Kontrolle p = 0,43 B KRT14 Ca/FCS p = 0,014; Kontrolle p = 0,01).

HDAC4-überexprimierende Zellen wiesen nach Differenzierung eine signifikante Steigerung des KRT20 Gehaltes um das 3,4-fache auf. KRT14 wurde bei HDAC4 Überexpression um den Faktor 1,18 gesteigert, wobei ein bereits bestehender Unterschied bei den unbehandelten, nichtdifferenzierten Zellen zwischen HDAC4 und Leervektor diese Differenz relativiert (Abbildung 3-19).



Abbildung 3-19 **Verlauf der Differenzierungsmarker KRT14 und KRT20 nach Differenzierung.** Dargestellt wird für KRT14 und KRT 20 die prozentuale Steigerung der Differenzierungsmarker KRT14 und KRT20 im Vergleich zum Ausgangszustand vor der Induktion mit Ca/FCS.

## 3.5 HDAC4 Herabregulation durch siRNA-Interferenz

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde analysiert, ob es durch Verminderung von endogen exprimierten HDAC4 zu einer Veränderung von neoplastischen Eigenschaften wie verstärkter Proliferation und Migration kommt. Dazu wurde die Technik der siRNA-Interferenz ("Knockdown") eingesetzt. Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Analysen der HDAC4 Expression (Kapitel 4.1) wurden die Zelllinien SW1710, BFTC-905, 235J und T24 ausgewählt. Bei der Auswahl wurde die Zelllinie SW1710 aufgrund ihrer hohen, die Zelllinie T24 aufgrund ihrer niedrigen und BFTC-905 und 253J aufgrund ihrer etwa durchschnittlichen Expression von HDAC4 ausgewählt.

## 3.5.1 Nachweis über siRNA Interferenz von HDAC4 Knockdowns

Initial wurde eine einzelne siRNA zur Unterdrückung der Biosynthese von HDAC4 in den Zelllinien BFTC-905 und 253J genutzt (Abbildung 3-20).



Abbildung 3-20 **Western Blot Analyse bei HDAC4 Interferenz.** Western Blot zum Nachweis der Wirksamkeit der <u>single</u> siRNA in den Zelllinien 253J und BFTC-905. Proteinlysate der UCCs (je 15  $\mu$ g) wurden mit AKs gegen HDAC4 und  $\alpha$ -Tubulin als Beladungskontrolle im Western Blot detektiert. Unterschiedlich starke Ausprägung der 140 kDa Bande zwischen HDAC4 Targeting und Non-Targeting behandelten Zelllinien belegen die erfolgreiche Interferenz von HDAC4. Y-Achse molekulare Größe der Proteine in kDa anhand von farbcodiertem Leitermaßstab mit zusätzlich gekennzeichneter Proteingröße von HDAC4 und  $\alpha$ -Tubulin.

In einem weiteren Durchgang wurde ein siRNA-Pool (bestehend aus drei einzelnen siRNAs) genutzt, um die HDAC4-Expression in den Zelllinien SW1710, BFTC-905, 253J und T24 zu unterdrücken. Zur Etablierung und zum Wirksamkeitsnachweis der Pool siRNA wurde wiederum ein Western Blot angefertigt (Abbildung 3-21)



Abbildung 3-21 **Western Blot Analyse bei HDAC4 Interferenz.** Initialer Western Blot zum Nachweis der Wirksamkeit der Pool siRNA in den Zelllinien SW1710, 253J, BFTC-905 und T24. Proteinlysate von UCCs (je 15 μg) wurden mit AKs gegen HDAC4 und α-Tubulin als Beladungskontrolle im Western Blot detektiert. Unterschiedlich starke Ausprägung der 140 kDa Bande zwischen HDAC4 Targeting und Non-Targeting behandelten Zelllinien, belegen eine erfolgreiche Interferenz von HDAC4. Y-Achse molekulare Größe der Proteine in kDa anhand von farbcodiertem Leitermaßstab mit zusätzlich gekennzeichneter Proteingröße von HDAC4 und α-Tubulin.

## 3.5.2 Proliferative Wirkung nach negativer Interferenz gegen HDAC4

Als wichtige neoplastische Eigenschaft wurde nach der siRNA Transfektion gegen HDAC4 die Proliferation der behandelten Zellen untersucht. Dies erfolgte für die Kurzzeitproliferation mittels MTT und CellTiter-Glo<sup>®</sup> und für die Langzeitproliferation über den Klonogenitäts-Assay.

#### 3.5.3 MTT-Test nach HDAC4 siRNA Interferenz

Im MTT-Test zeigte sich erwartungsgemäß ein exponentieller Wachstumsverlauf in allen Zelllinien. Nach der Transfektion der einzelnen siRNA deutete sich eine abgeschwächte Viabilität bei Knockdown von HDAC4 an. Der Unterschied überstieg jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abbildung 3-22).



Abbildung 3-22 **MTT-Test Interferenz mittels single siRNA**. Es wurden zwei Zelllinien (Teilabbildungen A - B) auf ihre Viabilität getestet. Dabei sind in der Abbildung die zusammengefassten Ergebnisse über die Experimente mit jeder Zelllinie zu sehen. Die Viabilität wurde für jeden Messtag in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Absorption dargestellt, welche in Abhängigkeit von der Viabilität der Zellen steht. Die Viabilität wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Targeting single siRNA Interferenz und Non-Targeting siRNA per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. **A BFTC-905** p = 0,15 -0,46; n = 3 **B 253J** p = 0,67 - 0,78; n = 3.

Der MTT-Assay nach Verwendung der Pool siRNA zum HDAC4 Knockdown spiegelte ähnlichen Wachstumsverläufe wie bei der Einzel-siRNA wider. SW1710 wies bei Behandlung mit Pool siRNA jedoch nun eine signifikant reduzierte Viabilität auf (siehe Abbildung 3-23).



Abbildung 3-23 **MTT-Test bei** <u>Pool</u> siRNA Interferenz Es wurden vier Zelllinien (Teilabbildungen A - D) auf ihre Viabilität getestet. Dabei sind in der Abbildungdie zusammengefassten Ergebnisse über die Experimente für jede Zelllinie dargestellt. Die Viabilität wurde für jeden Messtag in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Absorption zu sehen, welche die Viabilität der Zellen widerspiegelt. Die Viabilität wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Targeting <u>Pool</u> siRNA Interferenz und Non-Targeting siRNA per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. Signifikante Ergebnisse an den jeweiligen Tagen sind mit \* gekennzeichnet **A SW1710** p = 0,04\*- 0,45; n= 7 **B BFTC-905** p = 0,33 - 0,97; n = 4 C 253J p = 0,28 - 0,72; n = 4 **C T24** p = 0,15,- 0,27; n = 4.

## 3.5.4 CellTiter-Glo® Test bei HDAC4 siRNA Interferenz

Auch mit diesem Test konnte wiederum in allen Zelllinien ein exponentieller Anstieg der Viabilität über die Zeit demonstriert werden. Wie bei den Ergebnissen im MTT-Test stieg auch hier die Viabilität von Zellen schwächer an, die mit siRNA gegen HDAC4 statt mit Non-Targeting siRNA behandelt worden waren (Abbildung 3-24). Dies galt vor allem für SW1710, jedoch wurde auch in der Zelllinie T24 trotz ihres endogen niedrigen HDAC4 Niveaus eine signifikante Reduktion der Viabilität gemessen. Dies hatte sich, wenn auch nicht statistisch signifikant, bereits im MTT-Assay angedeutet. Zwar wies BFTC-905 keine signifikanten Veränderungen auf (p= 0,28 - 0,1), doch schienen auch hier Zellen nach HDAC4 Knockdown ihren Kontrollen unterlegen. Die Zelllinie 253J wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen mit siRNA gegen HDAC4 oder Non-Targeting siRNA auf.





Abbildung 3-24 **CellTiter-Glo® Test Interferenz.** Es wurden vier Zelllinien (Teilabbildung (A – D) auf ihre Viabilität getestet. Dabei sind in der Abbildung die zusammengefassten Ergebnisse über die wiederholten Experimente für jede Zelllinie dargestellt. Auf der Y-Achse ist die gemessene Lumineszenz aufgetragen, welche als indirekter Indikator der Viabilität der Zellen dient. Die Viabilität wurde für jede Zelllinie an Tag 1 als 1 definiert und täglich über vier Tage gemessen. Statistischer Vergleich zwischen Pool siRNA induzierter Interferenz und Non-Targeting siRNA per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. Signifikante Ergebnisse an den jeweiligen Tagen sind mit \* gekennzeichnet **A SW1710** n = 6 **B BFTC-905** n = 6 **C 253J** n = 6 **D T24** n = 5.

## 3.5.5 Klonogenität nach HDAC4 Knockdown

In den initialen Experimenten wurde gegen die Zelllinien 253J und BFTC-905 eine einzelne siRNA eingesetzt. Nach dieser Behandlung ist eine deutlich niedrigere Koloniebildungsfähigkeit von Zellen nach HDAC4 Knockdown gegenüber ihren Vektorkontrollen in der Zelllinie BFTC-905 zu erkennen, die beiden 253J Zelllinien wiesen hingegen keinen sichtbaren Unterschied auf (Abbildung 3-25).



Abbildung 3-25 Klonogenitäts Test bei HDAC4 Interferenz. Klonogenitäts Test in Urothelkarzinomzelllinien bei HDAC4 Interferenz nach Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaufärbung nach 10 Tagen Wachstum. Teilabbildungen (A & B) zeigen je eine Zelllinie ausgesät mit je 1500 Zellen/Well. Dabei wurden die Triplikate der oberen Reihe mit siRNA gegen HDAC4 behandelt, die untere Reihe wurde mit nicht non-Targeting siRNA behandelt und dient als Kontrolle. Links: In BFTC-905 zeigten sich gut abgrenzbare Kolonien mit kleineren und weniger Kolonien. Rechts: 253J bildete diffusere Kolonien, die weniger gut abgrenzbar sind; jedoch war kein Unterschied zwischen HDAC4 Interferenz und Kontrolle zu erkennen.

Diese optischen Eindrücke wurden durch die quantitative Auswertung mittels Bildanalyse als



signifikanter Unterschied in BFTC-905 bestätigt (Abbildung 3-26).

Abbildung 3-26 Intensitätsmessung von Klonogenitäts Test bei HDAC4 Interferenz (single). Nach Behandlung mit single siRNA gegen HDAC4 vs. Non-Targeting siRNA wurden zwei Zelllinien (Teilabbildungen A&B) auf ihre Farbintensität (Giemsa Färbung) innerhalb einer definierten Fläche gemessen. Dabei sind in der Abbildung, die zusammengefassten Ergebnisse über die Experimente für jede Zelllinie dargestellt. Die Klonogenität wurde für jede Zellreihe in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Farbintensität zu sehen, welche in Abhängigkeit zu den gebildeten Kolonien steht. Die Intensität wurde für jede Zelllinie bei dem gemessenen Wert für HDAC4 als 1 definiert und steht im Vergleich zu den Leervektoren (eckige Klammer) dabei werden signifikante Unterschiede durch \* gekennzeichnet. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. A BFTC-905 p = 0,0006, n = 13; B 253J p = 0,4; n = 6.
Im Weiteren wurde eine Pool siRNA gegen HDAC4 eingesetzt, um die Expression des Proteins noch effektiver zu hemmen. Zusätzlich wurden weitere Zelllinien untersucht, die besonders viel (SW1710) oder wenig (T24) HDAC4 exprimieren.



Abbildung 3-27 Intensitätsmessung von Klonogenitäts Test bei HDAC4 Interferenz (Pool). Nach Behandlung mit single siRNA gegen HDAC4 vs. Non-Targeting siRNA wurden vier Zelllinien (Teilabbildungen A - D) auf ihre Farbintensität (Giemsa Färbung) innerhalb einer definierten Fläche gemessen. Dabei sind in der Abbildung die zusammengefassten Ergebnisse über die Experimente mit jeder Zelllinie zu sehen. Die Klonogenität wurde für jede Zellreihe in n-facher Messung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In der Y-Achse ist die gemessene Farbintensität zu sehen, welche in Abhängigkeit zu den gebildeten Kolonien steht. Die Intensität wurde für jede Zelllinie bei dem gemessenen Wert für HDAC4 Targeting als 1 definiert und steht im Vergleich zu dem Non-Targeting (eckige Klammer) dabei werden signifikante Unterschiede durch \* gekennzeichnet. Statistischer Vergleich zwischen Leervektor und HDAC4-Zelllinien per T-Test bei n Wiederholungen je Zelllinie. A SW1710 p = 0,04; n = 9 B BFTC-905 p = 0,003; n = 11 C 253J p = 0,06; n = 13 D T24 p = 0,0008; n = 14. BFTC-905 wies, wie schon bei der Behandlung mit einer einzelnen siRNA bei reduzierter HDAC4-Expression ein Wachstumsdefizit auf. Ebenso ließ sich bei 253J kein Unterschied herausarbeiten, allerdings wurde das Signifikanzniveau nahezu erreicht (p = 0,06). Bei SW1710 und T24 war die Klonogenität nach HDAC4-Knockdown mittels siRNA-Pool deutlich vermindert (siehe Abbildung 3-27).

### 3.5.6 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse nach HDAC4 Interferenz

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse wurde initial bei Zellen durchgeführt, die mit einer einzelnen siRNA behandelt waren, anschließend auch mit Zellen, die mit einem siRNA Pool behandelt worden waren. In einigen Zelllinien kam es dabei zu signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellzyklusphasen durch die HDAC4 Interferenz. Mit beiden siRNA-Behandlungen war der Anteil an Zellen in der G1-Phase in der Zelllinie SW1710 vermindert, bei BFTC-905 hingegen gesteigert. Die Veränderung in der G1 Phase war jedoch nicht stark ausgeprägt.



Abbildung 3-28 **FACS Analyse bei single siRNA HDAC4 Interferenz**: Die Zellzyklusanalyse wurde für zwei Zelllinien (Teilabbildung A - B) durchgeführt. Die Zyklusphasenverteilung wurde für jede Zelllinie in Mehrfachmessung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In jeder Zelllinie stehen sich jeweils die single siRNA Interferenz behandelten und die Non-Targeting siRNA behandelten Zelllinien im Vergleich gegenüber. In dem geschichteten Säulendiagramm wird farblich kodiert der prozentuale Anteil der jeweiligen Zyklusphase dargestellt. In jeder Wiederholung wurden je 40.000 Zellen analysiert. n Wiederholungen je Zelllinie. **A BFTC-905** zeigte ein eine deutliche Reduktion der in der S- Phase befindlichen Zellen, **B 253J** zeigte keine Veränderung des Zellzyklus. So erhöhte sich der Anteil in der G1 Phase bei BFTC-905 um 4,3 % bis 16,2 % (Single und Pool siRNA) und bei SW1710 reduzierte er sich relativ um 8,1 %. In den weiteren Zellzyklusphasen kam es zu keiner Änderung. Die Zelllinien T24 und 253J wiesen bei Behandlung mit siRNA keine Änderungen in der Zellzyklusverteilung auf.



Abbildung 3-29 FACS Analyse bei Pool siRNA Interferenz: Die Zellzyklusanalyse wurde für vier Zellinien (Teilabbildung A - D) durchgeführt. Die Zyklusphasenverteilung wurde für jede Zelllinie in Mehrfachmessung bestimmt und daraus der arithmetische Mittelwert sowie die SD berechnet. In jeder Zelllinie stehen sich jeweils die Pool siRNA
Interferenzbehandelten und die Non-Targeting siRNA behandelten Zelllinien im Vergleich gegenüber. In dem geschichteten Säulendiagramm wird farblich kodiert der prozentuale Anteil der jeweiligen Zyklusphase dargestellt. Signifikante Zyklusphasenveränderungen werden mit \* gekennzeichnet. In jeder Wiederholung wurden je 40.000 Zellen analysiert.
n Wiederholungen je Zelllinie. A SW1710 p für G1 = 0,003, n = 5 B 253J n = 5 C BFTC-905 p: G1 = 0,03\*; n = 4 D T24 n = 4.

## 4 Diskussion

Die wichtige Bedeutung der epigenetischen Regulation über den Acetylierungsgrad von Histonen ist in allen Geweben und auch speziell im Urothel nachgewiesen. Nach laborinternen Vorarbeiten zu mehreren HDAC Isoenzymen (27) sollte es Aufgabe dieser Dissertation sein, den Einfluss verschiedener Expressionsniveaus von HDAC4 auf neoplastische Eigenschaften von urothelialen Zellen zu untersuchen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die proliferativen und migratorischen Eigenschaften von Tumorzellen sowie auf den Einfluss von HDAC4 auf die Differenzierung im Urothel gelegt. Die Auswahl der verwendeten Zelllinien spiegelte die Variabilität von HDAC4 in Urothelkarzinomen wider. Dabei wiesen Primärzellen eine geringere Varianz um ein ,durchschnittliches' HDAC4-Niveau als UCCs bei gleicher mittlerer Expression auf. Um dieses Spektrum zu erweitern und stärkere Auswirkungen auf neoplastische Eigenschaften herauszukristallisieren, wurden lentiviral transduzierte Zelllinien mit Überexpression wie auch Zelllinien mit einem Knockdown von HDAC4 mittels siRNA-Interferenz untersucht.

Die Modulation des Expressionsniveaus von HDAC4 nahm insgesamt einen eher geringen Einfluss auf die neoplastischen Eigenschaften von UCCs in den funktionellen in-vitro-Experimenten. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden die lentiviral transduzierten HDAC4 überexprimierenden Zellen untersucht; hierbei wurden nur marginale Veränderungen ihrer proliferativen Eigenschaften festgestellt. Auch bezüglich ihrer migratorischen Eigenschaften konnte, trotz einer Tendenz zur Korrelation von hohen HDAC4-Werten mit einem eher mesenchymalen Phänotyp, nicht nachgewiesen werden, dass HDAC4 zu einer gesteigerten Migration führt. In Differenzierungsexperimenten deutete sich an, dass HDAC4 auf Biomarker wirkt, die mit einer basalen Differenzierung zusammenhängen.

In den Interferenzexperimenten stellte sich heraus, dass HDAC4 dennoch in einzelnen Zelllinien eine substantielle Rolle für die Proliferation spielt, wobei bei HDAC4-Knockdown die Proliferation abgeschwächt war, jedoch keine Apoptose induziert wurde. In der Zellzyklusanalyse kam es zelllinienabhängig zu signifikanten Veränderungen in der G1- und S-Phase, diese waren jedoch nur von geringem Ausmaß.

#### 4.1 HDAC4-Expression in urothelialen Zellen

Mit verschiedenen Verfahren konnten wir die unterschiedlichen HDAC4-Niveaus nachweisen. In der Western-Blot-Analyse der Urothel(karzinom)zelllinien waren distinkte Bandenmuster auf der zu erwartenden Höhe ohne Nebenbanden zu erkennen, dagegen wiesen die HDAC4transduzierten Zellen deutliche Nebenbanden mit niedrigerem Molekulargewicht auf. Da solche Nebenbanden nur in transduzierten Zellen beobachtet wurden, muss es sich hierbei um andere Formen von HDAC4 handeln, mit denen der Antikörper reagiert. So ist denkbar, dass hier unvollständig produzierte, alternativ gespleißte Varianten oder - am Wahrscheinlichsten - degradierte HDAC4-Proteinfragmente zu sehen sind. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Caspase-3-vermittelter Spaltung von HDAC4 gemacht, wobei 97 kDa große Fragmente generiert werden (53), was auch im Western Blot zu erkennen ist. Diese Fragmente werden dann im weiteren Prozess mehrfach gespalten und könnten die weiteren Banden widerspiegeln. Aktive Caspase-3 ist allerdings auf apoptotische Zellen beschränkt. Wahrscheinlicher ist demnach, dass die Banden durch eine andere Protease mit ähnlicher Spezifität zustande kommen.

Über die siRNA-Interferenz konnte HDAC4 grundsätzlich effektiv unterdrückt werden. In der Zelllinie SW1710, die besonders viel HDAC4 exprimiert, standen trotzdem weiterhin geringe Mengen an HDAC4 für die Zelle zur Verfügung. In den anderen Zelllinien war HDAC4 jedoch bis unter die Nachweisgrenze reduziert worden. Laborintern wurde nachgewiesen, dass eine dauerhafte pharmakologische Hemmung von HDAC1 und -2 von Urothelzellen nicht überlebt wird (40), dies mag auch bei permanenter HDAC4-Interferenz der Fall sein und ist unter Umständen bei lediglich temporärer Interferenz von den Urothelzellen kompensierbar.

Näherungsweise konnte eine quantitative Bestimmung von endogenem HDAC4 in immortalisierten Primärzelllinien und innerhalb einer Kohorte von Urothelkarzinomzelllinien im Western Blot vorgenommen werden. Die Expression variierte deutlich, lässt jedoch nicht die Schlussfolgerung zu, dass unter Urothelkarzinom-Zelllinien grundsätzlich mehr oder weniger HDAC4 auf Proteinebene exprimiert werden kann als in Primärzelllinien. In qPCR-Untersuchungen zu HDAC4 auf mRNA-Ebene hatten immortalisierte Primärzellen einen eher durchschnittlichen HDAC4-Gehalt mit geringer Varianz. Karzinomzellen wiesen zwar einen ähnlich hohen mittleren HDAC4-Gehalt auf, variierten jedoch weitaus stärker in der Expression. Dies lässt den Schluss zu, dass es in diesen Zellen zusätzliche regulatorische Mechanismen gibt, die zu Über- oder Unterexpression führen. Eine frühere Arbeit hatte Hinweise auf besonders starke Expression im basalen molekularen Subtyp berichtet (10). Diese konnten hier nicht bestätigt werden, die Expression in Zelllinien aus dem basalen Subtyp oder Non-Type waren nicht signifikant verändert im Vergleich zu normalen Urothelzellen. Auch wiesen die Zelllinien vom luminalen Typ wider Erwarten eher eine stärkere HDAC4-Expression auf.

Die Zelllinien BFTC-905, HT1376 und J82 zeigten trotz ihrer geringen HDAC4 mRNA-Expression relativ starke Proteinsignale, hingegen ergab 253J trotz hohen HDAC4 mRNA-Gehalts nur ein schwaches HDAC4-Signal im Western Blot. Dies zeigt, dass der HDAC4-Gehalt auf mRNA-Ebene nicht mit dem des Proteins korreliert. Zwar wiesen einige Zelllinien sowohl im Western Blot als auch in der qPCR gleichermaßen hohe (SW1710 und BFTC-905) beziehungsweise niedrige (T24 und VM-CUB-1) HDAC4-Niveaus auf. Doch einige Zellen waren geprägt durch hohe mRNA-Niveaus und niedrige Protein-Expressionen (253J, RT-112 und 647v), was für eine reduzierte Translation oder beschleunigten Abbau spricht. *Vice versa* setzten einige Zelllinien niedrige HDAC4 mRNA-Niveaus sichtlich effektiver in Protein um (J82 und HT-1376).

Typische Erklärungsmöglichkeiten bei nicht vorhandener Korrelation von mRNA und Protein sind: die Modulation über *upstream open reading frames* (uORF) am Transkript oder von *internal ribosome entry sites* (IRES) am Ribosom; nicht-codierende RNA wie miRNA und IncRNA, welche die Translation regulieren können oder zum Abbau von mRNA führen. Weiter ist noch das Verhältnis zwischen Transkript und (gebundenem) Ribosom für das ProteinmRNA-Verhältnis von Bedeutung. Auch ein variabler Proteinexport aus der Zelle kann einen vermeintlich niedrigen Proteinspiegel vortäuschen. Großen Einfluss nimmt die Halbwertszeit, eine kürzere Halbwertszeit vermag einen niedrigen Proteinwert zu erklären, dies ist auch für HDAC4 berichtet worden (12, 69).

In der immunzytochemischen Analyse konnten quantitative Beobachtungen mit der intrazellulären Topologie verknüpft werden. Besonders in überexprimierenden Zellen wurden zytoplasmatische Foci von HDAC4 erkennbar, welche die Frage offenlassen, ob neben der hauptsächlich nukleären Aufgabe hier auch eine zytoplasmatische Funktion von HDAC4 vorliegt oder ob lediglich ein Stoffwechselschritt von HDAC4 abläuft. HDAC4 hat auch abseits der Histone die Fähigkeit, zytoplasmatische Lysine zu deacetylieren; eine Analyse mittels GFP-Tags könnte verwendet werden, um die zytoplasmatische Lokalisation und Funktion von HDAC4 genauer zu untersuchen. Im Zytoplasma stattfinden könnten auch eine Komplexierung oder eine Verpackung von HDAC4. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass hier ein

Stoffwechselweg von HDAC4 sichtbar wird, da in den überexprimierenden Zellen Abbauprodukte von HDAC4 zu sehen sind. Aufgrund des starken HDAC4-Umsatzes entstehen Aggregate. Beim Abbau bleiben zunächst relativ große Spaltprodukte von etwa 98 kDa über, welche schlussendlich aggregieren könnten. So ähnelt das hier erkennbare Detektionsmuster dem von Paroni et al. (53) beschriebenen Caspase-3-abhängigen HDAC4-Abbau.

Neben den zytoplasmatischen Foci ist die stark polarisierte Konzentration von HDAC4 im Nucleus interessant. Es wird berichtet, dass nach der Caspase-3-abhängigen Spaltung das Nterminale Ende von HDAC4 für die Repression von MEF2C als Korepressor von entscheidender Bedeutung ist und somit neben dem vollständigen HDAC4 auch seine Spaltprodukte nukleär wirken (55). Dabei könnte HDAC4 in heterochromaischen Bereichen akkumulieren, in denen die Gene lokalisiert sind, auf die HDAC4 reprimierend wirkt bzw. wohin diese Gene über einen Komplex mit HDAC4 gezogen werden. Da Heterochromatin im Vergleich zu Euchromatin eher peripher konzentriert ist (70), würde es zu der These passen. Der zytoplasmatisch-nukleäre Transport von großen Proteinen wie HDAC4 funktioniert aktiv über Kernporen (NPC = *nuclear pore complex*), die durch spezifische Nucleoporine charakterisiert sind. Die NPCs bilden zusätzlich je nach Typ Ankerpunkte für spezifische Chromatin-Abschnitte. In Myozyten wurde nachgewiesen, dass HDAC4 in den Bereich der höchsten Nucleoporin-155 (NP115) -Konzentration transportiert wird. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass NP155 von HDAC4 beeinflusste Genloci im Zellkern transponiert, so dass nach der Verankerung HDAC4 mit NP115 und dem Chromatin einen funktionellen Komplex bildet (49).

Zusätzlich sind in den HDAC4-transduzierten Zellen deutlich Aggregate in ihrem Randbereich zu erkennen. Fraglich ist, welche Funktion diese Aggregate haben und ob sie intrazellulär oder extrazellulär vorliegen. In der Western-Blot-Analyse, in der bei Überexpression Nebenbanden sichtbar waren, wurde derselbe Antikörper verwendet wie in der Immunzytochemie. Es ist also davon auszugehen, dass auch in diesen zusätzlich markierten Arealen neben der Darstellung des intakten Proteins Spaltprodukte zu erkennen sind. Diese würden demnach aufgrund ihrer extensiven Produktion nicht ausreichend abgebaut werden und aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum verlagert werden, um einer Zellschädigung durch die Proteinaggregate zu entgehen. Die starke Konzentration von HDAC4 im Randbereich ist nur dort zu erkennen, wo die Zellen dicht aneinandergrenzen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass an diesen Stellen HDAC4 im Extrazellularraum zwischen den Zellen eingeschlossen ist und an den Stellen, wo das nicht der Fall ist, HDAC4 in den Zellzwischenraum abfließen kann. Dort

erreicht es dann eine so geringe und gleichmäßige Konzentration, dass es unterhalb des Detektionsniveaus liegen würde.

#### 4.2 Proliferation im Urothel im Bezug zum HDAC4 Expressionsniveau

In den HDAC4 überexprimierenden Zellen konnte mit wenigen Ausnahmen keine signifikante Änderung in der Proliferation festgestellt werden. In den Tests der Kurzzeitproliferation MTT und CellTiter-Glo® waren die Untersuchungen mittels des CellTiter-Glo®-Tests aussagekräftiger; sie wiesen eine geringere Varianz auf als die mittels MTT-Assay durchgeführten. In der CellTiter-Glo-Analyse machte es den Anschein, dass die HDAC4transduzierten Zellen gegenüber den Vektorzellen geringfügig benachteiligt sind, jedoch noch unterhalb des Signifikanzniveaus. Überlegenswert ist, ob durch die sehr starke Überexpression von HDAC4, die zum Teil um das 39-Fache gesteigert ist, den Zellen ein Proliferationsnachteil entsteht. Denn zum einen könnten, als Folge der Überexpression, Ressourcen für andere wichtige Stoffwechselprozesse fehlen und zusätzliche Energie wird für die Produktion von HDAC4 und die Abbauprodukte benötigt. Die Abbauprodukte von HDAC4 spielen hier unter Umständen eine weitere Rolle, so haben N-terminale Spaltprodukte von HDAC4 genregulatorische Wirkung in der Translation. Im einfachsten Fall behindern Abbauprodukte, die nicht schnell genug gespalten oder aus der Zelle ausgeschleust werden, die Homöostase der Zelle. Interessant wären zusätzliche Untersuchungen, mit dem Ziel festzustellen, ob eine moderate Steigerung von HDAC4 zu abweichenden Ergebnissen führen würde. Hier könnte über die Auswahl an anderen Promotoren im lentiviralen Konstrukt oder über mittels spezifischem CRISPR/Cas-Gen-Knock-in unter Umständen eine geringere Überexpression im physiologischen Bereich erzielt werden.

Grundsätzlich würde eine reduzierte Proliferation bei erhöhtem HDAC4 die bisherigen Beobachtungen unseres Labors einer eher antineoplastischen Eigenschaft des HDAC4 unterstützen (27). Diese Eigenschaft ist auch in anderen Geweben festgestellt worden (71, 72), jedoch gibt es sowohl für Harnblasenkarzinom (73) konträre Ergebnisse als auch bei anderen Geweben wie quergestreifter Muskulatur (74), hepatozellulären Karzinomen (75) und Kolonkarzinomen (76, 77), in denen HDAC4 die Proliferation steigert (78).

Durch die siRNA-interferenzvermittelte Reduktion von HDAC4 wurde die Kurzzeitproliferation in den Zelllinien SW1710 und T24 signifikant reduziert. Die beiden Zelllinien weisen stark voneinander abweichende endogene HDAC4-Spiegel auf, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die endogene Expression nicht als einziges entscheidend ist für ihre proliferative Eigenschaften. So bleibt die Frage, was diese beiden Zelllinien von 253J und BFTC-905 unterscheidet, bei denen kein Effekt auftrat. In den HDAC4-verminderten Zellen könnten wichtige Stoffwechselwege blockiert, die Genexpression wichtiger proliferativer Faktoren oder Proteine unterdrückt bzw. Proliferationsfaktoren gehemmt werden. Diese Möglichkeiten könnten über genomweite Genexpressionsanalysen unterschieden werden.

Dem stehen die unbeeinflussten Zellen gegenüber, die den Mangel an HDAC4 kompensieren können. In diesen könnten z. B. andere HDACs den Mangel an HDAC4 besser ausgleichen. So könnten diese Zellen bei HDAC4-Verlust schneller die fehlende enzymatische Aktivität von HDAC4 durch rasche Neuproduktion der komplementierenden HDACs bewältigen, wie es bereits für HDACs anderer Klassen nachgewiesen worden ist (46), oder den Wandel von einer bis dahin passiven Form solcher HDACs in eine aktive Form begünstigen. Unter Umständen ist in diesen Zellen ein höherer Anteil an gebundenem oder komplexiertem HDAC4, welches von siRNA nicht abgebaut werden kann. Auch ist denkbar, dass je nach Zelltyp diese geringe HDAC4-Aktivität ausreichend für die normale Zellaktivität ist.

Auf den ersten Blick wiesen die Viabilitäts Assays MTT- und Cell-Titer-Glo<sup>®</sup> eine geringere Proliferation als der LIVE/DEAD Cell Viability Assay nach (Abbildung 3-9). Da im MTT- und Cell-Titer-Glo<sup>®</sup>-Assay allerdings nur indirekt auf die Proliferation geschlossen wird, nämlich über den Gesamtmetabolismus der Zellen, und der LIVE/DEAD Cell Viability Assay eine direkte Messung der Anzahl lebender Zellen erlaubt, lässt sich schlussfolgern, dass hier der stärkere Zuwachs eher aus einer weniger gehemmten nummerischen Vermehrung der Zellen als einer stärker gehemmten Stoffwechselleistung resultiert. Dies hat die Auswirkung, dass die Zellen trotz geringeren Nährstoff- und Platzangebots ungehemmt mit einer Zellteilung fortfahren, jedoch der Energieumsatz der Zellkulturen nur bedingt Schritt hält.

Die Gegenkontrolle mit den mit Romidepsin und JQ1 behandelten Zellen ergab zu keinem Zeitpunkt einen relevant hohen Wert an toten Zellen, trotz der stagnierenden oder am letzten Tag sogar abfallenden Anzahl lebender Zellen. Es ist wahrscheinlich, dass die apoptotischen Zellen zusammen mit den Färbemedien entfernt worden sind und die gemessene Zahl der als tot detektierten Zellen nicht ihren wirklichen Anteil widerspiegeln. Die detektierten apoptotischen Zellen befanden sich vermutlich erst in einer frühen Phase der Apoptose und waren noch stärker adhärent. In den Beobachtungen der Langzeitproliferation imponieren die Zelllinien mit deutlich Wachstumsmustern, welche phänotypisches heterogenen ihr Erscheinungsbild widerspiegeln. Dabei ist zwischen HDAC4 überexprimierenden Zellen und Leervektorzellen kein Unterschied erkennbar. Die Zelllinien SW1710 und UM-UC-3, mit ihren eher mesenchymalen Phänotypen, weisen deutliche podozytische Ausläufer auf und bilden keine so deutlich abgrenzbaren Kolonien. Sie weisen Merkmale einer schon deutlich fortgeschrittenem EMT und nur geringe Polarität auf, mit schwachen Zell-Zell-Adhäsionen. SW1710 ist dabei die einzige Zelllinie, in der die HDAC4 Überexpression einen deutlichen Proliferationsvorteil generiert, und das trotz ihres ohnehin schon starken endogen exprimierten HDAC4. Offensichtlich profitiert besonders diese Zelllinie von hohen HDAC4-Werten, die über physiologische Expressionsniveaus ihren proliferativen Effekt entfalten können. UM-UC-3 hingegen weist keinen signifikanten Proliferationsvorteil durch HDAC4 auf, HDAC4 scheint hier sogar eher das Wachstum zu hemmen. Über den Beobachtungszeitraum von mehreren Passagen hinweg konnte der Verlauf der Langzeitproliferation beobachtet werden. Vor- bzw. Nachteile schienen sich zwischen HDAC4-transduzierten Zellen und Leervektoren zu relativieren und die Zellen wiesen in der Proliferation über die Passagen hinweg nur geringe Differenzen auf.

In unseren Experimenten gelang es lediglich in UM-UC-3-Zellen, ein stärkeres verankerungsunabhängiges Wachstum im Soft Agar Assay zu induzieren. Auch in den vorhergehenden Untersuchungen ließ UM-UC-3 ihr neoplastisches Potential in der (verankerungsabhängigen) Proliferation und der Migration erkennen. Diese Zelllinie erweist sich als besonders unempfindlich gegenüber Manipulationen, so kann sie bei niedrigsten Zellkonzentrationen und stark verdünnt Kolonien bilden. Ihr mesenchymaler Typ scheint dabei förderlich zu sein. So ist sie auf keine Zell-Zell-Kontakte oder Polarität angewiesen. UM-UC-3 Zelllinien weisen eine starke genetische Instabilität mit einer erhöhten phänotypischen Plastizität aufgrund ihres Non-Type Subtyps auf. Dies kommt hier zum Tragen, da unter dem Selektionsdruck einer neuen Umgebung die Zelllinien dieses speziellen Subtyps auf äußere Einflüsse so schneller reagieren kann. Diese hohe Plastizität kann auch für die Bildung der Kolonien hilfreich sein. Eine zusätzliche HDAC4-Transduktion unterstützt in diesem Fall die Fähigkeit der Zellen im Soft Agar zu wachsen nicht und so weisen diese in unserem Experiment eine geringere Kolonienbildungsfähigkeit auf. Zwar ist hier auch ein Wachstum möglich, jedoch kein so florides wie bei den Leervektorzellen.

Für die Hyperplasie in Tumoren ist die Aktivierung des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung. In der Zellzyklusanalyse variiert die Einzelverteilung der Zellzyklusphasen innerhalb der Zelllinien. Dies ist zum einen der phänotypischen Variabilität der Ausgangszelllinien geschuldet. Zum anderen ist zu überlegen, ob die verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien unterschiedlich auf die im Verlauf des Ernteprozesses bis zur Zyklusanalyse zugefügten Störfaktoren, wie chemischer Stress, in Form einer veränderten Zyklusverteilung reagieren. HDAC4-Zelllinien weisen im Vergleich zu ihren Leervektorzelllinien keine offensichtlichen Unterschiede in der Verteilung innerhalb der einzelnen Zellzyklen auf.

Zwischen den auch im Urothel wichtigen Zellzyklusregulatoren RB1, CDKN1A (p21), CDKN2A (p16), CCND1/2/3, CCNE1, CDK1/4/6, ATM sowie MDM2 (15) und HDAC4 konnte in einigen Geweben ein Zusammenhang dargestellt werden. Dabei hat HDAC4 unterschiedliche Einflussmöglichkeiten auf den Zellzyklus. So wurden sowohl pro-proliferative Einflüsse über die Hemmung von CDKN1A nachgewiesen (76, 79) als auch anti-proliferative Eigenschaften wie die Inhibierung von CDK1 (80) und ATM (81), welche zu einem Zellzyklus-Arrest geführt haben. Im Urothel selbst konnte zudem eine positive Korrelation der Expression von ATM und RB1 zu HDAC4 nachgewiesen werden (8). Welche dieser Zellzyklusregulatoren durch die Überexpression oder die RNA-Interferenz vermittelte Herabregulation von HDAC4 in Urothelkarzinomzellen beeinflusst wird, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Zu beachten ist jedoch, dass viele dieser Faktoren in Urothelkarzinomzelllinien, jeweils in unterschiedlicher Weise, durch Mutationen oder epigenetische Mechanismen verändert sind. Diese Veränderungen könnten beispielsweise die unterschiedliche Reaktion der Zelllinien auf Herabregulation oder Überexpression erklären.

Abschließend lässt sich zum Zusammenhang von HDAC4 und Proliferationseigenschaften sagen, dass Zelllinien mit endogen höherem HDAC4 zwar eine stärkere Proliferation aufweisen, jedoch durch lentivirale Transduktion von HDAC4 kein weiterer Proliferationsvorteil generiert werden konnte. Ein deutlicher Einfluss auf die Proliferation wie in anderen Geweben (76) konnte hier nicht gezeigt werden. So scheint das Expressionsniveau von HDAC4 nicht der alleinige Grund für eine Variabilität in der Proliferation sein. Eher ist anzunehmen, dass HDAC4 im Urothel Einfluss nimmt, indem es zur Differenzierung hin zu bestimmten molekularen Subtypen beiträgt, oder die HDAC4-Hochregulation lediglich ein

Nebeneffekt aufgrund anderer genetischer Veränderungen ist, welches zur zusätzlichen Induktion von HDAC4 führt.

Weiterhin können die PTM von HDAC4 eine Rolle spielen, so dass hohe HDAC4-Werte vorliegen können, aber weder neoplastische noch anti-neoplastische Funktionen aktiviert sind. So vermag HDAC4 zwar im Prinzip Einfluss auf die Genexpression verschiedener proliferativer Faktoren auszuüben, jedoch ist von übergeordneter Bedeutung, wodurch die Aktivität von HDAC4 reguliert wird. Zudem kann weiterhin nur eine begrenzte Aussage über den Zusammenhang von aktivem HDAC4 mit der Proliferation getroffen werden. Der Grund liegt in seiner komplexen Wirkung als Korepressor auf das Chromatin, so dass es sowohl auf proliferative als auch auf antiproliferative Gene sowie auf nichtkodierende Abschnitte des Genoms reprimierend wirkt, deren Funktion in Bezug auf die Proliferation noch nicht in Gänze verstanden ist. So mag HDAC4 hier eher eine modulierende Wirkung haben, als dass der eigentliche Proliferationsimpuls von diesem Protein ausginge.

# 4.3 Migration in Urothelkarzinomzellen im Bezug zum HDAC4 Expressionsniveau

In den untersuchten Zelllinien wurden stark unterschiedliche Migrationsmuster festgestellt. RT-112 vom epithelialen Typ wies dabei eine wesentlich langsamere Migration auf als die Zelllinien UM-UC-3 und SW1710 mesenchymalen Ursprungs. RT-112 wies in den Untersuchungen stets eine geschlossene Front auf und nur wenige Zellen lösten sich aus dem Zellverbund lösen die den Migrationsspalt vorzeitig infiltrierten. Die Annäherung der Zellfronten bei RT-112 verlief dabei derart langsam, dass die Bewegung der Zellen eher auf den größeren Raumbedarf und das verdrängende Wachstum zurückzuführen ist als auf ein Bestreben der Zellen, den freien Raum einzunehmen. Die mesenchymalen Zelllinien hingegen vereinten ihre Zellfronten in der Regel innerhalb von wenigen Stunden. Durch die fortgeschrittene EMT und die damit abgeschwächten Zell-Zell-Kontakte kam es bereits innerhalb kürzester Zeit zur Infiltration des Migrationsspalts durch vereinzelte Zellen; dem folgte alsbald der Rest der Zellen, um den freien Raum einzunehmen und sich mit den gegenüberliegenden Zellen zu verbinden. Es konnte kein Unterschied von HDAC4transduzierten zu Leervektorzellen in Bezug auf die Migration festgestellt werden. HDAC4 löste auch insgesamt keine EMT in Urothelzellen aus, wie es in Pneumozyten der Fall ist (82).

Die Zelllinien, die ohnehin bereits HDAC4 stark exprimierten, wiesen keine Veränderungen auf, demgegenüber konnten Zelllinien mit geringem HDAC4 durch überproportionale Steigerung auch keine schnellere Migration erwerben. Auch bei Zelllinien mit niedrigem endogenem HDAC4-Spiegel wie RT-112 konnte durch die Überexpression von HDAC4 keine Veränderung des Phänotyps über mehrere Passagen in Form einer EMT festgestellt werden, und die Migrationsfähigkeit blieb unverändert. Dem steht das Beispiel von HDAC5 gegenüber, welche zumindest in einer Urothelkarzinom-Zelllinie nach Überexpression eine EMT auslöste (83).

#### 4.4 Einfluss von HDAC4 auf die Differenzierung

Das urotheliale Gewebe weist in seiner stratifizierten Struktur deutliche Unterschiede in der Differenzierung der einzelnen Zellen auf (Abbildung 4-1). Zwar hat das Urothel im Vergleich zu anderen Epithelien einen eher geringen Zellumsatz, doch verfügt es über eine hohe Regenerationsfähigkeits (84).



Abbildung 4-1 **Differenzierungsmarker im Urothel.** Schematische Darstellung über den Aufbau des mehrschichtigen Übergangsepithels sowie dem Verlauf der Differenzierungsmarker

Durch die funktionelle Belastung hat jede Ebene innerhalb des mehrschichtigen Gewebes eine besondere Aufgabe, von den Basalzellen von denen die Regeneration ausgeht hin zu den Deckzellen, die aufgrund ihrer zytoskelettalen Struktur und der Oberflächenausprägung wesentlich die Barrierefunktion ausüben. Im Differenzierungsverlauf sind basal vor allem KRT5 und KRT14 ausgeprägt, was sich luminal zu einer dominanten KRT20 Ausprägung wandelt; damit geht ein zellulärer Umbau einher (85). Bei squamösen Metaplasien gehen zusätzlich "panurotheliale" Cytokeratine wie KRT13 zugunsten von KRT14 verloren (86, 87). In unseren Untersuchungen konnte erstmals eine direkte Evidenz dafür erlangt werden, dass HDAC4 Einfluss auf die Ausprägung solcher Differenzierungsmarker hat. Im Rahmen unserer Induktionsexperimente, bei denen eine Ausdifferenzierung imitiert wird, wurden dabei sowohl KRT14 als auch KRT20 hochreguliert. Dabei zeigte KRT14 nur eine moderate Steigerung, wohingegen KRT20 deutlich gesteigert worden ist. HDAC4 würde nach diesem Ergebnis in der Zellkultur im gesunden urothelialen Gewebe eine terminale Differenzierung begünstigen. Morphologisch konnte das Experiment zwar bestätigen, dass eine Differenzierung induziert worden ist, jedoch kam es dabei nicht zu einer unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung zwischen HDAC4-Zelllinien und den Leervektorzelllinien.

Interessant wäre nun zu untersuchen, wie sich die proliferativen Eigenschaften von HBLAK Zellen sich abhängig von der HDAC4 Expression nach der Induktion der Differenzierung unterscheiden. Hierzu müssten Markierungsexperimente mit EdU oder BrdU sowie die Bestimmung von Markern des Zellzyklus vorgenommen werden.

In einem nächsten Schritt könnte es von daher lohnenswert sein zu prüfen, ob dieser Zusammenhang in Verbindung mit den in UCCs zu beobachteten Veränderungen von KRT14 und KRT20 (8, 10) steht, wo die beiden Differenzierungsmarker in positiver Korrelation zu basalen (88) bzw. luminalen (13) Subtypen des invasiven UCs stehen. Die negativen Korrelation von HDAC4 zu PPARy und FOXA1 deutet darauf hin, dass HDAC4 die genetische Plastizität in einem kritischen molekularen Differenzierungsablauf beeinflussen könnte (10).

#### 4.5 Klinische Relevanz von HDAC4 und Therapiemöglichkeiten

Monotherapien mit Pan-HDACi haben sich bei der Behandlung von soliden Tumoren bisher als wenig hilfreich erwiesen, da sie starke Nebenwirkungen bei geringem Effekt aufwiesen. Kombinationen mit weiteren Wirkstoffen könnten jedoch erfolgversprechender sein. Hilfreich könnte auch eine genetische Subtypisierung der Tumoren sein; bei bestimmten Subtypen mag ein HDAC4-spezifischer Inhibitor eine sinnvolle Wahl sein. Hierbei steht zunächst im Fokus, die aktuellen HDACi weiter in Richtung erhöhter Spezifität für Isoenzyme zu entwickeln, um aussagekräftige in-vitro-Ergebnisse zu erzielen und um schließlich den klinischen Nutzen einer gezielten Klasse-IIa-Inhibition zu erforschen. Pharmaka auf Basis von 2-Trifluoroacetyl-Thiophen scheinen hierzu einen vielversprechenden Ansatz zu bieten (30) Eine entsprechende Therapie könnte so im Zusammenspiel mit den aktuellen Cisplatinbasierten Therapien oder der Immuncheckpoint-Inhibition gegen PD-1 / PD-L1 supplementär wirken. Wahrscheinlich ist, dass spezifische Inhibitoren gegenüber den Pan-HDACi oder Klasse-I HDACi ein reduziertes Nebenwirkungsprofil mit besserer Verträglichkeit aufweisen und sich gut mit der aktuellen Immuncheckpoint-Therapie ergänzen lassen.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Das Expressionsniveau von HDAC4 allein hat nur limitierte Aussagekraft über die proliferativen Eigenschaften im Urothel. Überexpressionen ergaben einen marginalen Einfluss auf die Proliferation, demgegenüber erwies sich eine Reduktion von HDAC4 über Interferenz zwar als antiproliferativ, jedoch nur zelllinienabhängig, und führte lediglich zu einer Verlangsamung der Proliferation und nicht zu einem Zelltod. Zudem war der Effekt eines HDAC4-Knockdowns unabhängig von dem HDAC4-Expressionsniveau, woraus sich die Hypothese ableite, dass der proliferative Einfluss von HDAC4 weniger auf dem absoluten Expressionsniveau beruht als vielmehr auf der Konzentration an aktivem HDAC4, die durch weitere Faktoren in der jeweiligen Zelle bestimmt wird.

Um diese zu evaluieren, sollte im Weiteren untersucht werden, wie die Komplexe, in denen HDAC4 wirkt, in den jeweiligen Zellen aufgebaut sind und aktiviert werden und speziell, ob HDAC4 bei entsprechend aktivem Ein- und Austransport aus dem Zellkern, also entsprechend dem Phosphorylierungsgrad, andere Einflüsse auf die Proliferation aufweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Daten anderer Publikationen sprechen vor allem jedoch dafür, dass HDAC4 Einfluss die Differenzierung im Urothel beeinflussen kann und somit auch zu Unterschieden zwischen molekularen Subtypen des Urothelkarzinoms beitragen könnte. Einige Daten zu HDAC4 deuten darauf hin, dass das Protein besonders eine maligne Entartung zu aggressiven Subtypen wie dem basalen Typ begünstigt. Im Weiteren muss nun die Frage gestellt werden, an welchem Punkt eine derartige Veränderung stattfindet, um herauszufinden ob dies entsprechende Therapiemöglichkeiten erlaubt. Abgesehen von den zellautonomen neoplastischen Eigenschaften gibt es noch weitere, wie die Begünstigung einer Neovaskularisation, veränderter Metabolismus oder inflammatorische Eigenschaften, auf die HDAC4 Einfluss haben könnte. Wenn diese Aspekte geklärt sind kann überlegt werden, ob HDAC4 als prädiktiver Marker im Zusammenhang mit gezielter Therapie geeignet ist und ob beispielsweise bereits floride Tumoren sich durch eine pharmakologische Behandlung mittels HDACi in besser behandelbare Subtypen transformieren lassen. Sollte dies der Fall sein, vermag ein HDAC4-spezifischer HDACi von therapeutisch großem Nutzen zu sein und birgt auch die Hoffnung, Resistenzen zu vermeiden.

# 5 Literatur

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69(1):7–34. doi: 10.3322/caac.21551.
- Giannopoulou AF, Velentzas AD, Konstantakou EG, Avgeris M, Katarachia SA, Papandreou NC et al. Revisiting Histone Deacetylases in Human Tumorigenesis: The Paradigm of Urothelial Bladder Cancer. Int J Mol Sci 2019; 20(6). doi: 10.3390/ijms20061291.
- Benjamin Barnes, Joachim Bertz, Nina Buttmann-Schweiger, Julia Fiebig, Susanne Jordan, Klaus Kraywinkel, Hildegard Niemann, Enno Nowossadeck, Christina Poethko-Müller, Franziska Prütz, Petra Rattaylna Schönfeld, Anne Starker, Antje Wienecke, Ute Wolf. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 2016.
- Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. Cancer Cell 2016; 30(1):27–42. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.004.
- Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. Cell 2017; 171(3):540-556.e25. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature 2013; 499(7457):214–8. doi: 10.1038/nature12213.
- Warrick JI, Sjödahl G, Kaag M, Raman JD, Merrill S, Shuman L et al. Intratumoral Heterogeneity of Bladder Cancer by Molecular Subtypes and Histologic Variants. Eur Urol 2019; 75(1):18–22. doi: 10.1016/j.eururo.2018.09.003.
- Buckwalter JM, Chan W, Shuman L, Wildermuth T, Ellis-Mohl J, Walter V et al. Characterization of Histone Deacetylase Expression Within In Vitro and In Vivo Bladder Cancer Model Systems. Int J Mol Sci 2019; 20(10). doi: 10.3390/ijms20102599.

- Batista da Costa J, Gibb EA, Bivalacqua TJ, Liu Y, Oo HZ, Miyamoto DT et al. Molecular Characterization of Neuroendocrine-like Bladder Cancer. Clin Cancer Res 2019; 25(13):3908–20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3558.
- Warrick JI, Walter V, Yamashita H, Chung E, Shuman L, Amponsa VO et al. FOXA1, GATA3 and PPARy Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines. Sci Rep 2016; 6. doi: 10.1038/srep38531.
- Knievel J, Schulz WA, Greife A, Hader C, Lübke T, Schmitz I et al. Multiple mechanisms mediate resistance to sorafenib in urothelial cancer. Int J Mol Sci 2014; 15(11):20500– 17. doi: 10.3390/ijms151120500.
- 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(37):4151–65. doi: 10.2174/0929867324666170207142740.
- Eckstein M, Wirtz RM, Gross-Weege M, Breyer J, Otto W, Stoehr R et al. mRNA-Expression of KRT5 and KRT20 Defines Distinct Prognostic Subgroups of Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer Correlating with Histological Variants. Int J Mol Sci 2018; 19(11). doi: 10.3390/ijms19113396.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017; 67(1):7–30. doi: 10.3322/caac.21387.
- Chandrasekar T, Erlich A, Zlotta AR. Molecular Characterization of Bladder Cancer. Curr Urol Rep 2018; 19(12):107. doi: 10.1007/s11934-018-0853-5.
- 16. Sternberg CN, Mulder PH de, Schornagel JH, Théodore C, Fossa SD, van Oosterom AT et al. Randomized phase III trial of high-dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor versus classic MVAC in advanced urothelial tract tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol no. 30924. J Clin Oncol 2001; 19(10):2638–46. doi: 10.1200/JCO.2001.19.10.2638.
- 17. Maase H von der, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ 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):3068–77. doi: 10.1200/JCO.2000.18.17.3068.

- Prof. Hecken. des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage XII – Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a SGB V – Atezolizumab (Urothelkarzinom); 2018. Verfügbar unter: https://www.gba.de/bewertungsverfahren/nutzenbewertung/315/#beschluesse.
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a singlearm, multicentre, phase 2 trial. Lancet 2016; 387(10031):1909–20. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4.
- Stenehjem DD, Tran D, Nkrumah MA, Gupta S. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. Onco Targets Ther 2018; 11:5973–89. doi: 10.2147/OTT.S135157.
- Vlachostergios PJ, Faltas BM. Treatment resistance in urothelial carcinoma: an evolutionary perspective. Nat Rev Clin Oncol 2018; 15(8):495–509. doi: 10.1038/s41571-018-0026-y.
- Faltas BM, Prandi D, Tagawa ST, Molina AM, Nanus DM, Sternberg C et al. Clonal evolution of chemotherapy-resistant urothelial carcinoma. Nat Genet 2016; 48(12):1490–9. doi: 10.1038/ng.3692.
- Lee H-Z, Kwitkowski VE, Del Valle PL, Ricci MS, Saber H, Habtemariam BA et al. FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. Clin Cancer Res 2015; 21(12):2666–70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3119.
- Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. Oncologist 2007; 12(10):1247–52. doi: 10.1634/theoncologist.12-10-1247.

- Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. Clin Cancer Res 2015; 21(21):4767–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0530.
- 26. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. Int J Mol Sci 2017; 18(7). doi: 10.3390/ijms18071414.
- Niegisch G, Knievel J, Koch A, Hader C, Fischer U, Albers P et al. Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. Urol Oncol 2013; 31(8):1770–9. doi: 10.1016/j.urolonc.2012.06.015.
- Niegisch G, Hoffmann MJ, Koutsogiannouli EA, Schulz WA. Epigenetik des Urothelkarzinoms : Pathogenese, verbesserte Diagnostik und neue Therapieansätze. Urologe A 2015; 54(4):526–32. doi: 10.1007/s00120-014-3756-1.
- Grivas P, Mortazavi A, Picus J, Hahn NM, Milowsky MI, Hart LL et al. Mocetinostat for patients with previously treated, locally advanced/metastatic urothelial carcinoma and inactivating alterations of acetyltransferase genes. Cancer 2019; 125(4):533–40. doi: 10.1002/cncr.31817.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes.
   Cold Spring Harb Perspect Biol 2014; 6(4):a018713. doi: 10.1101/cshperspect.a018713.
- 31. Kelly AD, Issa J-PJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. Curr Opin Genet Dev 2017; 42:68–77. doi: 10.1016/j.gde.2017.03.015.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell 2012; 150(1):12–27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. Nat Genet 2011; 43(9):875–8. doi: 10.1038/ng.907.
- 34. The Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, Wang W, Verhaak RGW et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. Nature 2014; 507:315 EP -. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1038/nature12965.

- Vogelauer M, Krall AS, McBrian MA, Li J-Y, Kurdistani SK. Stimulation of histone deacetylase activity by metabolites of intermediary metabolism. J Biol Chem 2012; 287(38):32006–16. doi: 10.1074/jbc.M112.362467.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. Current Opinion in Cell Biology 2003; 15(2):172–83. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00013-9.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. Science 2009; 325(5942):834–40. doi: 10.1126/science.1175371.
- 38. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Lett 2009; 277(1):8–21. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.016.
- Wang Z, Qin G, Zhao TC. HDAC4: mechanism of regulation and biological functions.
   Epigenomics 2014; 6(1):139–50. doi: 10.2217/epi.13.73.
- Kaletsch A, Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Jaguva Vasudevan AA, Wang C, Hansen FK et al. Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. Clin Epigenetics 2018; 10(1):100. doi: 10.1186/s13148-018-0531-y.
- Lee J-S, Leem S-H, Lee S-Y, Kim S-C, Park E-S, Kim S-B et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. J Clin Oncol 2010; 28(16):2660–7. doi: 10.1200/JCO.2009.25.0977.
- Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. Mol Cell 2007; 27(2):197–213. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.033.
- Li X-D, Zhang J-X, Jiang L-J, Wang F-W, Liu L-L, Liao Y-J et al. Overexpression of maelstrom promotes bladder urothelial carcinoma cell aggressiveness by epigenetically downregulating MTSS1 through DNMT3B. Oncogene 2016; 35(49):6281–92. doi: 10.1038/onc.2016.165.
- Monteiro-Reis S, Lobo J, Henrique R, Jerónimo C. Epigenetic Mechanisms Influencing Epithelial to Mesenchymal Transition in Bladder Cancer. Int J Mol Sci 2019; 20(2). doi: 10.3390/ijms20020297.

- 45. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. Trends Genet 2003; 19(5):286–93. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00073-8.
- Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Deenen R, Köhrer 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(2):299–312. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0618.
- Lehmann M, Hoffmann MJ, Koch A, Ulrich SM, Schulz WA, Niegisch G. Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment. J Exp Clin Cancer Res 2014; 33:59. doi: 10.1186/s13046-014-0059-8.
- Rosik L, Niegisch G, Fischer U, Jung M, Schulz WA, Hoffmann MJ. Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells. Cancer Biol Ther 2014; 15(6):742–57. doi: 10.4161/cbt.28469.
- Kehat I, Accornero F, Aronow BJ, Molkentin JD. Modulation of chromatin position and gene expression by HDAC4 interaction with nucleoporins. J Cell Biol 2011; 193(1):21–9. doi: 10.1083/jcb.201101046.
- LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Groshen S, Lenz H-J, Ladner RD. DNA microarray profiling of genes differentially regulated by the histone deacetylase inhibitors vorinostat and LBH589 in colon cancer cell lines. BMC Med Genomics 2009; 2(1):599. doi: 10.1186/1755-8794-2-67.
- Liu F, Pore N, Kim M, Voong KR, Dowling M, Maity A et al. Regulation of histone deacetylase 4 expression by the SP family of transcription factors. Mol Biol Cell 2006; 17(2):585–97. doi: 10.1091/mbc.e05-08-0775.
- Wang AH, Yang XJ. Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. Mol Cell Biol 2001; 21(17):5992–6005. doi: 10.1128/mcb.21.17.5992-6005.2001.
- Paroni G, Mizzau M, Henderson C, Del Sal G, Schneider C, Brancolini C. Caspasedependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. Mol Biol Cell 2004; 15(6):2804–18. doi: 10.1091/mbc.e03-08-0624.

- Kirsh O, Seeler J-S, Pichler A, Gast A, Müller S, Miska E et al. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. EMBO J 2002; 21(11):2682–91. doi: 10.1093/emboj/21.11.2682.
- Liu F, Dowling M, Yang X-J, Kao GD. Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4. J Biol Chem 2004; 279(33):34537–46. doi: 10.1074/jbc.M402475200.
- 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 2016; 2(4):449–63. doi: 10.3233/BLC-160065.
- 57. Zhang X-Y, La Russa VF, Reiser J. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. J Virol 2004; 78(3):1219–29. doi: 10.1128/jvi.78.3.1219-1229.2004.
- Pietschmann T, Heinkelein M, Heldmann M, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. J Virol 1999; 73(4):2613–21.
- Wiek C, Schmidt EM, Roellecke K, Freund M, Nakano M, Kelly EJ et al. Identification of amino acid determinants in CYP4B1 for optimal catalytic processing of 4-ipomeanol. Biochem J 2015; 465(1):103–14. doi: 10.1042/BJ20140813.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ et al. Cell Viability Assays: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016.
- Hölscher AS, Schulz WA, Pinkerneil M, Niegisch G, Hoffmann MJ. Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. Clin Epigenetics 2018; 10:1. doi: 10.1186/s13148-017-0434-3.
- Thermo Scientific. ArrayScanXTI Manual [Stand: 18.03.2019]. Verfügbar unter: https://www.biocompare.com/12104-Equipment/10618051-ArrayScan-XTI-Live-High-Content-Platform/.

- 63. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. Sixth edition. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell; 2010. Verfügbar unter: http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10452124.
- 64. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc 2006; 1(3):1458–61. doi: 10.1038/nprot.2006.238.
- 65. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150(1):76–85.
- 66. Quiagen. RNeasy<sup>®</sup>Mini Hand book; 2012.
- 67. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162(1):156–9. Verfügbar unter: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269787900212.
- QIAGEN GmbH. QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit Google-Suche; 2009 [Stand: 04.06.2019]. Verfügbar unter: https://www.google.com/search?client=firefox-bd&q=QuantiTect%C2%AE+Reverse+Transcription+Kit.
- 69. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell 2016; 165(3):535–50. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Akhtar A, Gasser SM. The nuclear envelope and transcriptional control. Nat Rev Genet 2007; 8(7):507–17. doi: 10.1038/nrg2122.
- Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar MA, Yen TJ. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. J Cell Biol 2003; 160(7):1017–27. doi: 10.1083/jcb.200209065.
- 72. Geng L, Cuneo KC, Fu A, Tu T, Atadja PW, Hallahan DE. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. Cancer Res 2006; 66(23):11298–304. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0049.
- 73. Xu XS, Le Wang, Abrams J, Wang G. Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer. J Hematol Oncol 2011; 4:17. doi: 10.1186/1756-8722-4-17.

- 74. Marroncelli N, Bianchi M, Bertin M, Consalvi S, Saccone V, Bardi M de et al. HDAC4 regulates satellite cell proliferation and differentiation by targeting P21 and Sharp1 genes. Sci Rep 2018; 8(1):3448. doi: 10.1038/s41598-018-21835-7.
- 75. Zhang J, Yang Y, Yang T, Liu Y, Li A, Fu S et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity. Br J Cancer 2010; 103(8):1215–20. doi: 10.1038/sj.bjc.6605895.
- Wilson AJ, Byun D-S, Nasser S, Murray LB, Ayyanar K, Arango D et al. HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. Mol Biol Cell 2008; 19(10):4062–75. doi: 10.1091/mbc.e08-02-0139.
- 77. Wilson AJ, Byun D-S, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y et al. Histone deacetylase
  3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression
  and are deregulated in human colon cancer. J Biol Chem 2006; 281(19):13548–58. doi:
  10.1074/jbc.M510023200.
- Stark M, Hayward N. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res 2007; 67(6):2632–42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4152.
- 79. Mottet D, Pirotte S, Lamour V, Hagedorn M, Javerzat S, Bikfalvi A et al. HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53independent mechanism. Oncogene 2009; 28(2):243–56. doi: 10.1038/onc.2008.371.
- Majdzadeh N, Wang L, Morrison BE, Bassel-Duby R, Olson EN, D'Mello SR. HDAC4 inhibits cell-cycle progression and protects neurons from cell death. Dev Neurobiol 2008; 68(8):1076–92. doi: 10.1002/dneu.20637.
- Li J, Chen J, Ricupero CL, Hart RP, Schwartz MS, Kusnecov A et al. Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia telangiectasia. Nat Med 2012; 18(5):783–90. doi: 10.1038/nm.2709.
- Kaowinn S, Kaewpiboon C, Koh SS, Krämer OH, Chung Y-H. STAT1-HDAC4 signaling induces epithelial-mesenchymal transition and sphere formation of cancer cells overexpressing the oncogene, CUG2. Oncol Rep 2018; 40(5):2619–27. doi: 10.3892/or.2018.6701.

- Jaguva Vasudevan AA, Hoffmann MJ, Beck MLC, Poschmann G, Petzsch P, Wiek C et al. HDAC5 Expression in Urothelial Carcinoma Cell Lines Inhibits Long-Term Proliferation but Can Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Int J Mol Sci 2019; 20(9). doi: 10.3390/ijms20092135.
- Varley C, Hill G, Pellegrin S, Shaw NJ, Selby PJ, Trejdosiewicz LK et al. Autocrine regulation of human urothelial cell proliferation and migration during regenerative responses in vitro. Exp Cell Res 2005; 306(1):216–29. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.02.004.
- 85. Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. Lab Invest 1994; 71(4):583–94.
- Varley CL, Southgate J. Effects of PPAR agonists on proliferation and differentiation in human urothelium. Exp Toxicol Pathol 2008; 60(6):435–41. doi: 10.1016/j.etp.2008.04.009.
- Varley CL, Stahlschmidt J, Smith B, Stower M, Southgate J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells. Am J Pathol 2004; 164(5):1789–98. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63737-6.
- 88. Papafotiou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, Kanaki Z, Paschalidis N, Klinakis A. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. Nat Commun 2016; 7:11914. doi: 10.1038/ncomms11914.
- Gong M, Yu Y, Liang L, Vuralli D, Froehler S, Kuehnen P et al. HDAC4 mutations cause diabetes and induce β-cell FoxO1 nuclear exclusion. Mol Genet Genomic Med 2019; 7(5):e602. doi: 10.1002/mgg3.602.

Freigabe zur Verwendung für nichtkommerzielle Zwecke für die Abbildung 1 - 2 und 1 - 3 durch Cold Spring Harbor Laboratory Press. 17.01.2020.

## 5.1 Aminosäuresequenz HDAC4

1 mssgshpdgl sgrdgpvell nparvnhmps tvdvatalpl gvapsavpmd Irldhgfslp 61 vaepalregg lggellalkg kggigrgili aefgrghegl srgheaglhe hikgggemla 121 mkhqqelleh qrklerhrqe qelekqhreq klqqlknkek gkesavaste vkmklqefvl 181 nkkkalahrn Inhcissdpr ywygktghss Idgssppgsg vstsynhpvl gmydakddfp 241 Irktasepni kirsrikqkv aerrsspilr rkdgpvvtal kkrpldvtds acssapgsgp 301 sspnnssgsv saengiapav psipaetsla hrlvaregsa aplplytsps lpnitlglpa 361 tgpsagtagq qdaerltlpa lqqrlslfpg thltpylsts plerdggaah spllqhmvll 421 eqppaqaplv tglgalplha qslvgadrvs psihklrqhr plgrtqsapl pqnaqalqhl 481 viggqhqqfl ekhkqqfqqq qlqmnkiipk pseparqpes hpeeteeelr ehqalldepy 541 ldrlpggkea hagagvgvkg epiesdeeea epprevepgg rgpsegellf rggalllegg 601 rihqlrnyqa smeaagipvs fgghrplsra qsspasatfp vsvqepptkp rfttglvydt 661 lmlkhqctcg sssshpehag riqsiwsrlq etglrgkcec irgrkatlee lqtvhseaht 721 llygtnplnr qkldskkllg slasvfvrlp cggvgvdsdt iwnevhsaga arlavgcvve 781 lvfkvatgel kngfavvrpp ghhaeestpm gfcyfnsvav aakllqqrls vskilivdwd 841 vhhgngtqqa fysdpsvlym slhryddgnf fpgsgapdev gtgpgvgfnv nmaftggldp 901 pmgdaeylaa frtvvmpias efapdvvlvs sgfdaveghp tplggynlsa rcfgyltkql 961 mglaggrivl alegghdlta icdaseacvs allgneldpl pekvlqqrpn anavrsmekv 1021 meihskywrc lgrttstagr slieagtcen eeaetvtama slsvgvkpae krpdeepmee 1081 eppl (89)

### 5.2 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben. An das Team im Urologischen Forschungslabor der Universitätsklinik Düsseldorf: Dr. Alexander Lang, PhD Margaretha Skowron, Prof. Daniel Nettersheim und Christiane Hader, die mir während meiner Laborarbeiten stets zur Seite gestanden haben, mir eine gute Anleitung während meiner Labortätigkeiten gegeben haben und stets mit kreativen Ideen hinter mir standen. Mein besonderer Dank richtet sich an P.-D. Michèle Hoffmann, die mich vom ersten Tag an in äußerst professioneller Weise in meinen Labortätigkeiten unterwiesen hat, mit der ich stets gezielte Lösungswege für meine Probleme finden konnte und ohne ihre beachtlich gute Planung im Labor meine Arbeit wesentlich schwieriger gewesen wäre. Hervorragender Dank richtet sich an meinen Doktorvater, Prof. Dr. Wolfgang Schulz, der mich in seiner freundlichen Art stets unterstützt hat und ohne dessen planvolle Supervision und sowohl konstruktiver Kritik als auch seiner ausdauernden Geduld meine Dissertation nicht die Qualität angenommen hätte, in der sie nun vorliegt.

Ein außerordentlicher Dank richtet sich an Katina Gebert, die mit größter Gründlichkeit sowohl die Dissertation lektoriert hat, als auch mich stets ermutigt hat, über den gesamten Verlauf meiner Dissertation konsequent weiter zu arbeiten. So gilt mein Dank auch meiner Mutter, die mir in ihrem Arbeitseifer immer ein Vorbild war und die mich stets unterstützt hat, so dass ich ohne Druck diese Dissertation fertig stellen konnte.

## 5.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Richtlinien der Medizinischen Fakultät zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte wurden als solche kenntlich gemacht. Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zum Nichtbestehen der betreffenden Promotionsleistung führt und die weitere Folge hat, dass die Fakultät über die Entziehung des Doktorgrades entscheidet (§ 16 Promotionsordnung). Die strafrechtlichen Konsequenzen einer falschen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt (§156 StGB). Des Weiteren kann gemäß § 63 Absatz 5 HG eine Zuwiderhandlung mit einer Geldbuße geahndet werden.