

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

Wirkung von niedrigen Konzentrationen von
Desoxyazacytidin und Azacytidin auf
Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Dissertation

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

vorgelegt
von Andreas Link

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Wolfgang Schulz

Zweitgutachter: Prof. Norbert Gattermann

I. Zusammenfassung

Die Prognose des metastasierten Urothelkarzinoms ist immer noch ungünstig und die Therapiemöglichkeiten bleiben limitiert. Neben neuen Ansätzen zur Immuntherapie rücken aktuell epigenetische Therapien von Tumoren in den Fokus der Tumorforschung.

Die beiden Medikamente Decitabin (5-Aza-Desoxycytidin) und Azacitidin (5-Azacitidin) werden bisher vor allem bei hämatologischen Neoplasien verwendet; dabei haben sich niedrige Dosierungen als besonders wirksam erwiesen. Beide Substanzen hemmen vor allem die DNA-Methyltransferasen und können so die Genexpression beeinflussen. In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, diese Medikamente gegenüber Urothelkarzinomzelllinien niedrig dosiert einzusetzen und ihre Auswirkungen zu erfassen. Dazu wurden sechs verschiedene Urothelkarzinom-Zelllinien 72 h lang mit Decitabin oder Azacitidin behandelt. Anschließend wurden die Zellvitalität, die Klonogenität der Zellen, der Methylierungsgrad ihrer DNA und die Expression ausgewählter Gene untersucht.

Auffällig waren große Unterschiede zwischen Azacitidin und Decitabin. Azacitidin wirkt über 72 h deutlich zytotoxischer, Decitabin unterdrückte dagegen schon in sub-mikromolaren Konzentrationen die Klonogenität. Der DNA-Methylierungsgrad wurde unter diesen Bedingungen bei hohen Konzentrationen von Azacitidin, jedoch bei mittleren von Decitabin verändert. In Genexpressionsanalysen ließen sich keine Ergebnisse zeigen, die einheitlich auf die Aktivierung bestimmter Signalwege schließen ließen, weder im Vergleich der Zelllinien noch der Medikamente. Insgesamt wirkte Azacitidin bei höchster Konzentration jedoch homogener auf die Genexpression.

Die Wirkungsweise der Medikamente sollte zusätzlich durch den Vergleich mit einer siRNA-induzierten Herabregulation („Knock-Down“) der DNA-Methyltransferase DNMT1 aufgeklärt werden. Der DNMT1 Knock-Down erbrachte unterschiedliche Ergebnisse gegenüber den beiden Chemotherapeutika, sowohl bei den molekularbiologischen Analysen, als auch bei den Klonogenitätsversuchen. Hier zeigte sich ebenfalls keine einheitliche Änderung der Genexpression.

Ob die Effekte der Medikamente auf epigenetischen oder zytotoxischen Mechanismen beruhen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dies lag möglicherweise daran, dass andere als die ausgewählten Parameter verändert werden oder dass die meisten Veränderungen in den gewählten Parametern erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden.

Die Untersuchungen liefern interessante neue Ansatzmöglichkeiten für die Therapie des Harnblasenkarzinoms. Hier könnte Decitabin niedrig dosiert eingesetzt werden, um eine langfristige Wachstumshemmung zu erzielen oder für weitere Substanzen zu sensibilisieren.

II. Summary

The prognosis of metastatic urothelial carcinoma has remained poor for decades and therapy options are limited. Recently, however, in addition to novel immunotherapies, epigenetic drugs have moved into the focus of tumor research as a new therapeutic approach.

Currently, the two drugs decitabine (5-aza-deoxycytidine) and azacitidine (5-aza-cytidine) are mainly used in haematological neoplasias, where, surprisingly, low doses have proved efficacious. The two drugs primarily inhibit DNA methyltransferases and can thus influence gene expression. In this study, these drugs were applied in low doses to urothelial carcinoma cell lines and their effects were assessed. Six different urothelial carcinoma cell lines were treated with decitabine or azacitidine for 72 hours. Cell vitality, clonogenicity, DNA methylation and expression of selected genes were then investigated.

There were evident differences between the effect of azacitidine and decitabine. Azacitidine exerted significantly more cytotoxic effects over 72 h, whereas decitabine suppressed clonogenicity already at sub-micromolar concentrations. DNA methylation decreased at high concentrations of azacitidine, but more at moderate concentrations of decitabine. Gene expression analysis did not yield uniform results indicative of the activation of specific signaling pathways, neither between cell lines nor between drugs. Overall, however, azacitidine at the highest concentration had the most consistent effect on gene expression.

The mode of action of the drugs was to be clarified further by comparison with a siRNA-induced knock-down of the DNA methyltransferase DNMT1. The knock-down experiments yielded different results from those of the two drugs, in both molecular biological analyses and clonogenicity assays. Here, no uniform change in gene expression was observed.

Whether the effects of the drugs are based on epigenetic or cytotoxic mechanisms could not be conclusively elucidated. They might be due to changes in parameters other than those tested, or to changes in the selected parameters taking place at later time points than those tested.

The investigations suggest interesting new approaches for the therapy of bladder carcinoma. In particular, decitabine could be used at low doses to achieve long-term growth inhibition or to sensitize the tumors to other compounds.

III. Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CIS	Carcinoma in situ
CK	Zytokeratin
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FCS	fetal calf serum
HERV	Humane endogene Retroviren
LINE	Long interspersed element
LTR	long terminal repeats
miRNA	Micro-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromid
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative real time Polymerasekettenreaktion
UC	Urothelkarzinom
UCC	Urothelkarzinom-Zelllinien
TUR-BT	Transurethrale Resektion eines Blasen Tumors

IV. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Therapie des Harnblasenkarzinoms	1
1.2 Molekulargenetische Veränderungen im Urothelkarzinom	4
1.3 Epigenetische Mechanismen und epigenetische Therapie	5
1.4 Azacitidin und Decitabin als epigenetische Medikamente	6
1.5 Epigenetische Therapie des Urothelkarzinoms	8
1.6 Fragestellung:	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Zelllinien	12
2.2 Chemikalien, Kits und Labormaterialien	14
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	17
2.4 Zellkultur	21
Zytostatikabehandlung der Zellkulturen	22
Zellzählung	22
Klonogenitäts-Assay	22
Soft-Agar-Assay	22
Transfektion von siRNA	23
MTT-Assay	23
CellTiter-Glo-Assay	23
2.5 Molekularbiologische Methoden	24
DNA-Isolierung	24
Bisulfitumwandlung von genomischer DNA	24
Pyrosequenzierung	24
RNA-Isolierung:	25
Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	25
Protein-Isolierung und Western-Blot	25
2.6 Programme und Statistik	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf die Zellvitalität im 3-Tage-Versuch	27
Cell Titer Glo nach 120 h	32
3.2 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf molekulare Parameter	34
3.2.1 Genexpressionsveränderungen	34
3.3.2 Einfluss auf die DNA-Methylierung	41
3.2.3 Einfluss auf die Proteinexpression von DNMT1	42

3.3 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf die Klonogenität	44
3.4 Soft-Agar-Assay	50
3.5 Auswirkungen einer siRNA-induzierten Herabregulation von DNMT1	53
3.5.1 Auswirkungen auf die Protein-Expression	53
3.5.2 Auswirkungen auf die Gen-Expression	55
4. Diskussion	58
4.1 Wie unterscheiden sich Azacitidin und Decitabin in ihren Effekten?	58
4.2 Welche Konzentrationen der beiden Substanzen sind wirksam?	61
4.3 Über welche Mechanismen wirken die Substanzen?	62
4.4 Lassen sich die beobachteten Effekte der beiden Nukleosidanaloga gleichermaßen durch siRNA-vermittelte Herunterregulation ("Knock-Down") der DNMT1 auslösen?	65
5. Ausblick	69
6. Literatur	71
Danksagung	76

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Therapie des Harnblasenkarzinoms

Harnblasenkrebs ist weltweit der siebthäufigste Krebs, wobei das Urothelkarzinom (UC) in der westlichen Welt mit 90% den Großteil der Fälle ausmacht [1], Plattenepithel- und Adenokarzinome den restlichen Anteil [2]. Zu den Risikofaktoren seiner Entstehung zählen Rauchen, aromatische Amine, bestimmte Medikamente, höheres Alter und Bilharziose. Männer sind im Schnitt häufiger betroffen als Frauen, jedoch ist die Zahl der Betroffenen rückläufig, was wahrscheinlich am verringerten Tabakkonsum liegt [3-5]. Das Lebenszeitrisko an Blasenkrebs zu erkranken betrug im Jahr 2015 in Deutschland bei Männern 2,5% und bei Frauen 0,9% [1].

Die Therapie richtet sich hauptsächlich nach den Unterteilungen der TNM Klassifikation (Abb.en 1-3). Die aktuellen Therapiestandards werden von nationalen und internationalen Leitlinien vorgegeben; eine nationale S3-Leitlinie wurde 2016 veröffentlicht [6], eine Aktualisierung folgt 2020.

Wird ein UC neu diagnostiziert, so liegt in ungefähr 80% der Fälle ein nicht-invasiver papillärer Tumor oder ein Carcinoma in Situ (CIS) vor, bei denen sich der Tumor nur auf das Urothel beschränkt. Diese Tumoren besitzen zwar eine hohe klinische Relevanz; jedoch zählen sie laut ICD-10 nicht zu den bösartigen Neuerkrankungen. Bei ihnen ist eine transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-BT) die Therapie der Wahl. Jedoch besteht eine hohe Rückfallquote von 70%. Von diesen rezidivierenden Tumoren werden wiederum 10-20% muskelinvasiv. In mehr als 20 % der neu diagnostizierten Fälle ist der Tumor muskelinvasiv, also im Stadium pT2-pT4, der in der Regel mittels radikaler Zystektomie behandelt wird [7].

Liegt ein Stadium II (Abb. 2) oder höher vor, sollte eine radikale Zystektomie mit Lymphadenektomie durchgeführt werden. Beim Mann sollten zusätzlich die Prostata und die Samenblasen entfernt werden, bei der Frau der Uterus, die Ovarien und Tuben. Die Harnableitung kann nach dieser Operation über verschiedene Art und Weisen erfolgen; die häufigste ist ein Ileum-Konduit. Hier wird zwischen Harnleiter und Haut ein Dünndarmsegment geschaltet und auf die Haut ein Beutel geklebt, in dem der Urin gesammelt und entfernt werden kann. Eine weitere Möglichkeit ist eine Neoblase, eine neu geformte Blase aus Dünndarmabschnitten. Die Wahl des Blasenersatzes hängt unter anderem von den jeweiligen Patienten eigenen Faktoren wie Alter und Konstitution ab [6].

Ab einem Stadium mit Muskelinvasion ($\geq cT2$) ist eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie in Betracht zu ziehen, durch die sowohl der Behandlungserfolg erhöht als auch das Risiko von Metastasen gesenkt werden kann. Ob eine Chemotherapie adjuvant oder neoadjuvant durchgeführt

wird, hängt vom jeweiligen Patienten ab; Hochrisiko-Patienten profitieren von einer neoadjuvanten-Chemotherapie [6, 8]. Die Standard-Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin sollte vor oder innerhalb von 3 Monaten nach der Operation erfolgen. Die Anzahl der aus statistischer Sicht zu behandelnden Patienten, um bei einem Patienten einen positiven Effekt zu erzielen („number needed to treat“), ist relativ hoch, mit 13 Patienten bei neoadjuvanter und mit 9 Patienten bei adjuvanter Therapie.

Im lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium bietet die Chemotherapie aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin (MVAC) oder Gemcitabin und Cisplatin einen Überlebensvorteil; die mediane Überlebensrate beim Stadium IV beträgt 14-15 Monate [9, 10]. Solche Therapien werden seit den 80iger Jahren des vorigen Jahrhunderts eingesetzt.

Ein weiterer Ansatz ist die Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Es wird angenommen, dass im Normalfall das Immunsystem mittels T-Zellen die Entwicklung und Ausbreitung von Tumorzellen unterdrücken kann. Jedoch entwickeln maligne Tumore Mechanismen, um der Immunantwort zu entgehen. Beispielsweise aktivieren sie Immuncheckpoints, u.a. durch verstärkte Expression des Oberflächenmoleküls PD-L1. Diese Blockaden können teilweise mit Medikamenten aufgehoben werden, z.B. mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab. Da hierzu erste erfolgreiche Studien vorliegen, ist er seit September 2017 für die Therapie des Blasenkarzinoms auch in Europa zugelassen [11, 12].

Abbildung 3.22.3
Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht (oben: inkl. fehlender Angaben und DCO-Fälle; unten: nur gültige Werte)
ICD-10 C67, Deutschland 2011 – 2012

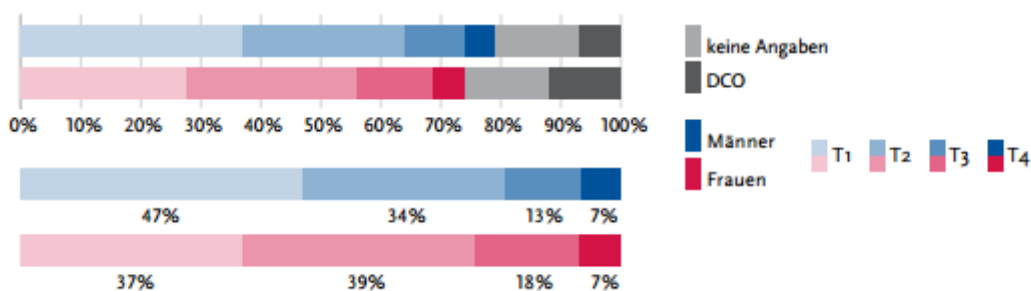


Abb. 1: Verteilung der T-Stadien bei invasivem Harnblasenkarzinom bei Erstdiagnose [1] (Genehmigung zur Benutzung durch das Robert Koch Institut [RKI] erteilt)

Stadium	Einteilung		
0a	Ta	N0	M0
0is	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a-b	N0	M0
III	T3a-b	N0	M0
IV	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
	alle T	N1-3	M0
	alle T	alle N	M1

Abb. 2: Stadien des Urothelkarzinoms nach der S-3 Leitlinie [9]

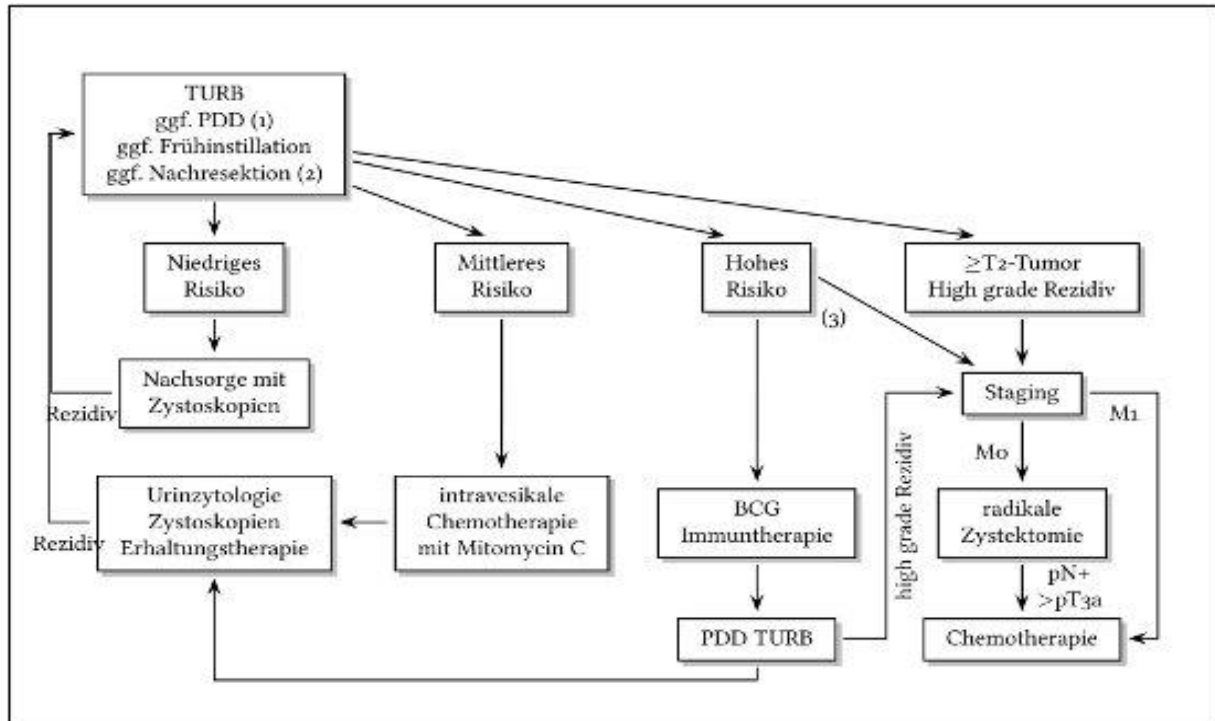


Abb. 3: Therapiealgorithmus Harnblasenkarzinom; TURB = transurethrale Resektion der Harnblase PDD= Photodynamische Diagnostik; BCG = Bacillus Calmette-Guerin, intravesikale Instillation;

aus: http://www.urologielehrbuch.de/01/harnblasenkarzinom_chart.jpg (Genehmigung zur Verwendung durch den Herausgeber und Verlag erteilt)

1.2 Molekulargenetische Veränderungen im Urothelkarzinom

Invasive Urothelkarzinome sind geprägt von genetischer Instabilität, chromosomalen Veränderungen mit Genamplifikationen, Zugewinnen und Verlusten von Allelen. Diese genetische Instabilität wird durch die Inaktivierung der Kontrollfunktion des p53 Tumorsuppressors in praktisch allen Fällen ermöglicht. Des Weiteren sind häufig wichtige Proteine der DNA-Reparatur und von *DNA Damage Checkpoints* wie ERCC2 (excision repair cross-complementation group 2) oder ATM (ataxia-telangiectasia mutated) durch Mutationen inaktiviert. Dadurch werden im muskelinvasiven Karzinom vor allem Doppelstrangbrüche nicht mehr korrekt repariert [13]. Zur genomischen Instabilität könnten auch Mutationen in STAG2 (stromal antigen 2) beitragen, einer Komponente der Cohesin-Komplexe, die das Genom organisieren und den Zusammenhalt der Chromatiden während der Mitose sichern [14]. Gemeinsam führen diese Veränderungen zur chromosomalen Instabilität. Am häufigsten kommt es zu Deletionen von Chromosom 9, auch in papillären Tumoren. Auf Chromosom 9 liegen einige Tumorsuppressor-Gene, maßgeblich *CDKN2A* und *CDKN2B*, die für p14^{ARF}, p16^{INK4A} und p15^{INK4B} kodieren, Regulatorproteinen von p53 und RB1. Somit beeinträchtigt dieser Verlust sowohl Zellzyklus-Kontrollpunkte als auch die Regulation des Zellzyklus selbst. Veränderungen in anderen Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1, Cyclin E, CDK4 und RB1 selbst kommen ebenfalls vor.

Aktivierende Mutationen im Tyrosin-Kinase-Rezeptor FGFR3 werden bei papillären Tumoren häufig beobachtet, auch bei solchen, die in einen muskelinvasiven Tumor übergegangen sind. Das Übergangsepithel der Harnblase ist durch eine hohe Fähigkeit zur schnellen Regeneration gekennzeichnet, die auch über die Rezeptortyrosinkinase EGFR aktiviert wird. Diese wird auf Chromosom 7 durch *ERBB1* kodiert, das in Urothelkarzinomen recht häufig amplifiziert ist, ebenso wie das paraloge *ERBB2* auf Chromosom 17 [14]. Alle drei Rezeptoren wirken über MAP-Kinase und PI3-Kinase Signalwege, die auch unmittelbar durch Mutationen in *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* und *PIK3CA* überaktiviert werden können.

Die systematische Charakterisierung der molekularen Veränderungen im Harnblasenkarzinom, welche in den letzten Jahren erfolgt ist, ermöglicht die Identifizierung von möglichen Zielen für moderne zielgerichtete Medikamente, beispielsweise in den proliferationssteuernden MAP-Kinase und PI3-Kinase Signaltransduktionswegen [15]. Vor allem aber spricht die Entdeckung von sehr häufigen Mutationen in epigenetischen Regulatorproteinen dafür [16], bei der Therapie des Urothelkarzinoms "epigenetische Medikamente" zu erproben.

1.3 Epigenetische Mechanismen und epigenetische Therapie

Zu den zentralen epigenetischen Mechanismen gehört die Modifikation der DNA durch Methylierung, speziell des Cytosins in CpG-Dinukleotiden. In den meisten Geweben sind 70-80% der CpG-Dinukleotide methyliert, andere Cytosine sind nur ausnahmsweise methyliert [17]. Die DNA-Methylierung ist die wichtigste chemische Modifikation und epigenetische Veränderung der DNA [18]. Dadurch wird die genetische Information nicht verändert, jedoch wirkt sich die Modifikation auf die Transkription aus und infolgedessen darauf, welche Gene exprimiert werden. Die Methylierung der DNA beeinflusst die Chromatin-Struktur und wird ihrerseits wieder durch verschiedene Chromatinregulatoren beeinflusst. Die DNA-Methylierung wird durch drei DNA-Methyltransferasen katalysiert. DNMT3A und DNMT3B sind überwiegend für die de-novo-Methylierung vorher unmethylierter DNA zuständig, die DNMT1 überwiegend für die Aufrechterhaltung der Methylierung, besonders nach der Replikation [19, 20].

Physiologisch trägt die DNA-Methylierung zur Auswahl der Gene und Genomregionen bei, die transkribiert werden. Beispielsweise sind CpG-Dinukleotide in endogenen Retroelementen wie den Long Interspersed Elements (LINE-1 u.a.) gewöhnlich stark methyliert, was zur Repression ihrer Aktivität beiträgt. Auch bestimmte Gene, die entwicklungsabhängig stark unterschiedlich exprimiert werden, werden durch differentielle Methylierung ihrer regulatorischen Abschnitte (Promotoren, Promotor-flankierende Sequenzen und Enhancer) kontrolliert. Ein Beispiel hierfür stellen Cancer-Testis-Antigene (CTA) dar, also Gene, die gewöhnlich nur in Keimzellen oder Keimzellvorläuferzellen exprimiert werden, jedoch nicht in somatischen Geweben. Durch Demethylierung können sie in Tumorzellen aktiviert werden. Zu diesen Genen zählt *CTCF* und *MAGE-A3* [21]. Gänzlich unmethyliert bleiben hingegen zumeist CpG-reiche Abschnitte um den Transkriptionsstart von Genen, besonders konstitutiv exprimierten, die als CpG-Inseln bezeichnet werden.

Epigenetische Veränderungen sind für die Entstehung von Tumoren ein essenzieller Bestandteil. Das physiologische Muster der DNA-Methylierung ist in Tumorzellen gestört. Einerseits tritt genomweit Hypomethylierung auf, die beispielsweise an LINE-1 Sequenzen oder CTA-Genen nachweisbar wird. Eine generelle DNA Hypomethylierung begünstigt genomische Instabilität und kann zur Aktivierung von Onkogenen führen [22, 23]. Normalerweise unmethylierte CpG-Inseln sind in Tumoren häufig methyliert. Dieser als „Hypermethylierung“ bezeichnete Prozess kann insbesondere zur Repression von proliferationsinhibierenden oder Apoptose-fördernden Genen mit tumorsuppressiver Wirkung beitragen. Beispielsweise reprimiert die Hypermethylierung Gene für Zellzyklusinhibitoren wie *CDKN2A* oder *CDKN2B* [24, 25]. Gemeinsam mit genetischen Veränderungen, wie der Überexpression von E2F1, E2F3, *CCND1*/Cyclin D1 oder *CCNE1*/Cyclin E oder der Inaktivierung von p53, führen diese

Veränderungen dazu, dass sich Tumorzellen der physiologischen Wachstumskontrolle entziehen können. Zusammen mit den häufigen Veränderungen in Chromatinregulatoren könnte die DNA-Hypermethylierung vor allem beim UC für Tumorentstehung, Metastasierung und Therapieresistenz verantwortlich sein [26]. Daher ist eine induzierte Demethylierung der DNA ein möglicher Therapieansatz, über den Tumorsuppressor-Gene reaktiviert werden könnten [27]. Ein anderer Effekt der Demethylierung könnte die Reaktivierung von Retroelementen sein, die dann eine Immunantwort gegen den Tumor, z.B. über den Interferonweg, induzieren [28]. Wegen der ausgeprägten Hypomethylierung von Retroelementen beim Urothelkarzinom könnte dies besonders bei dieser Tumorart relevant sein.

1.4 Azacitidin und Decitabin als epigenetische Medikamente

Der Wirkstoff Decitabin (Dacogen®) ist 2'-Desoxy-5-Azacytidin und somit ein Desoxycytidin Analogon, welches in die DNA eingebaut werden kann. Azacitidin (Vidaza®) ist 5-Azacytidin, ein Cytidin Analogon, welches somit in die RNA eingebaut werden kann, ein Teil wird in die Desoxy-Form überführt und wirkt dann wie Decitabin (Abb. 4). Diese beiden Medikamente wirken zytotoxisch, haben jedoch einen weiteren wichtigen Effekt: Sie binden nach Einbau in die DNA die DNA-Methyltransferasen 1 (DNMT1) und 3 (DNMT3A/B) kovalent und führen letztendlich zu deren Abbau. Dadurch wird die DNA bei der Replikation oder bei einer Reparatur demethyliert [29]. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Effekt der entstehenden Protein-DNA-Addukte, welche Replikation und Transkription hemmen. Sie müssen durch DNA-Reparatur entfernt werden [30].

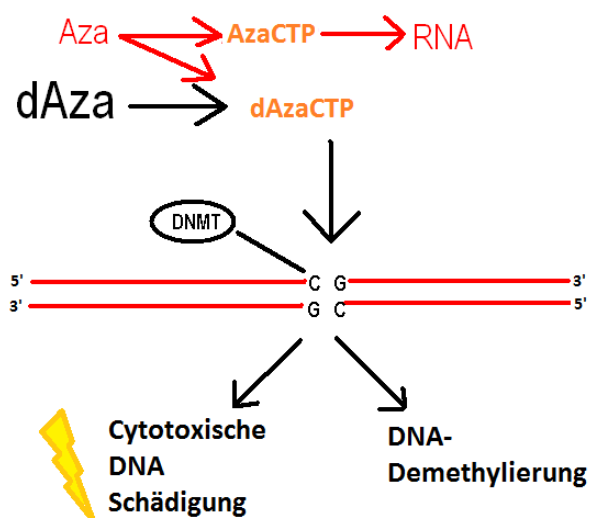


Abb. 4: Wirkmechanismen von Decitabin und Azacitidin

Durch ihren Wirkmechanismus als Nukleosid-Analoga haben diese Medikamente eine starke zytotoxische und myelosuppressive Wirkung, die bei hämatologischen Erkrankungen erwünscht ist [31]. Deshalb werden beide Substanzen aktuell in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) und des myelodysplastischen Syndroms (MDS) eingesetzt [32, 33]. Bei soliden Tumoren sind beide Medikamente nicht ausreichend untersucht und bisher nicht zugelassen.

Die epigenetische Regulation von malignen Zellen ist seit einigen Jahren in den Fokus der Tumorforschung und -therapie gerückt (Abb. 5). Die Substanzen Decitabin und Azacitidin werden dabei zu den ersten „epigenetischen Medikamenten“ gezählt. Eine neue Herangehensweise besteht darin, diese Medikamente bei geringerer Dosis, jedoch über einen längeren Zeitraum einzusetzen, anstatt bei der maximal tolerierten Dosis (MTD). Hierdurch sollen sie weniger über ihre Zytotoxizität wirken, sondern über ihre epigenetische Komponente. Für diesen Ansatz sprechen einige Versuche und Studien [34, 35]. Niedrig dosiertes Decitabin senkte die Mortalität von Hochrisiko-MDS-Patienten um bis zu 50%; die mediane Zeit zum Entfalten der Wirkung betrug dabei mehr als 3 Monate [36]. Speziell wurde beobachtet, dass *CDKN2B/p15^{INK4B}* durch Demethylierung reaktiviert wurde.

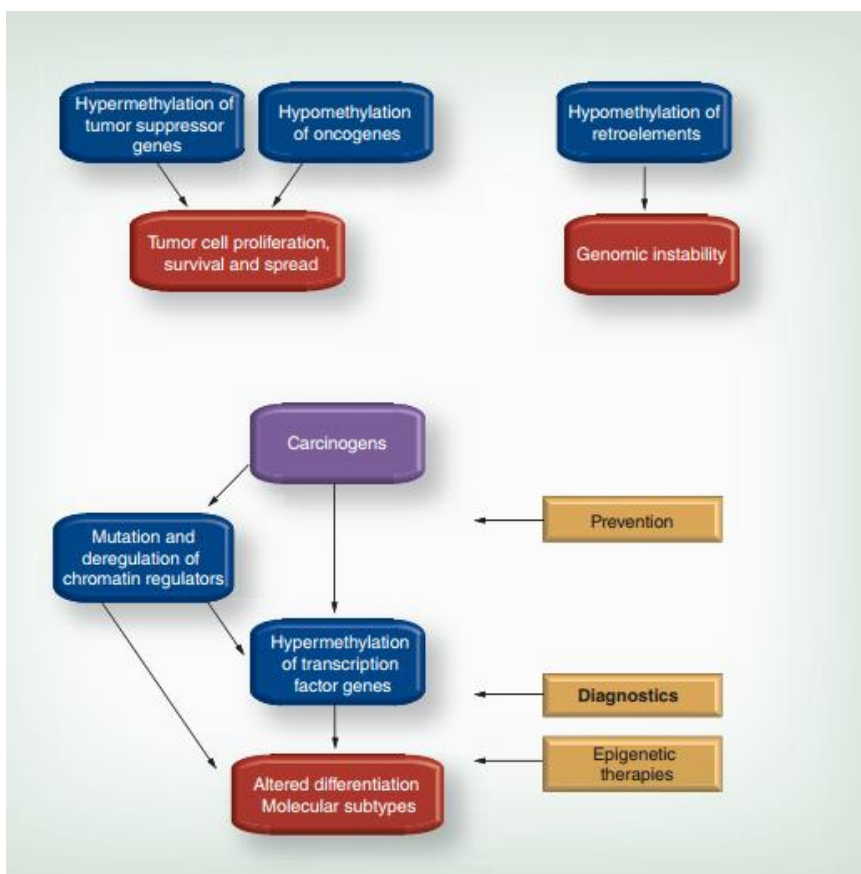


Abb. 5 Nutzung von Veränderungen der DNA Methylierung in Tumorzellen zur Tumörprävention, -diagnostik und -therapie [24] (Genehmigung zur Benutzung durch den Verlag erteilt, Future Medicine - Epigenomics, Licence ID: 1014324-1)

Auch beim refraktären, fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) führten niedrig-dosiertes Decitabin bzw. Azacitidin kombiniert mit Histon-Deacetylase (HDAC) Inhibitoren (Entinostat) zu erfolgreichen Ergebnissen. In diesen Studien zeigte sich, dass die Kombination eines HDAC-Inhibitors und eines Cytosin-Analogons ähnliche Überlebensraten ermöglicht wie eine Chemotherapie. Speziell konnte eine Therapie mit einer demethylierenden Substanz Tumoren gegenüber anderen Medikamenten sensibilisieren und diese überhaupt wirksam machen [37]. Die niedrige Dosis von Azacitidin besitzt sowohl ein besseres Nebenwirkungsprofil als auch eine stärkere Wirksamkeit als die maximal tolerierte Dosis [38].

In vitro konnten Beobachtungen an Leukämie-, Mammakarzinom- und NSCLC-Zelllinien mit niedrigen Konzentrationen von Decitabin (10 – 300 nM) nachvollzogen und erste Einblicke in die molekularen Mechanismen gewonnen werden. So wird diskutiert, ob die Antitumorwirkung dadurch zustande kommt, dass die Tumorzellen mit Selbsterneuerungsfähigkeit, die Tumorstammzell-ähnlichen Zellen (CSC, *cancer stem cells*), verändert werden. Diese werden für das Versagen verschiedener Chemotherapeutika verantwortlich gemacht, da sie weniger empfindlich gegenüber klassischen Zytostatika, aber auch vielen zielgerichteten Medikamenten reagieren [39, 40]. Molekular könnte die Wirksamkeit der Cytosinanaloge auf der genomweiten Demethylierung von Promoter-Regionen basieren [41].

Im Gegensatz zu einer zytostatischen Therapie sollte eine Therapie mit niedrigen Dosen epigenetischer Medikamente milder und für viele Patienten verträglicher sein. Sie benötigt jedoch auch mehr Zeit, da Effekte erst zu beobachten sind, sobald sich Zellen mehrfach geteilt haben. Als wichtiger Punkt einer epigenetischen Therapie zeichnet sich ab, dass derzeit keine Heilung erreicht werden kann. Die Zellen werden zeitweise normalisiert, jedoch wächst ein Tumor weiter sobald die Therapie beendet ist oder er entwickelt auch gegen diese Therapie Resistenzen.

1.5 Epigenetische Therapie des Urothelkarzinoms

Wie oben ausgeführt, ist die medikamentöse Therapie des UC nur sehr begrenzt wirksam, sobald der Tumor metastasiert ist. Zudem vertragen viele der älteren Patienten toxische Zytostatika nicht gut. Bislang kann durch keine Chemotherapie ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Aus diesen Gründen wird aktuell intensiv nach neuen Herangehensweisen und einer Erweiterung der Therapiemöglichkeiten gesucht. Biologisch ist das UC eine sehr inhomogene Gruppe von Tumoren, das durch sehr häufige Mutationen in epigenetischen Regulatorproteinen charakterisiert ist [16] (vgl. Abschnitt 1.2). Mit dem Progress des Urothelkarzinoms nehmen auch die Veränderungen der DNA-Methylierung zu, sowohl Hyper- als auch Hypomethylierung [42]. Jedoch variieren sie von Tumor zu Tumor und von DNA-Abschnitt zu DNA-Abschnitt [25]. Dennoch könnte besonders die Hypo- und

Hypermethylierung auch für die Diagnostik des UC im Urinsediment genutzt werden. Hierzu gibt es bereits einige interessante und möglicherweise vielversprechende Ansätze, jedoch gibt es hierzu noch keine standardisierte und etablierte Methode [43-46].

Molekular zielgerichtete Therapien waren beim UC bisher wenig erfolgreich. Beispielsweise konnte durch die Inhibition von FGFR3 und EGFR eine Wachstums-Inhibition und Lebenszeitverlängerung von Mäusen erzielt werden. Diese Erfolge konnten jedoch zunächst bei klinischen Studien nicht bestätigt werden [47]. Erst neuerdings wurden gute Ergebnisse mit Erdafitinib, einem Inhibitor verschiedener FGF-Rezeptoren, erzielt [48]. In weiteren Tierversuchen konnte die Angiogenese durch Blockade von VEGF verhindert werden und eine Verlängerung der Lebenszeit erzielt werden. Diese konnte durch den gleichzeitigen Einsatz von Chemotherapeutika weiter gesteigert werden. Jedoch konnten auch diese Erkenntnisse nicht an Patienten bestätigt werden, stattdessen traten sogar verstärkt Nebenwirkungen auf [47]. Die bisherigen Studien lassen große Unterschiede zwischen Versuchen in Mausmodellen und klinischen Ergebnissen bei Patienten sichtbar werden [49]. Daher steigt das Interesse an epigenetischen Therapieansätzen. Bei einer Gruppe von Harnblasenkrebs-Patienten wurde beispielsweise bereits untersucht, wie sich eine Decitabin-Behandlung auf Cisplatin-resistente Tumorzellen auswirkt [50]. Hier wurde gezeigt, dass bei Cisplatin resistenten Tumorzellen der *HOXA9* Promoter methyliert ist und durch den Einsatz von Decitabin diese Zellen für Cisplatin sensitiviert wurden.

Die oben aufgeführten mannigfaltigen Veränderungen in Genexpression, Chromatin- und DNA-Struktur und Zellzyklus bieten Ansatzpunkte für epigenetische Therapien. So könnten epigenetische Veränderungen zumindest teilweise rückgängig gemacht werden, um dadurch Zellzyklusinhibitoren oder eine Seneszenz zu aktivieren [22]. Jedoch werden neben unmittelbar epigenetischen Effekten noch weitere Möglichkeiten diskutiert. So wäre es möglich, dass durch epigenetische Therapien eine inhibitorische Wirkung auf Tumorstammzellen oder eine Aktivierung des Interferon-I Wegs erreicht wird und es zu einer Hochregulierung von Molekülen kommt, die eine erfolgreiche Immunantwort erlauben. Es wurde in diesem Zusammenhang auch eine höhere MHC-1 Dichte gemessen; dadurch könnten T-Zellen die Tumorzellen erfolgreicher erkennen. Zur gesteigerten Immunantwort könnte zudem eine gesteigerte Expression von Genen der MAGE-Familie beitragen [51, 52]. Aus diesem Grund könnte es sinnvoll sein, epigenetische Medikamente mit Immuntherapien zu kombinieren.

Zum Urothelkarzinom fehlen bisher valide Daten klinischer Studien und Ergebnisse zum Einsatz von niedrig dosiertem Azacitidin und Decitabin [44]. Jedoch legen die oben beschriebenen Ergebnisse zu anderen Tumoren und zu epigenetischen Veränderungen im Urothelkarzinom nahe, dass eine Therapie mit niedrig dosiertem Azacitidin und Decitabin vielversprechende Ergebnisse liefern kann.

1.6 Fragestellung:

Obwohl Decitabin und Azacitidin in verschiedenen Tumormodellen erprobt worden sind, gibt es wenige und keine systematischen Untersuchungen zum UC. Daher sollte in dieser Dissertation eine systematische Untersuchung der Wirkung der beiden Substanzen an einer breiten Auswahl von Urothelkarzinomzelllinien erfolgen. Dabei standen folgende Fragestellungen im Zentrum:

- Gibt es Unterschiede in der Wirkung des Ribonukleosids Azacitidin und des Desoxyribonukleosids Decitabin?
- Welche Konzentrationen der beiden Substanzen sind wirksam? Speziell: Vermindern auch bei UC-Zellen niedrige Konzentrationen im nanomolaren Bereich die Zellproliferation oder die Überlebensfähigkeit?
- Verlaufen kurzfristige Effekte (d.h. auf die Vitalität nach 3 Tagen) und langfristige Wirkungen (d.h. in Klonogenitätsassays) parallel?
- Welche Mechanismen werden ausgelöst? Wie verändern sich DNA-Methylierung, DNMT1 und die Expression typischer Indikatorogene?
- Lassen sich die beobachteten Effekte der beiden Nukleosidanaloga gleichermaßen durch siRNA-vermittelte Herunterregulation ("Knock-Down") der DNMT1 auslösen?

Damit diese Fragen beantwortet werden können, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die die zellulären Eigenschaften und molekulare Veränderungen betreffen.

Vitalitäts-Assays dienen zum Vergleich der Toxizität der verschiedenen Behandlungsdauern (24 h, 72 h und 120 h). Klonogenitäts- und Soft-Agar-Assays wurden durchgeführt, um zu verfolgen wie die Applikation langfristig wirkt. Diese erfassen die Fähigkeit der Tumorzellen mehrere Replikationszyklen zu durchlaufen und Klone zu bilden. Der Soft-Agar-Assay misst zusätzlich die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum; beide Assays weisen auch auf Stammzeleigenschaften hin. Interessant ist hierbei, die nötige Behandlungsdauer bis zur Wirkung herauszufinden. Daher wurden auch diese Zellen unterschiedlich lange behandelt (24 h und 72 h).

Um herauszufinden, ob eine Decitabin und Azacitidin Behandlung dazu führt, dass DNMT1 degradiert wird, wurde ein Western-Blot angefertigt. Ob sich durch die Behandlung tatsächlich der Methylierungsgrad der DNA verändert wurde durch eine Bisulfit-Pyrosequenzierung untersucht.

Um charakteristische Genexpressionsveränderungen als Folge der DNA-Demethylierung durch Decitabin und Azacitidin zu verfolgen, wurde die Expression verschiedener Ziel-Gene (LINE-1, *CTCF*, *MAGE-A3* und *CDKN1A/p21*) mittels qPCR gemessen (zur Auswahl der Gene siehe Kapitel Genexpression 3.2.1). Zur Differenzierung, ob die Effekte von Decitabin und Azacitidin darauf

beruhen, dass die DNMT1 inhibiert wird oder zytotoxische bzw. immunologische Effekte im Vordergrund stehen, wurde eine Versuchsreihe mit einem Knock-Down der DNMT1 angefertigt.

Bisher gibt es keine publizierten Untersuchungen dazu, wie sich niedrige Dosierungen von Decitabin und Azacitidin auf UC-Zelllinien auswirken. Ob diese Behandlung Auswirkungen auf das Verhalten der Zellen hat, und welcher Mechanismus in dem Falle zu Grunde liegt, ist die wesentliche Fragestellung dieser Arbeit. Letztendlich könnten anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung neue Ansätze für die derzeit limitierte medikamentöse Therapie des UC gefunden werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Für die vorliegende Dissertation wurden 6 Urothelkarzinomzelllinien (UCC) verwendet. Diese Zelllinien weisen verschiedene Charakteristiken auf; speziell unterscheiden sie sich im Differenzierungsgrad und Phänotyp (Tabelle 1.1).

Charakteristika gemäß Angaben der ATCC-Zelllinienbank sind unter aktuell folgenden Adressen zu finden:

www.dsmz.de bzw. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1749.aspx?geo_country=de

Tabelle 1.1: Verwendete Urothelkarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Tumorgrad	Ursprung	Geschlecht Patient	Alter Patient [in Jahren]	Referenz	Phänotyp
VM-CUB-1	G2	Primärtumor Harnblase	männlich	53	[53]	epithelial
UM-UC-3		Primärtumor Blase	männlich		[54] [55]	mesenchymal
RT-112	G2	Primärtumor Blase	weiblich		[56]	epithelial
T-24	G3		weiblich	81	[57]	mesenchymal
5637	G2	Primärtumor Blase	männlich	68	[58]	epithelial
639-V	G3	Primärtumor Ureter	männlich	69	[59]	großflächig mesenchymal

Die Urothelkarzinomzelllinien wurden freundlicherweise von Dr. M. A. Knowles, ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds, UK, sowie von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA, über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger, zur Verfügung gestellt. Ihre Identität wurde regelmäßig durch STR-Analyse im Institut für Rechtsmedizin der HHU nachgewiesen.

Tabelle 1.2: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Mini spin centrifuge	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Vortexer	Neolab
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Blotkammer	Biorad
Multipipette	Eppendorf
Nanodrop	NanoDrop Technologies
Shaker	Neolab
Roller SRT1	Stuart Scientific
Trio Thermoblock	Biometra
T3 Thermocycler	Biometra
Thermomixer	Eppendorf
Zellkulturwerkbank	Gelaire
Lichtmikroskop Dialux 22EB SDS-Page Gelelektrophoresekammer	Leitz
Thermoblock	Biometra
Elektrophoresekammer	Biometra
LightCycler 2.0	Roche
ABI Prism 7500 fast	Applied Biosystems
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen
PyroMark Q24 pyrosequencer	Biotage
Curix 60 (developing machine)	Agfa

2.2 Chemikalien, Kits und Labormaterialien

Tabelle 1.3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller	Ort
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie	Steinheim
dNTP-Mix	Fermentas	St. Leon-Rot
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT)	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen	Karlsruhe
Ethanol	Merck	Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest	Nuaillé, Frankreich
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent	Invitrogen	Karlsruhe
Magermilchpulver	Neuform	Lüneburg
Methanol	Merck	Darmstadt
Opti-MEM	Invitrogen	Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
PBS-Lösung	Biochrom	Berlin
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim

Protein-Auftragspuffer	Fermentas	St. Leon-Rot
10 x PCR-Puffer	Qiagen	Hilden
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Roth	Karlsruhe
SDS ultra pure	Roth	Karlsruhe
50 x TAE-Puffer	S-Prime	Hamburg
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
Tris Base	Merck	Darmstadt
Trizol Reagent	Invitrogen	Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen	Karlsruhe
Tween 20	Serva	Heidelberg
5-Aza-2'-Desoxycytidin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich Chemie	Steinheim
HotStart Taq-DNA-Polymerase	Qiagen	Hilden

Tabelle 1.4: Verwendete Molekularbiologische Kits und Reagenzien

BCA™ Protein Assay	Pierce
ECL™ Advanced Western	Amersham, GE
CellTiter-Glo® Luminescent	Promega
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
QIAzol	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

RNase-Free DNase Set	Qiagen
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
0.1 M DTT	Invitrogen
5x First Strand Buffer	Invitrogen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
dNTP Mix	Fermentas
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	Qiagen
6x DNA Loading Dye	Thermo
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Proteinase K	Qiagen
RNase A	Qiagen
EZ DNA Methylation-Gold Kit	Zymo Research
PyroMark PCR Kit	Qiagen
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen

Tabelle 1.5: Proteine, Western Blot

Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
Pierce BCA Protein Assay	Thermo
Albumin Standard	Thermo
Lämmli Sample Buffer	Biorad
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo
Mini-PROTEAN TGX Gels (Any kD, 7%, 10%, 12%, 4-20%)	Biorad
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Biorad

Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore
Whatman Paper	Whatman
Sucofin skimmed milk powder	TSI GmbH
Bovine Serum Albumin	Sigma
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
High performance chemiluminescence film Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 1.6:

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT-Lösung)	5 mg/ml MTT in PBS, steril filtriert
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 mg/ml Ethidiumbromid
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0

Lösungen Western-Blot

Blockierlösung 5 % Magermilchpulver oder BSA in 0,1 % TBS-T

10x Elektrophoresepuffer	30,3 g	Tris Base
	133 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 L	
6 x Lämmli-Puffer	350 mM	Tris, pH 6,8
	350 mM	SDS
	30%	Glycerol
	3,3 %	DTT
	1,2 mg	Bromphenolblau

Protein-Lysis-Puffer, „Ripa-Art“, pH 7,6	150 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Desoxycholat
	1 %	NP-40
	0,1 %	SDS
	1 mM	EDTA
	50 mM Tris (pH 7,6)	
	1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail pro 10 ml (Zugabe vor Gebrauch)	
Lagerung bei -20°C		
Milder Stripping Buffer	1,5 %	Glycin
	0,1 %	SDS
	1 %	Tween 20
Sammelgel	1,4 ml	dH ₂ O
	0,25 ml	30 %iges Acrylamid
	0,25 ml	1 M Tris (pH 6,8)
	20 µl	10 %iges SDS
	20 µl	10 %iges Ammoniumpersulfat
	2 µl	TEMED
SDS-Laufpuffer (Pierce)	100 mM	Tris
	100 mM	Hepes
	3 mM	SDS
	pH 8	
10 x TBS	12,11 g Tris	
	87,7 g	NaCl
	ad 1000 ml	dH ₂ O
	pH 7,4	

10x Transferpuffer: 6,06 g Tris
 28,8 g Glycin
 400 ml Methanol
 ad 2 L

Trenngel: 1,1 ml dH₂O
 2,5 ml 30 %iges Acrylamid
 1,3 ml 1,5 M Tris (pH 6,8)
 50 µl 10 %iges SDS
 50 µl 10 %iges Ammoniumpersulfat
 2 µl TEMED

5 x Western-Blot-Puffer: 24,4 mM Tris
 192 mM Glycin
 pH 8,3

1 x Western-Blot-Puffer: 200 ml 5 x Blotpuffer
 10% Ethanol
 ad 1000 ml dH₂O

Waschpuffer 0,1% Tween 20 in 1x TBS

Tabelle 1.7: Verwendete Primer

Gen	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Melting-Temp. [°C]	Hersteller
DNMT1	forward: GGC TAT CAG TGC ACC TTC G	58,8	eurofins Genomics
	reverse: GGA GCA AAC ACG TGC AGT G	58,8	
CTCFL	forward: TGT CAC CTC TGC CTG AAA A	54,5	eurofins Genomics
	reverse: TGT AGG GCC TGG TTC CTG T	58,8	
CTCFL	forward: CTG CTG CGG AAC CAT GTT A	56,7	eurofins Genomics
	reverse: GGT GAC AAA TGC CAT GTT GC	57,3	
MAGE-A3	forward: AAG AAG CTG CTC ACC CAA CAT T	58,4	eurofins Genomics

	reverse: CTT GGA CCC CAC AGG AAT T	56,7	
MAGE-A3	forward: GTC GTC GGA AAT TGG CAG TAT	57,9	eurofins Genomics
	reverse: TGG GGT CCA CTT CCA TCA G	58,8	
MX-1	forward: GTG GCC CAG AAA AAT CCA GG	58,8	eurofins Genomics
	Reverse: AGC CCG CAG GGA GTC AAT	58,8	
p21	Forward:GGA AGA CCA TGT GGA CCT GT	59,4	eurofins Genomics
	Reverse:GGC GTT TGG AGT GGT AGA AA	57,3	

Tabelle 1.8: Primer für die Pyrosequenzierung

Gen	Primer-Sequenz 5'->3'	Anneling Temp. [°C]	Hersteller
LINE-1	(Hauptassay) forward: TTG AGT TAG GTG TGG GAT ATA GT reverse: AAA CCC AAA AAA TCA AAA AAT TCC CTT TCC (Biotin) Sequence to analyze: TYGTGGTGYGTYGTTTTTTAAGTYGGTTTGAAAAGYGTAATATTYG GGTGGGAGTGATT	57,1 57,1	eurofins genomics

Tabelle 1.9: Primäantikörper

Spezifität	Wirt	Hersteller	Größe [kDa]
DNMT1	Rabbit	New England Bio Labs	185
DNMT1	Mouse	IMGENEX	185
DNMT1 (D59A4)	Rabbit	Cell Signaling #5119	183
DNMT3B	Rabbit	New England Bio Labs	95
DNMT3B	Rabbit	Abgent	95
α -Tubulin	Mouse	Sigma	55

siRNAs:

DNMT1 siRNA (h2)	sc-156049 von Santa Cruz
Control si RNA-A	Control si RNA-A: sc-37007 von Santa Cruz

2.4 Zellkultur

Alle UCC wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 10% hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 100 µg Penicillin/Streptomycin kultiviert. Im Brutschrank wuchsen die Zellen bei 37,5 °C und 5% CO₂.

Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, dieses abgesaugt und die Zellen zum Lösen mit 2 ml 0,25 %igem Trypsin/EDTA pro 75 cm² Zellkulturflasche benetzt. Nach dem Ablösen wurden 4 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden suspendiert und je nach Experiment anteilig in neue Gefäße überführt. Im Grundexperiment wurden die Zellen nach Aussaat 72 h kultiviert und alle 24 h Azacitidin oder Decitabin in frischem Medium hinzugefügt; in den Kontrollen wurde ebenfalls das Medium erneuert. Danach erfolgten die weiteren jeweils spezifischen Messungen oder anschließende Experimente, wie im Ergebnisteil detailliert beschrieben. Für das Grundexperiment stellten sich für das Aussäen der Zellen in 96-Well-Platten die in Tab. 1.10 gelisteten Zellzahlen pro 100 µl als am aussagekräftigsten heraus:

Tabelle 1.10: Ausgesäte Zellzahlen

Tumor-Zelllinie	Zellzahl/ 100µl
UM-UC-3	2000
VM-CUB-1	2000
T-24	1500
5637	5500
639-V	5000
RT-112	3000

Zytostatikabehandlung der Zellkulturen

Es wurden folgende Konzentrationen von Decitabin bzw. Azacitidin als Stammlösung vor der jeweiligen Behandlung aus einer 10 mM Lösung in DMSO hergestellt: 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM, 5000 nM, 10000 nM. Diese vollständige Konzentrationsreihe wurde für die Vitalitätsmessung verwendet; für weitergehende Versuche wurden folgende Konzentrationen verwendet: 0 nM, 10 nM, 500 nM, 5000 nM.

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl Methyleneblau gemischt und jeweils 10 µl auf jede Kammer aufgetragen. Es wurden jeweils 4 Quadranten ausgezählt und auf die Anzahl der Zellen pro ml hochgerechnet.

Klonogenitäts-Assay

Aus Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation im Grundexperiment (s.o.), wonach die unbehandelten Zellen konfluent waren, wurden jeweils 1:100 und 1:400 Verdünnungen in 10 cm Petrischalen mit Standardmedium ohne weitere Inhibitorbehandlung ausgesät. Die Schalen wurden so lange kultiviert bis in der Kontrolle eine fast vollständige Konfluenz erreicht war; je nach Zelllinie dauerte dies 10 - 14 Tage.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen, abgesaugt, mit einer Mischung aus 1:1 PBS und Methanol gewaschen und anschließend 10 min mit Methanol fixiert. Danach wurden die Zellen mittels Giemsa-Lösung gefärbt um die Klone zu erkennen und fotografisch zu dokumentieren.

Soft-Agar-Assay

Für den Soft-Agar Assay wurde zunächst ein 1,2% Noble Agar (Difco 214220) mit destilliertem Wasser autoklaviert und ein 2 x DMEM hergestellt, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Tabelle 1.11 Soft-Agar Zusammensetzung

Volumen	Komponente	Endkonzentration
10 ml	FCS	20%
10 ml	10 x DMEM	2x
1 ml	100 x L-Glutamin	2x
1 ml	100 Penicillin/ Streptomycin	2x
5 ml	20 x NaHCO ₃	2x
23 ml	ddH ₂ O	1x

Dieses Medium wurde durch einen Filter (0,2 µm) steril filtriert. Damit wurde zunächst ein Bottom-Layer (0,6% Agar) erstellt, auf den der Top Layer (0,4% Agar) mit den jeweils behandelten Zellen pipettiert wurde. Zur Herstellung des Bottom-Layers wurden 1,2% frisch aufgeteilt und auf 40°C abgekühlter Agar und 2 x DMEM im Verhältnis 1:1 vermischt und jeweils 1,5 ml / Well in einer 6-Well-Platte verteilt. Diese Platten wurden zunächst über Nacht bei 4 °C gelagert. Für den Top-Layer wurde 1,2%iger Agar in einer Mikrowelle erwärmt und in einem Wasserbad auf 40°C warmgehalten. Auch das 2 x DMEM wurde auf 40°C erwärmt. Im Top-Layer sollte sich jeweils eine Zellzahl von 100.000 Zellen pro Milliliter befinden, welche durch eine Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt wurden. Anschließend wurden 1,2 ml 1,2%iger Agar und 1,2 ml 2x DMEM vorgelegt, 1,2 ml Zellsuspension (in 1x DMEM mit 10% FCS) hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Von dieser Mischung wurden je 1,5 ml vorsichtig auf den Bottom-Layer pipettiert.

Transfektion von siRNA

Für die Transfektionsexperimente mit siRNA wurden 6-Well-Platten benutzt. In jedes Well wurden 100.000 Zellen gegeben und über 24 h im Brutschrank inkubiert. Die DNMT1 siRNA wurde danach mit Lipofectamine RNAiMAX nach Hersteller-Angaben transfiziert. Zur Kontrolle diente Control siRNA-A von Santa Cruz (sc-37007). Im Einzelnen wurde für jede Zelllinie jeweils Triplikate angefertigt, diese über 48 h bei Standardbedingungen inkubiert und dann für weitere Versuche verwendet.

MTT-Assay

Die Messung wurde in der Regel nach dem Schema des Grundexperiments durchgeführt; insgesamt wurden 6 UCC 72 h lang behandelt, wobei alle 24 h die Behandlung erneuert wurde. Bei den Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und 5637 wurde in einem zusätzlichen Experiment eine einmalige Behandlung nach 24 h durchgeführt und die Vitalität ebenfalls nach 72 h gemessen.

Dazu wurden die Zellen in 96-Well-Platten so ausgesät, dass sie in der Kontrolle nach 72 h konfluent waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde jedem Well 10 µl MTT Stocklösung hinzugefügt und 60 min im Brutschrank inkubiert. Danach durch rasches Invertieren der Platte das Medium abgegossen, 50 µl DMSO hinzugefügt und die Platte für 10 min auf einen Rüttler gestellt, bis sich eine homogene Farbsuspension ergab. Die Messung erfolgte dann im Fluostar Optima Elisa-Reader, Test 1, bei einer Wellenlänge von 570 nm gegenüber einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Von den gemessenen Werten wurde ein Leerwert aus Wells mit ausschließlich Medium abgezogen. Für jede Zelllinie wurde der Kontrollwert (Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle) als 100% Vitalität gesetzt.

CellTiter-Glo-Assay

Der CellTiter-Glo Assay bestimmt indirekt über die Messung des ATP Gehalts mittels Luciferase die proportionale Anzahl metabolisch aktiver Zellen, ähnlich dem MTT-Assay. Hierzu wurden die Zellen

geeignet verdünnt in 6-Well-Schalen ausgesät und 3 Tage lang mit Decitabin oder Azacitidin behandelt, danach 2 weitere inkubiert. Nach 5 Tagen war die DMSO Kontrolle konfluent. Die Durchführung des CellTiter-Glo Assays erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Lumineszenz am Victor Counter gemessen (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

2.5 Molekularbiologische Methoden

DNA-Isolierung

Die DNA der behandelten Zellen wurde mittels QIAmp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA wurde mittels Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm oder 260/280 nm und 230/260 nm gemessen.

Bisulfitumwandlung von genomischer DNA

Die genomische DNA wurde nach Herstellerangaben mittels EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research) mit Natriumbisulfit behandelt, wobei alle unmethylierten Cytosine zu Uracil umgewandelt werden.

Pyrosequenzierung

Der Grad der Methylierung an CpG-Stellen wurde quantitativ durch Pyrosequenzierung an einem Biotage PyroMark Q24 bestimmt. Hierzu wurden PyroMark Gold Q24 Reagenzien von Qiagen benutzt, die Datenauswertung erfolgte mit PyroMark Q24 2.0 Software.

Um die zu sequenzierenden Produkte herzustellen, wurde bisulfit-konvertierte DNA mittels PCR wie folgt vervielfältigt: Jede 50 µl PCR-Reaktion beinhaltet 1x Coraload Concentrate (mit 1.5 mM MgCl₂), 10 µmol dNTPs, 20 pmol von jedem Primer (jeweils einer davon biotinyliert), 4 U HotStarTaq DNA Polymerase und 2.5 µl bisulfit-konvertierte DNA. Die Durchführung der PCR beinhaltet eine initiale Denaturierung bei 95°C für 15 min, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei Temperatur von 72°C für eine Dauer von 30 s, Extension bei 72°C für 30 s, sowie eine abschließende Extension bei 72°C für 10 min. Die erfolgreiche PCR wurde durch Elektrophorese von Aliquots in einem 2% AgaroseGel bestätigt und die Produkte für die weitere Pyrosequenzierung verwendet.

Dazu wurden 20-30 µl der biotinylierten PCR Produkte auf einem Rüttler in einer 96-Well-Platte an 2 µl streptavidin sepharose beads (Amersham Biosciences) in 40 µl binding buffer 15 min lang gebunden. Die DNA-gebundenen Beads wurden an der PyroMark Q24 Vacuum Workstation aspiriert, in 70% Ethanol gewaschen, denaturiert in 0.2 M NaOH und in washing buffer (Qiagen) neutralisiert. Die Beads mit der gebundenen DNA wurden in eine 24-Well pyrosequencing plate (Qiagen) transferiert, welche pro Well 0.33 mM sequencing primer in 25 µl annealing buffer (Qiagen) enthielt. Der Mix wurde bei 80°C for 2 min denaturiert und anschließend 15 min abkühlen gelassen. Die

Reagent cartridge wurde nach den Angaben der Software mit Substraten, Enzymen und dNTPs vorbereitet. Daraufhin erfolgte mit dieser Platte die Pyrosequenzierung im PyroMark24-Gerät.

Ein Teil dieser Experimente wurde von Christiane Hader und Dr. Wolfgang Göring ausgeführt.

RNA-Isolierung:

Die RNA der jeweils kultivierten Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit nach Anleitung extrahiert. Für die abschließende Elution wurde 60 µl RNase-freies Wasser verwendet. Die Konzentration an RNA wurde anschließend spektrophotometrisch mit dem Nanodrop-Gerät gemessen.

Anschließend wurden je 0,5 µg der gewonnenen RNA mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) zu cDNA umgewandelt.

Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurden an einem ABI Prism 7500fast-Gerät durchgeführt. Jede Probe wurde als Duplikat angelegt und beinhaltete 2 µl cDNA (1:10 verdünnt), 12,5 µl SyBrGreen PCR Kit (Qiagen), 10,3 µl H₂O und jeweils 0,1 µl (entsprechend 10 pMol) Forward- und Reverse-Primer. Die PCR durchlief in der Regel folgende Bedingungen: eine Aktivierung der Polymerase für 15 min bei 95°C, danach 44 Zyklen mit jeweils 15 s Denaturierung der DNA bei 95°C, gefolgt von einem Annealing der Primer für 20 s bei 56°C und einer Elongation von 30 s bei 72°C, finale Extension 10 min bei 72°C. Abweichungen von dieser Prozedur werden jeweils bei den Experimenten explizit erwähnt

Am Ende der PCR folgt eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die DNA durch kontinuierliche, langsame Temperaturerhöhung von 50° auf 95°C aufgeschmolzen wurde. Die Doppelstrangstruktur der jeweiligen DNA-Fragmente denaturiert hierbei bei einer für sie spezifischen Schmelztemperatur.

Für jedes Gen wurde in jeder Messung eine Standardkurve zur Qualitätskontrolle und relativen Quantifizierung mitgeführt. Als Standard wurde in der Regel eine cDNA aus einer Zelllinie mit maximaler Expression verwendet. Die mRNA-Expression des Zielgens wurde zudem auf die Expression des Referenz-Gens TATA-Box-Bindendes Protein (TBP) angepasst, das aus der gleichen cDNA-Probe gemessen wurde. Die aus der Standardkurve ermittelte Expression des Zielgens wurde durch die des Referenzgens geteilt, um eine relative Expression zu bestimmen.

Protein-Isolierung und Western-Blot

Die UC-Zelllinien wurden dazu nach der Standardmethode in 6 cm Schalen kultiviert und je nach Experiment behandelt.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde pro Schale 100 µl RIPA Puffer inklusive 0,1 µl Protease-Inhibitor- und 10 µl Phosphatase-Inhibitoren-Cocktail zugegeben und geschwenkt. Das Lysat wurde mit einem Schaber

zusammengeschoben, 30 min auf Eis gekühlt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 3-mal gevortext. Danach wurde 5 min bei 12.000 g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Konzentration mittels Pierce BCA Assay nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die Analyse der Proteine wurden jeweils 15 µg Protein mit RIPA Puffer und Lämmli-puffer gemischt und 5 min bei 95°C zentrifugiert. 10 µl prestained Protein Ladder (Fermentas) diente als Größenstandard.

Die Elektrophorese erfolgte in einem 8% SDS-Polyacrylamid-Gel, das aus einem Sammel- und Trenngel bestand. Die elektrische Auftrennung erfolgte über eine Dauer von 15 min bei 100 V und anschließend 115 min bei 200 V in einer Kammer des Herstellers BioRad.

Durch Elektrotransfer wurden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinyliden-fluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Das anschließende Blotten erfolgte in Blotting-Puffer bei 180 mA für 95 min auf Eis. In 5% BSA Lösung wurden 1 h lang unspezifische Bindungsstellen blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Primärantikörper sind in Tabelle 1.8 aufgelistet. Es wurden jeweils 10 µg Proteinlysate aufgetragen. Die Verdünnungen für die Antikörper betragen: DNMT1 1:1000 in 5% BSA, g-a-r in 5% BSA, entwickelt mit dem Femto-Kit. α -Tubulin 1:100000 in 1% MP, goat-anti-rabbit 1:50000 in 1% MP, entwickelt mit dem Quantum-Kit.

Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 mal 10 min lang mit TBST gewaschen. Danach wurden die Membranen 1 h lang mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (HRP) inkubiert. Daraufhin erfolgte wiederum ein dreifacher Waschvorgang für jeweils 10 min.

Um die Antikörperbindung über die Aktivität des HRP zu visualisieren wurde das Quantum- und Femto-Kit verwendet. Die Blots wurde luftblasenfrei in Folie verpackt und gegen geeignete Chemolumineszenzfilme (Amersham Bioscience) in der Dunkelkammer exponiert. Die Belichtungszeit variierte je nach Stärke des Signals zwischen 3 s und 15 min. Um zu kontrollieren, ob in allen Spuren die gleiche Menge an Protein aufgetragen war, wurde α -Tubulin auf den gleichen Blots dargestellt.

2.6 Programme und Statistik

Zur Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel 2016 verwendet. Der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) wurde jeweils aus einer unterschiedlichen Anzahl von Experimenten berechnet, die Anzahl ist jeweils unter den Grafiken genannt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der T-Test herangezogen, Signifikanzniveau: $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf die Zellvitalität im 3-Tage-Versuch

Sechs Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) wurden so ausgewählt, dass sie möglichst unterschiedliche Phänotypen aufwiesen, um die Heterogenität des UC abzudecken. Insgesamt wurden diese Zelllinien jeweils 72 h lang behandelt. Im Grundexperiment wurde alle 24 h die Behandlung erneuert, indem frisches Medium mit den jeweiligen Inhibitoren zugegeben wurde. Die verwendeten Konzentrationen von Azacitidin und Decitabin waren jeweils 0 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM, 5000 nM und 10000 nM. Die Auswirkungen der beiden Substanzen auf die Zellvitalität wurden über einen MTT-Assay erfasst, der die relative Vitalität der behandelten Zellen über ihre metabolische Aktivität misst. Bei den Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und 5637 wurde zusätzlich eine einmalige Behandlung mit Decitabin nach 24 h durchgeführt und die Vitalität nach 72 h gemessen. Die Ergebnisse werden im Folgenden für die beiden Substanzen nacheinander dargestellt.

Mittels Decitabin konnte bei keiner Zelllinie eine Reduktion der Zellvitalität um mehr als 40-50% festgestellt werden. Im Einzelnen wiesen die UCC einige Unterschiede auf.

UM-UC-3, VM-CUB-1 und 5637 verhielten sich nach einer 72 h-Decitabin-Behandlung sehr ähnlich. Insgesamt wurde bei 5637 durch 10 000 nM Decitabin eine maximale Zytotoxizität von 28% erzielt. Bei der Zelllinie UM-UC-3 war die Vitalität um bis zu 30% vermindert; diese Hemmung war bei 1000 nM nahezu maximal und veränderte sich auch bei höheren Konzentrationen nicht mehr; der Messpunkt bei 10 nM war nicht signifikant beeinflusst. Die Messreihe bei VM-CUB-1 zeigte ebenfalls einen maximalen Abfall auf 75% Zellvitalität, im Gesamten nicht signifikant (Abb. 6).

Die UCC RT-112 und 639-V zeigten ähnliche Veränderungen der Zellvitalität nach einer 72 h-Decitabin-Behandlung. Nach einer Dosis von 500 nM erhielten beide Zelllinien eine relative Vitalität von 75% bzw. 70%, die weiter auf 63% und 60% nach der Maximal-Dosis fiel. T-24 war nach 72 h-Decitabin-Behandlung am sensibelsten; hier wurde bei 10 und 100 nM bereits eine Reduktion auf 75% beobachtet, diese Werte waren noch nicht signifikant. Bei einer Dosis von 10 000 nM sank die Vitalität signifikant auf 44% (Abb. 7).

Nach einer nur einmaligen 24 h-Decitabin-Behandlung ergab sich bei 10 nM bei allen getesteten Zelllinien ein Abfall der Vitalität, jedoch war dieser nicht signifikant. UM-UC-3 und 5637 verhielten sich weiter ähnlich; es ergab sich ein leichter Abfall der relativen Zellvitalität auf 75% bei 500 nM und auf 70% bei der höchsten Dosis. Bei VM-CUB-1 ließ sich eine Zellvitalitätserhöhung bei 50 nM und 100 nM beobachten und insgesamt keine einheitliche Veränderung im Wachstum; so erreichten die Zellen bei 10 000 nM eine Vitalität von 99%; alle Veränderungen waren nicht signifikant, anders als bei 5637 und UM-UC-3 (Abb. 8).

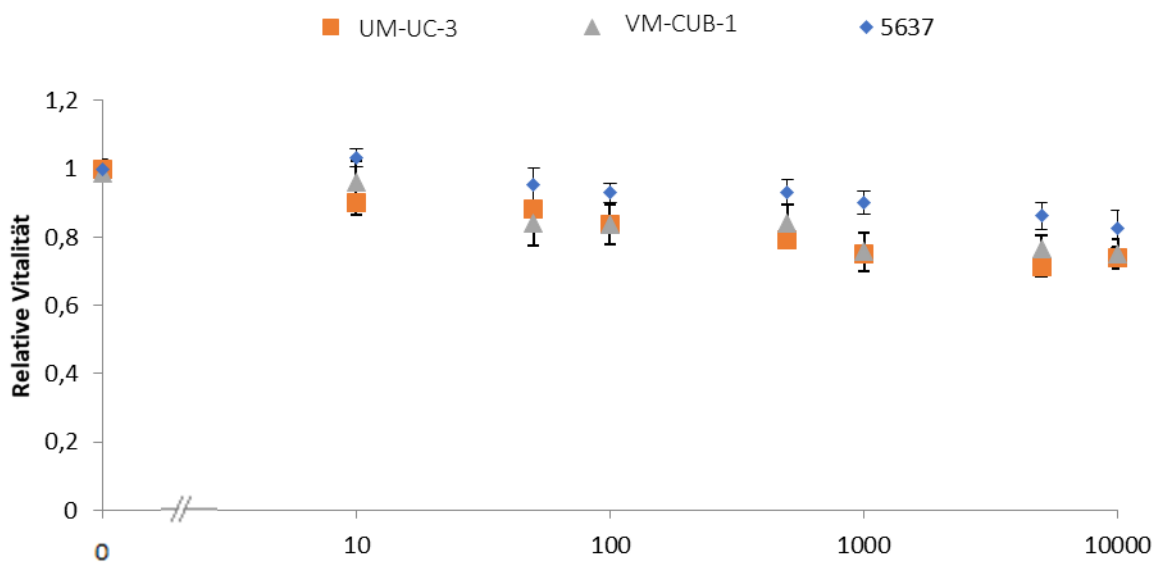


Abb. 6: MTT-Assay nach einmaliger 72 h Decitabin-Behandlung der UCC UM-UC-3, VM-CUB-1 und 5637. MW \pm SEM von jeweils 3 unabhängigen Versuchen (Quadruplikate in jedem Einzelversuch)

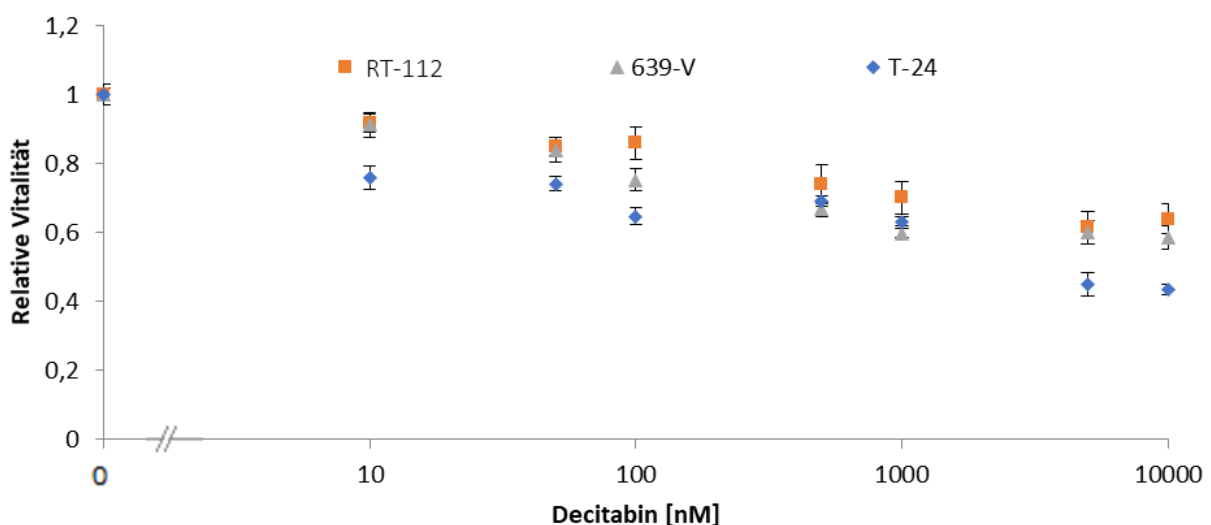


Abb. 7 MTT-Assay nach 72h-Decitabin-Behandlung der UCC RT-112, 639-V und T-24. MW \pm SEM nach jeweils 4, 3 bzw. 1 unabhängigen Versuchen (Quadruplikate in jedem Einzelversuch)

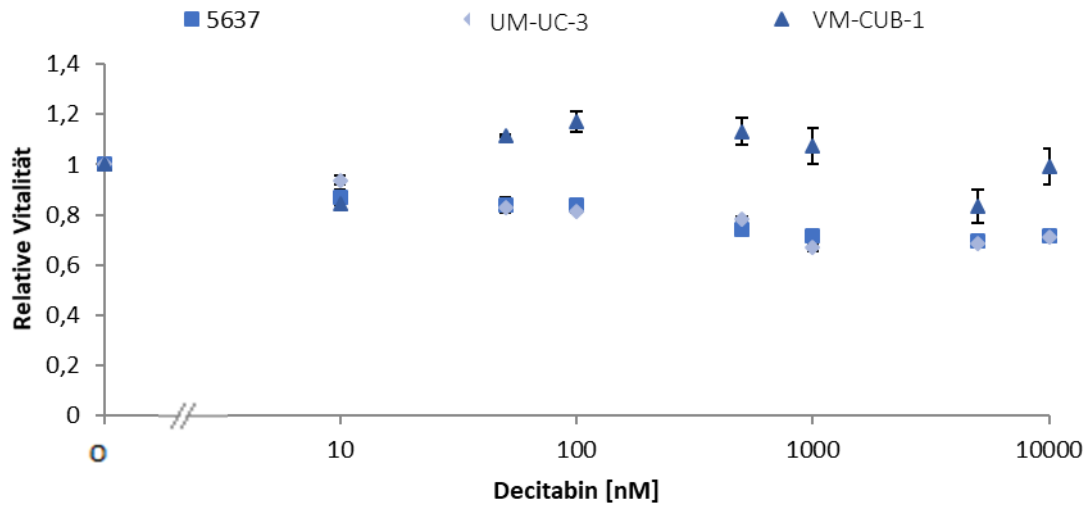


Abb. 8 MTT-Assay nach einmaliger 24 h Decitabin-Behandlung der UCC UM-UC-3, VM-CUB-1 und 5637; MW \pm SEM nach jeweils einem unabhängigen Versuch (Quadruplikate in jedem Einzelversuch)

Im Gegensatz zu der Behandlung mit Decitabin nahm die Zellvitalität bei vielen UC-Zelllinien bei hohen Azacitidin-Konzentrationen deutlich ab. Bei VM-CUB-1 sank die Vitalität ab einer Konzentration von 100 nM Azacitidin von 85% auf 2% bei der maximalen Dosis (Abb. 9). Die Vitalität von UM-UC-3-Zellen nahm nach dem Einsatz von Azacitidin bis zu einer Dosis von 500 nM auf 75% ab und bei höherer Dosis auf bis zu 3 % (Abb. 10). Bei der Zelllinie 5637 hatte eine Azacitidin-Behandlung mit niedrigen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität. Erst ab einer Dosis von 1000 nM sank die Vitalität von 85% auf 30% (Abb. 11). RT-112 hingegen war relativ resistent, hier verringerte sich bei 1000 nM die Vitalität auf 91%. Unter maximaler Dosis wurde ein Hemmeffekt von 52% ermittelt (Abb. 12). Eine geringe Dosis von 10 nM erhöhte bei 639-V sogar die Vitalität, die jedoch bei höheren Dosen kontinuierlich auf fast 0% bei 5000 nM abnahm (Abb. 13). Bei T-24 nahm die Vitalität ab einer Dosis von 1000 nM stark ab und sank auf 17% (Abb. 14).

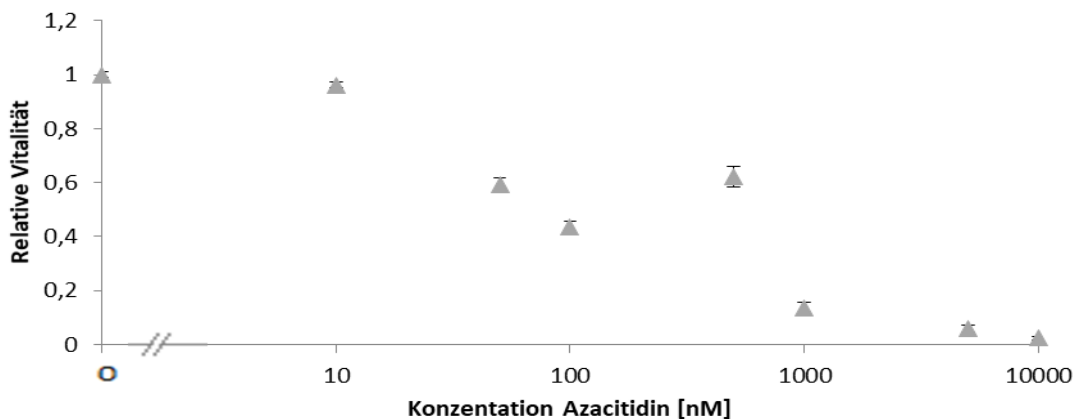


Abb. 9: MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC VM-CUB-1; MW \pm SEM (72 h) nach zwei unabhängigen Versuchen (Quadruplikate in jedem Einzelversuch)

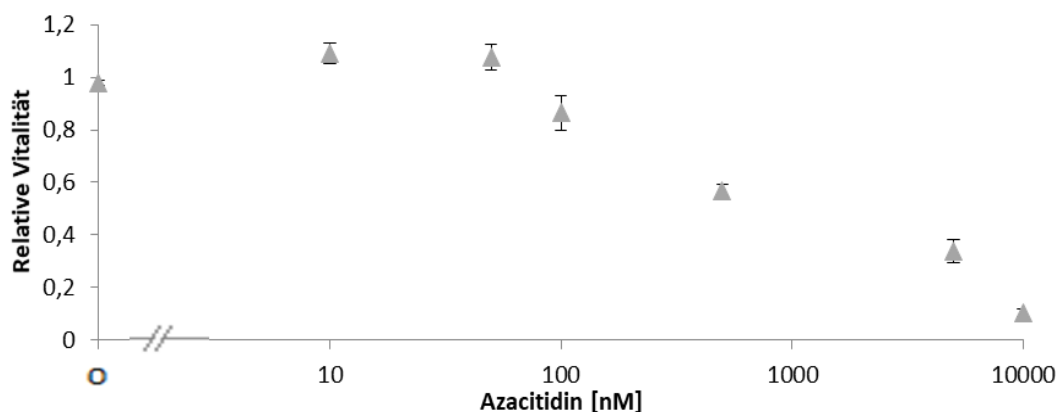


Abb. 10: MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC UM-UC-3; MW \pm SEM (72 h) nach einem Versuch (Quadruplikate)

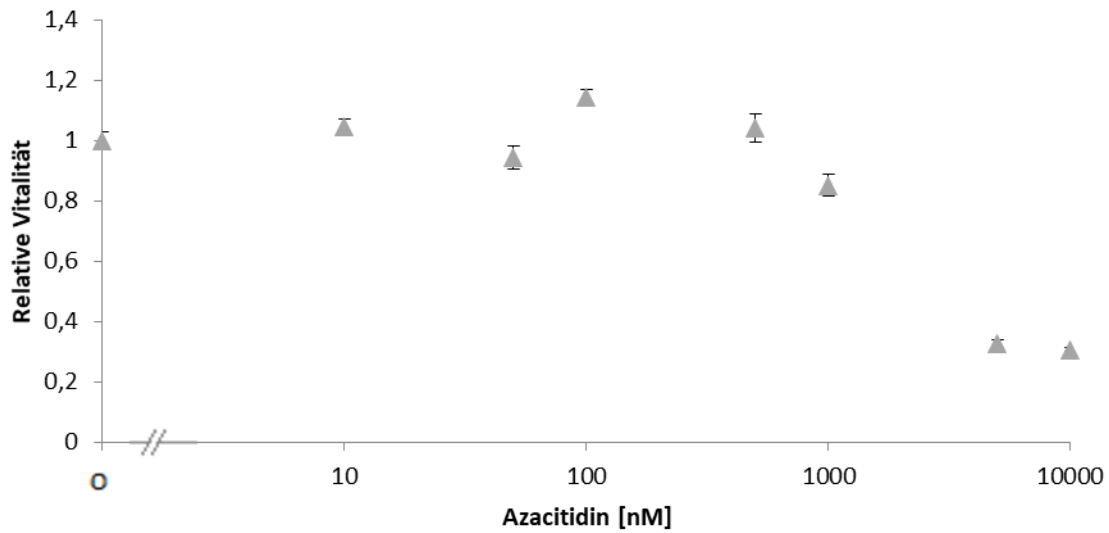


Abb. 11 MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC 5637; MW \pm SEM (72 h) nach einem Versuch (Quadruplikate)

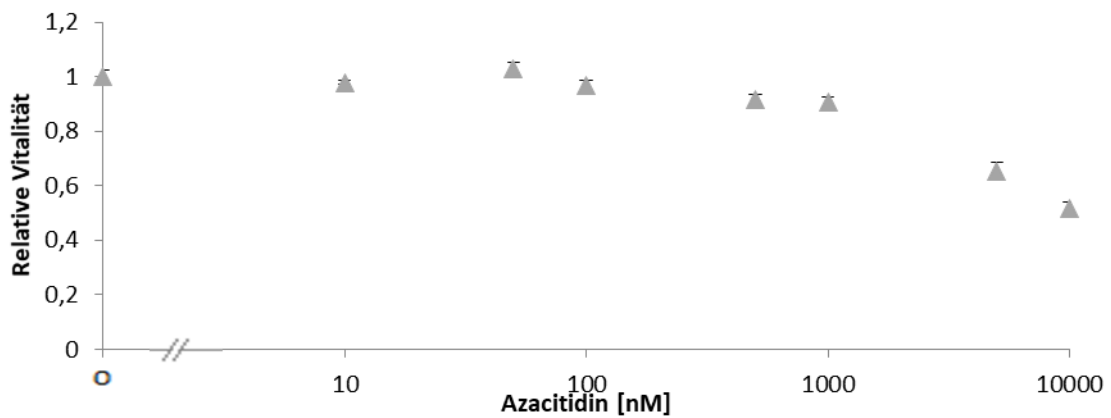


Abb. 12: MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC RT-112; MW \pm SEM (72 h) nach einem Versuch (Quadruplikate)

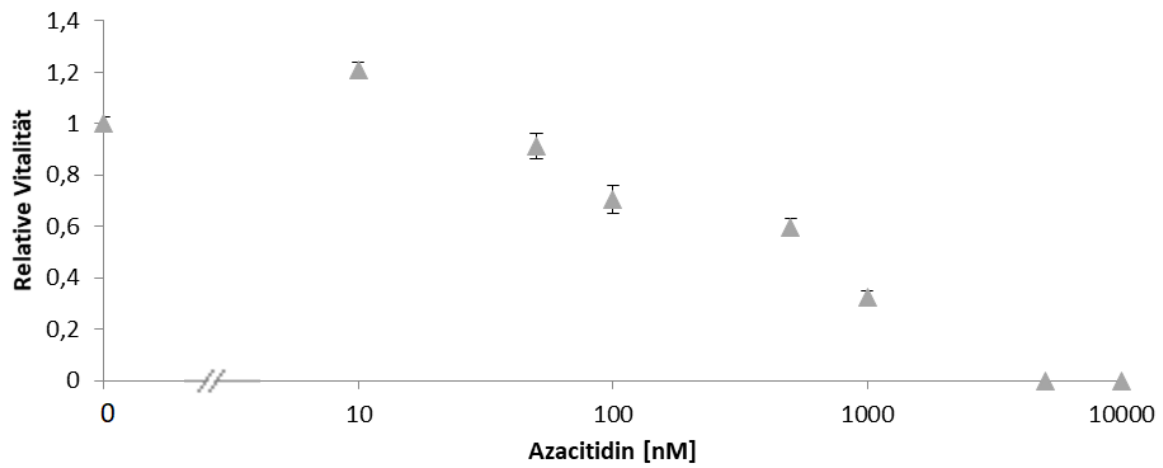


Abb. 13: MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC 639-V; MW \pm SEM (72 h) nach zwei unabhängigen Versuchen (Quadruplikate in jedem Einzelversuch)

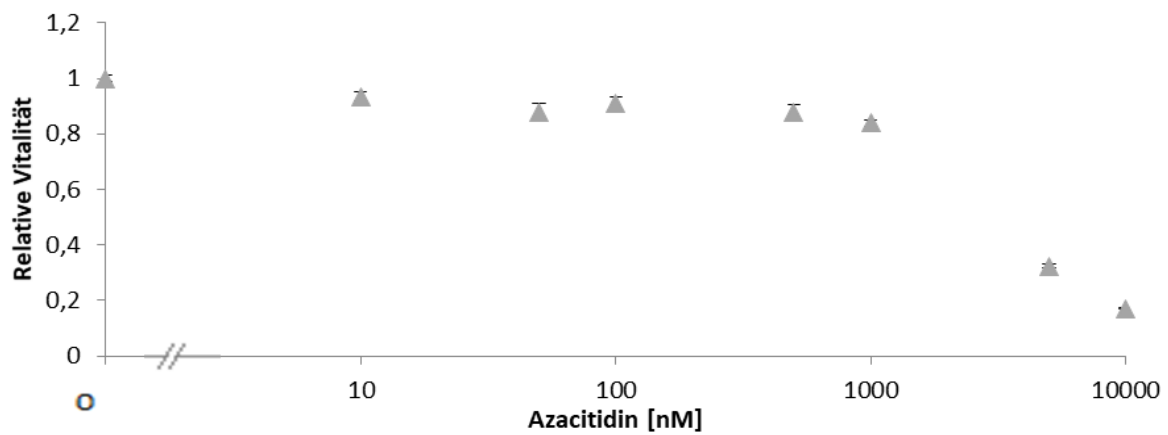


Abb. 14: MTT-Assay nach 72 h Azacitidin-Behandlung der UCC T-24; MW \pm SEM (72 h) nach einem Versuch (Quadruplikate)

Cell Titer Glo nach 120 h

Im MTT-Assay hatte eine 72-stündige zytostatische Behandlung mit Decitabin nur einen mäßigen Effekt auf die Zellvitalität. Daher stellte sich die Frage, ob ein Effekt auf die Vitalität erst nach längerer Behandlung auftritt. Aus diesem Grund wurde für zwei Zelllinien, VM-CUB1 und UM-UC-3, ein Zellvitalitäts-Assay nach einer 120 h-Behandlung angefertigt. Aus praktischen Gründen wurde dabei die Vitalität mittels Celltiter-Glo getestet. Dieser Test misst wie der MTT-Test die Vitalität über einen metabolischen Parameter, in diesem Falle totales zelluläres ATP. Hierbei wurden bei einer Konzentration von 500 nM Decitabin nur noch 25% beziehungsweise 35% Vitalität gemessen. Bei VM-CUB-1 wurde bei 10 nM eine Induktion festgestellt, was jedoch auch auf einen technischen Fehler zurückzuführen sein könnte. Dieser Versuch wurde einmalig durchgeführt, weshalb eine weitere Beurteilung hier schwer möglich ist (Abb.15).

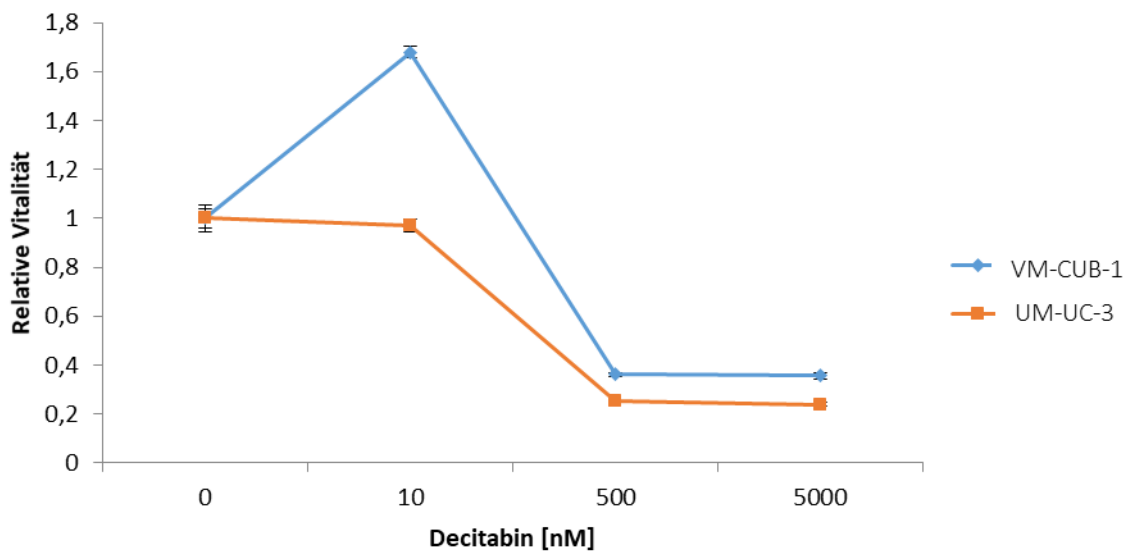


Abb. 15: Cell Titer-Glo Assay nach 72 h Decitabin-Behandlung der UCC VM-CUB-1 und UM-UC-3; MW \pm SEM (120 h) nach einem Versuch (Quadruplikate)

3.2 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf molekulare Parameter

3.2.1 Genexpressionsveränderungen

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde untersucht, inwiefern die Behandlung mit den beiden Medikamenten die Genexpression beeinflusst. Dazu wurden verschiedene Gene als Indikatoren ausgewählt. *CTCF* und *MAGE-A3* sind Cancer-Testis-Antigene und werden stark durch die DNA-Methylierung kontrolliert [21]. Daher sollte ihre Expression in Folge der DNA-Demethylierung ansteigen. Das *MX-1* Gen diente als Indikator für die Interferon-I Antwort [60]. *LINE-1* sind häufige Retroelemente, die ebenfalls durch DNA-Methylierung kontrolliert werden. Der verwendete „5' Assay“ erfasst die Transkripte von etwa 400 L1s Elementen, darunter die etwa 100 potentiell aktiven Retrotransposone [61]. Das *CDKN1A* Gen kodiert für den Zellzyklus-Inhibitor p21 und reagiert sensitiv auf viele epigenetische Hemmstoffe, besonders HDAC-Inhibitoren [62].

Untersucht wurden wiederum die Urothelkarzinomzelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1, T-24, RT-112, 639-V, und 5637. Die Expression von *MAGE-A3*, *LINE-5*, *MX-1* und *CTCF* wurde nach einer 72-stündigen Behandlung der Tumorzelllinien gemessen. Die Applikation der Substanzen Decitabin oder Azacitidin wurde wiederum alle 24 h erneuert, jedoch wurden nur drei Konzentrationen (10 nM, 500 nM, 5000 nM) getestet, um den Versuch handhabbar zu gestalten. Nach 72 h wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Messung der Genexpression wurden quantitative real time PCRs mit einem ABI 7500 angefertigt. Für jedes Gen und jede Probe wurde der *Cycling-Threshold (Ct)* zur Quantifizierung ermittelt. Als Referenz-Gen wurde das TATA-Box-Binding-Protein (*TBP*) genutzt. Die Daten geben das Verhältnis der Expression des untersuchten Gens und des Referenz-Gens wieder. Die Ergebnisse werden zunächst für Decitabin und danach für Azacitidin dargestellt.

Zur Berechnung der Standards von *CTCF* wurde 639-V verwendet. Die unbehandelte Kontroll-Probe wurde als Standard auf den relativen Wert 1 gesetzt. Hierdurch ergeben sich andere Grundwerte als in den Versuchen mit Azacitidin.

Die Expression von *CTCF* verhielt sich nach Decitabin-Behandlung von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich. Eine Induktion konnte vor allem bei UM-UC-3 und RT-112 beobachtet werden. Bei den übrigen Zelllinien ließ sich die Expression weder inhibieren noch stark induzieren (Abb. 16).

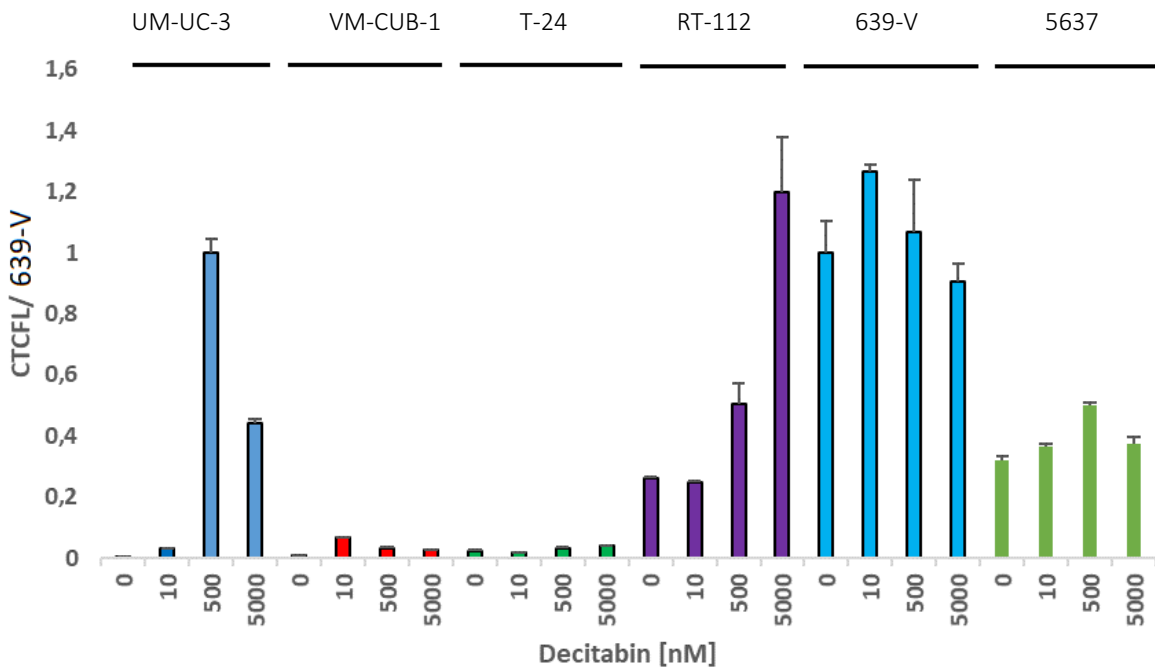


Abb. 16: qPCR-Bestimmung der Expression des CTCFL-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Decitabin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

MX-1 konnte bei VM-CUB-1 – von einem hohen Niveau ausgehend - und bei RT-112 durch Decitabin induziert werden. Die anderen Zelllinien verhielten sich sehr variabel in der Genexpression und es erfolgte keine deutliche Veränderung (Abb. 17).

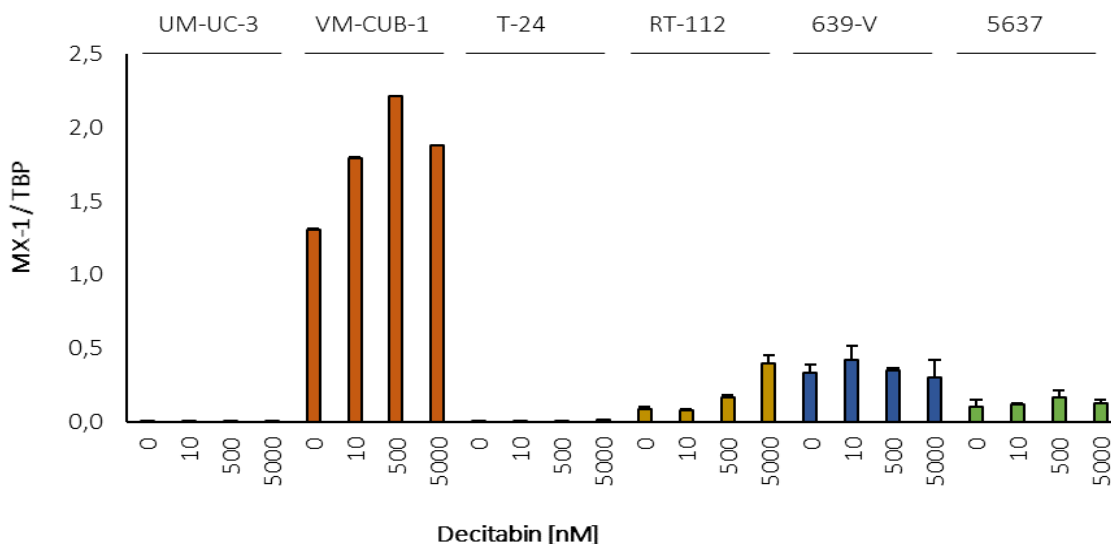


Abb. 17: qPCR -Bestimmung der Expression des MX-1-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Decitabin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

In unbehandelten Zellen konnte *MAGE-A3* hauptsächlich in UM-UC-3, T-24 und schwächer in VM-CUB-1 nachgewiesen werden. In diesen Zelllinien konnte teils durch eine Behandlung mit 500 nM die Expression weiter gesteigert werden. Bei noch höherer Konzentration von Decitabin blieb die Expression von *MAGE-A3* gleich (UM-UC-3) oder nahm sogar ab, wie bei T-24 und VM-CUB-1. Bei RT-112, 639-V und 5637 wurde durch eine Decitabin Behandlung eine *MAGE-A3* Expression induziert, die bei RT-112 und 5637 unter der maximalen Dosis jedoch wieder abnahm (Abb. 18).

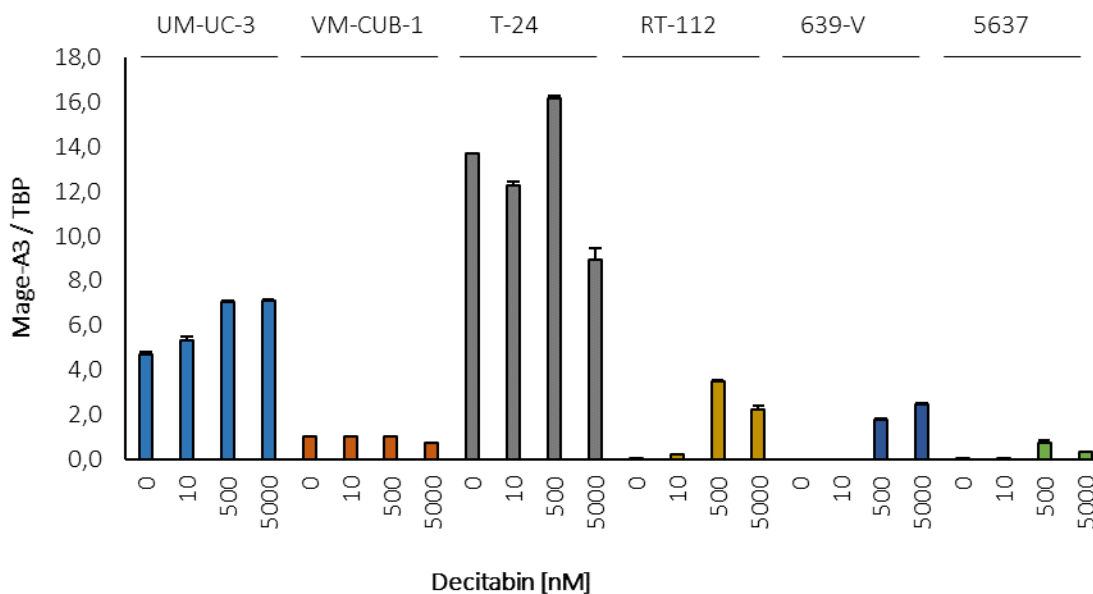


Abb. 18: qPCR -Bestimmung der Expression des *MAGE-A3*-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Decitabin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

Die Expression von LINE-1 Transkripten konnte mit dem 5'-Assay in allen unbehandelten Zellen nachgewiesen werden, die absolut stärkste Expression zeigte VM-CUB-1, wie von Kreimer *et al.* beschrieben [63]. Die Expression unter einer Decitabin-Behandlung zeigte sich von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich. UM-UC-3 und 639-V verhielten sich ähnlich, indem sich die Expression kaum änderte und nur unter 500 nM Decitabin abnahm. RT-112, T-24 und 5637 wiesen nach Decitabin-Behandlung zunächst eine höhere Expression von LINE-5 auf, diese nahm unter maximaler Dosis ab (Abb. 19).

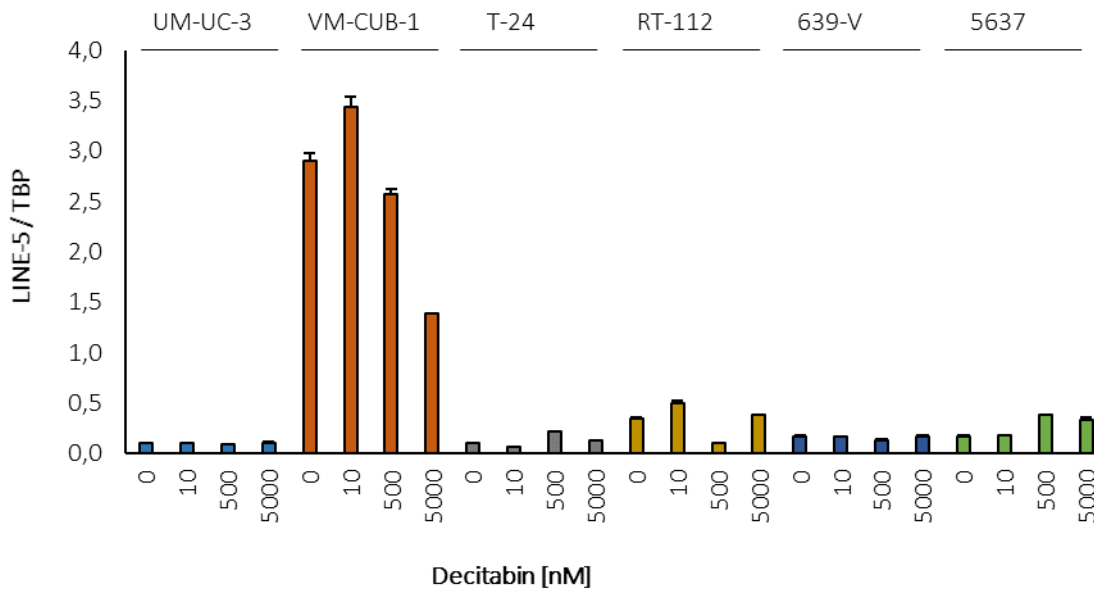


Abb. 19: qPCR-Bestimmung der Expression von LINE-1-Transkripten mit dem 5'-Assay von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Decitabin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

Bei Behandlung von UCC mit Decitabin konnte vor allem bei UM-UC-3 eine konzentrationsabhängige Induktion von *p21* (*CDKN1A*) auf das Doppelte der Kontrollprobe nachgewiesen werden, ähnlich bei 639-V von einem geringerem Ausgangsniveau. Bei VM-CUB-1 nahm die Expression bei höheren Decitabin-Konzentrationen leicht ab.

RT-112, T-24 und 5637 verhielten sich inhomogen in der Expression von *p21*, hier konnte keine Tendenz in Richtung Induktion oder Repression nachgewiesen werden (Abb. 20).

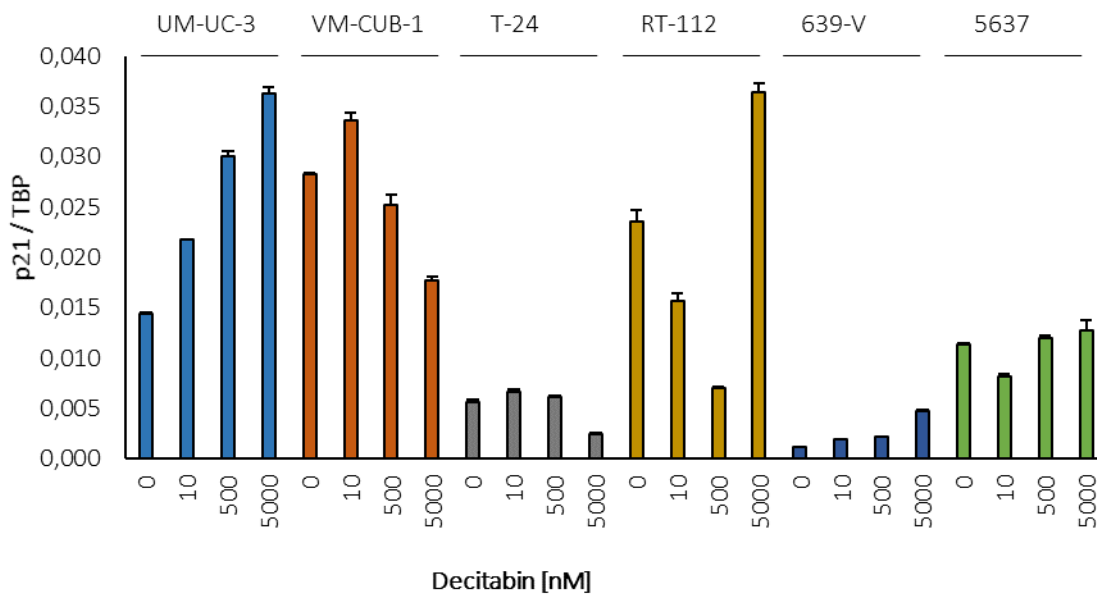


Abb. 20: qPCR-Bestimmung der Expression des *CDKN1A/p21*-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Decitabin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

Durch eine Behandlung mit hohen Konzentrationen von Azacitidin konnte in allen Zelllinien eine verstärkte *CTCFL* Expression beobachtet werden. Bei UM-UC-3 konnte eine Induktion bis hin zum 400-Fachen der Kontrolle erzielt werden. Bei VM-CUB-1 und T-24 wurde in den Kontroll-Proben zunächst kein *CTCFL* exprimiert, erst mit einer Behandlung von 5000 nM bzw. 5 μ M Azacitidin konnte eine Expression des Gens nachgewiesen werden. Bei den Zelllinien RT-112, 639-V und 5637 lag die jeweilige Expression bei niedrigen Konzentrationen an der Nachweisgrenze, wurde jedoch durch eine Behandlung mit 5 μ M Azacitidin detektierbar (Abb. 21).

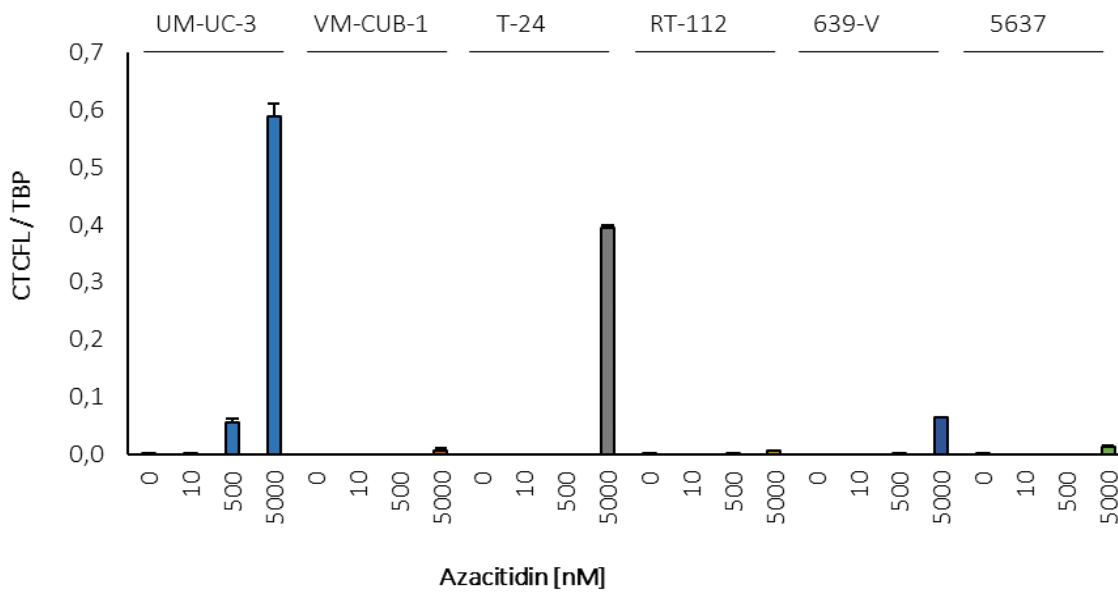


Abb. 21: qPCR-Bestimmung der Expression des *MX-1*-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Azacitidin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

Die Expression von *MX-1* variiert von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich. UM-UC-3 exprimiert sehr wenig, die Expression stieg durch Behandlung leicht an und fiel dann wieder ab. Bei T-24 konnte die stärkste Induktion um das 2,4-fache beobachtet werden. Bei den anderen Zelllinien zeigte sich keine eindeutige Tendenz (Abb. 22).

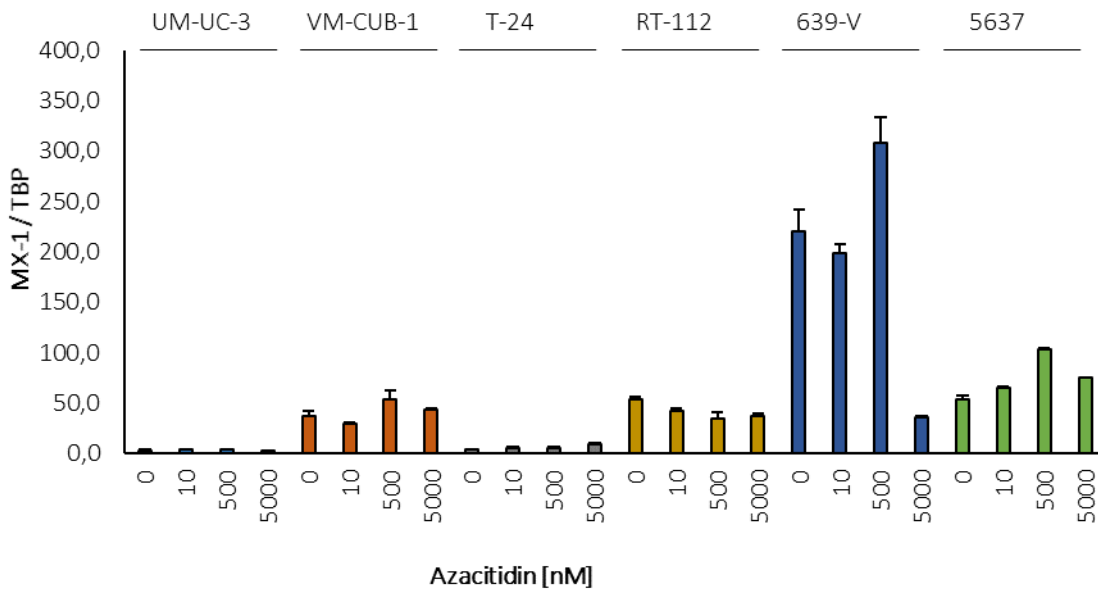


Abb. 22: qPCR-Bestimmung der Expression des *MX-1*-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Azacitidin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

MAGE-A3 wurde nur in den Zellen UM-UC-3, VM-CUB-1 und T24 exprimiert. Nach Azacitidin-Behandlung in hohen Dosen wurde *MAGE-A3* auch in RT-112, 639-V und 5637 nachweisbar. Bei VM-CUB-1 verringert sich unter Azacitidin-Behandlung die Expression von *MAGE-A3* (Abb. 23).

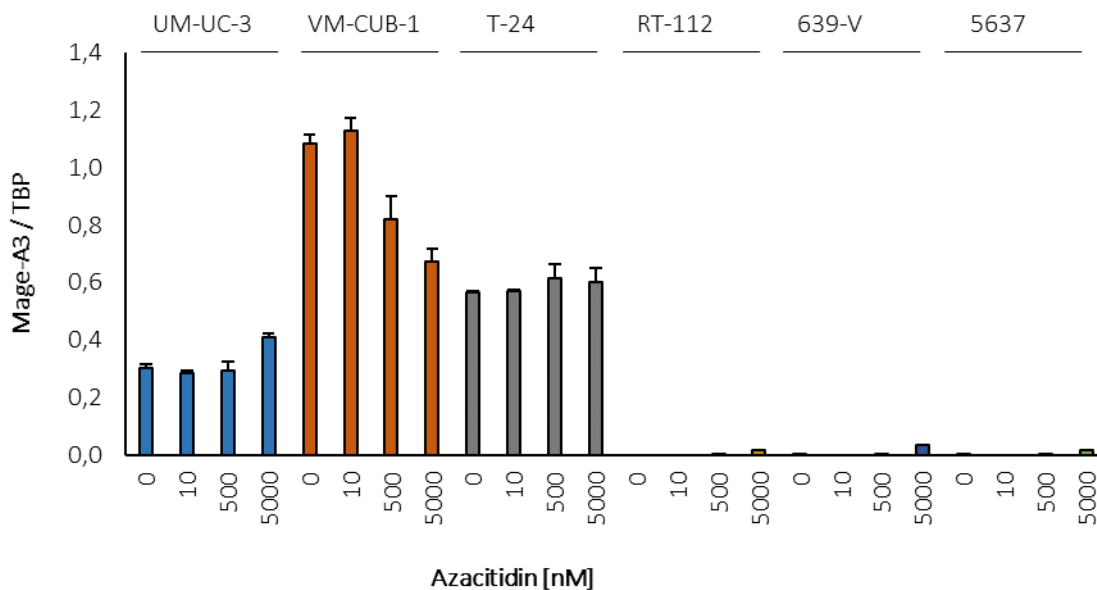


Abb. 23: qPCR-Bestimmung der Expression des *MAGE-A3*-Gens von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Azacitidin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

Die absolut stärkste Expression von LINE-1 zeigten wiederum die VM-CUB-1-Zellen. In allen anderen Zelllinien wurde die relative Expression durch eine Azacitidin Behandlung bei hohen Konzentrationen verstärkt; die größte Steigerung auf das 1,9-Fache wurde bei den RT-112-Zellen beobachtet (Abb. 24).

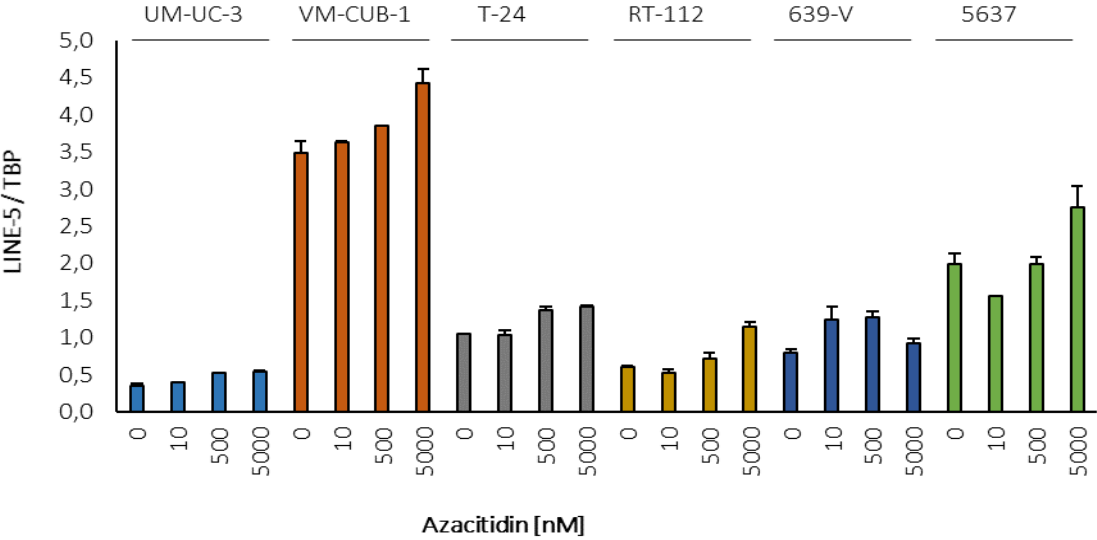


Abb. 24: qPCR-Bestimmung der Expression von LINE-1-Transkripten mit dem 5'-Assay von verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Azacitidin-Konzentrationen (technische und biologische Duplikate)

3.3.2 Einfluss auf die DNA-Methylierung

Decitabin und Azacitidin binden die DNMT1 kovalent und unterbinden somit eine Methylierung der DNA im Anschluss an die Replikation. Um zu überprüfen, wie sich eine Behandlung auf den Methylierungsgrad von UCC auswirkt, wurde eine quantitative Bisulfitsequenzierung von LINE-1 Sequenzen durchgeführt, da deren Methylierung ein guter Indikator für den Gesamt-Methylierungsgrad der DNA ist. Dies erfolgte mittels Pyrosequenzierung wie im Methoden-Teil beschrieben.

Die 6 UC-Zelllinien wiesen alle einen Methylierungsgrad um etwa 60% auf, nur VM-CUB-1 besaß mit 35% einen geringeren Ausgangswert. Nach einer Behandlung mit 10 nM Decitabin über 72 h veränderte sich die Methylierung in keiner der Zelllinien. Bei Behandlung mit 500 nM war die Methylierung bei UM-UC-3, VM-CUB-1, T-24, 5637 und 639-V auf ungefähr 50% des Ausgangswertes vermindert. Bei RT-112 konnte die Methylierung um ungefähr 20% gemindert werden. Bei 5000 nM Decitabin wurde wiederum ein Anstieg der Methylierung auf Kontrollniveau beobachtet (Abb. 25).

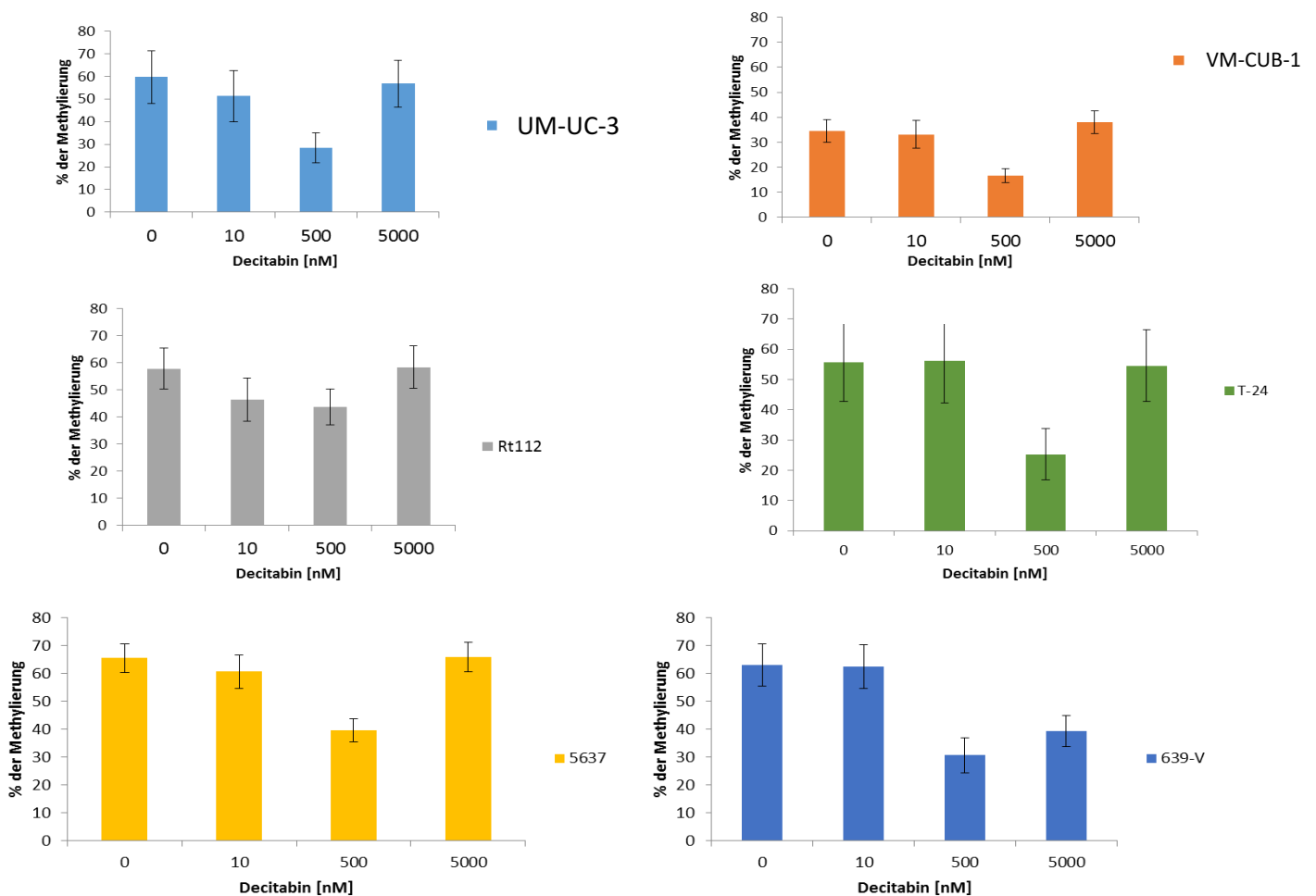


Abb. 25 DNA-Methylierungsgrad von UCC nach Decitabin-Behandlung, bestimmt mittels Pyrosequenzierungsanalyse von LINE-1 Sequenzen, Mittelwert \pm SEM über 4 CpG-Stellen

Bei der Behandlung mit Azacitidin konnte bei 5637 durch eine Konzentration von 5000 nM der Methylierungsgrad von 63% auf 35% gesenkt werden. RT-112 wies mit 56% den zweithöchsten Grad auf, der auf 35% sank. Ähnlich verhielt sich UM-UC-3. T-24 zeigte bei hohen Konzentrationen einen Abfall der Methylierung. VM-CUB-1 war am geringsten methyliert und der Methylierungsgrad wurde auf 24% gesenkt (Abb.26).

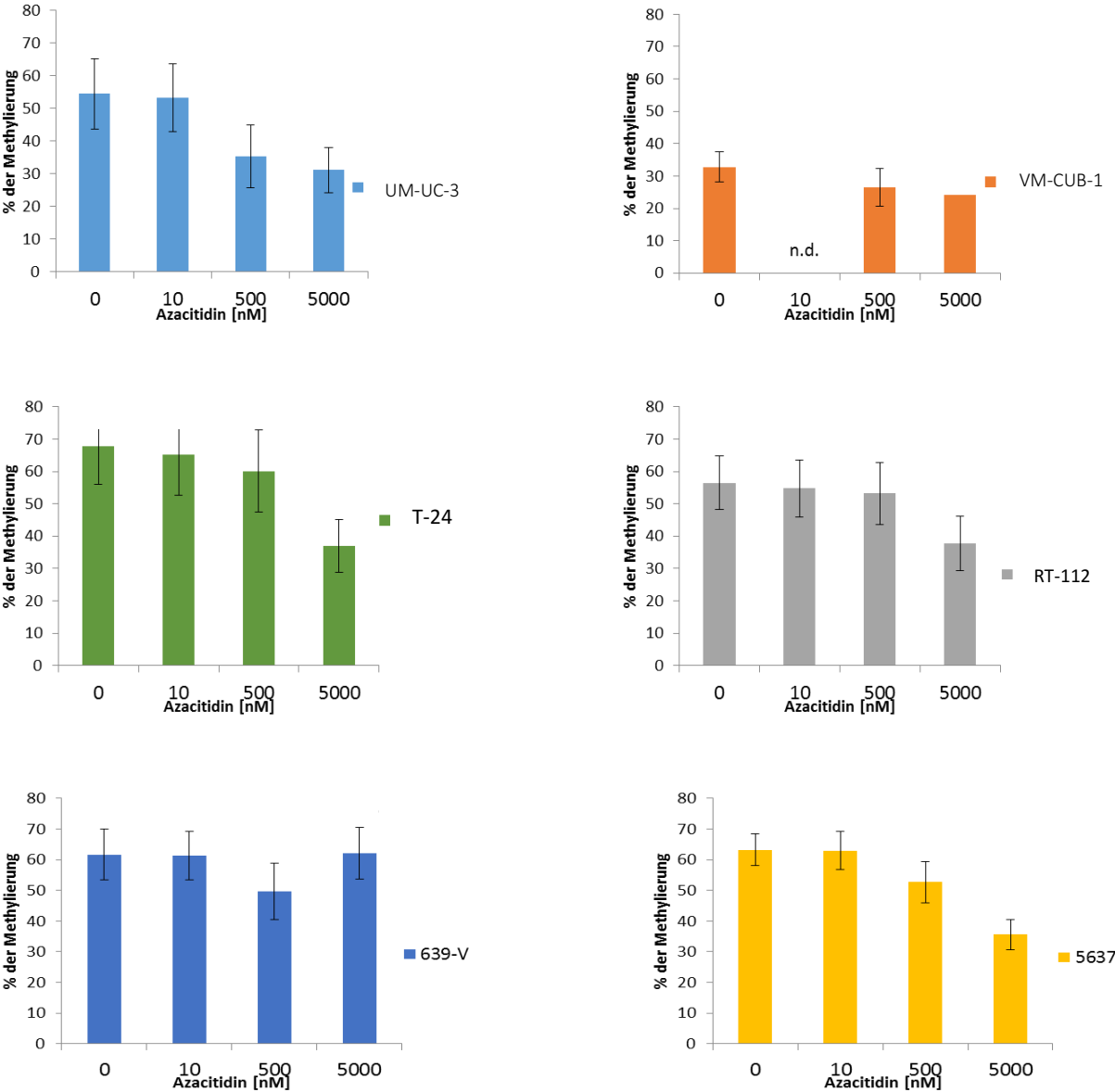


Abb. 26: DNA-Methylierungsgrad von UC nach Azacitidin-Behandlung, bestimmt mittels Pyrosequenzierungsanalyse von LINE-1 Sequenzen, Mittelwert \pm SEM über 4 CpG-Stellen

3.2.3 Einfluss auf die Proteinexpression von DNMT1

Um zu prüfen, welchen Einfluss Decitabin- oder Azacitidin-Behandlung auf die Proteinexpression der DNMT1 haben, wurde ein Western-Blot angefertigt. Zur Kontrolle wurde ein Extrakt aus PC-3 Prostatakarzinomzellen verwendet. Die Proteinbande wurde bei 170 kDa erwartet; zur Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

Die Proteinexpression von DNMT1 konnte mit Decitabin und Azacitidin bei einer Exposition bei 5 μ M über 72 h erfolgreich vermindert werden (Abb. 27 und 28).

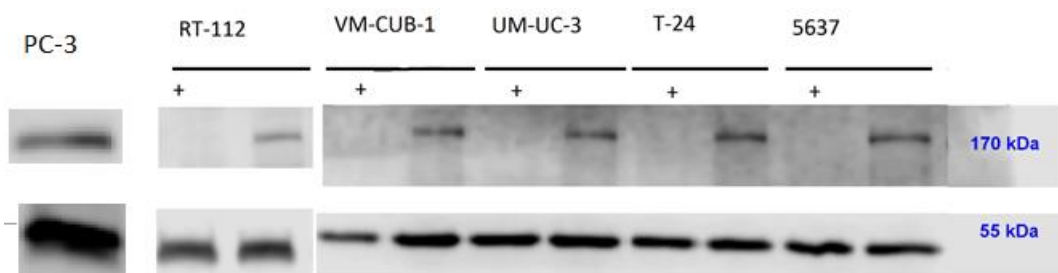


Abb. 27: Western-Blot zum Nachweis der DNMT1-Expression auf Proteinebene oben: (+) Behandlung mit 5000 nM Decitabin, DNMT1. Unten: α -Tubulin zur Kontrolle

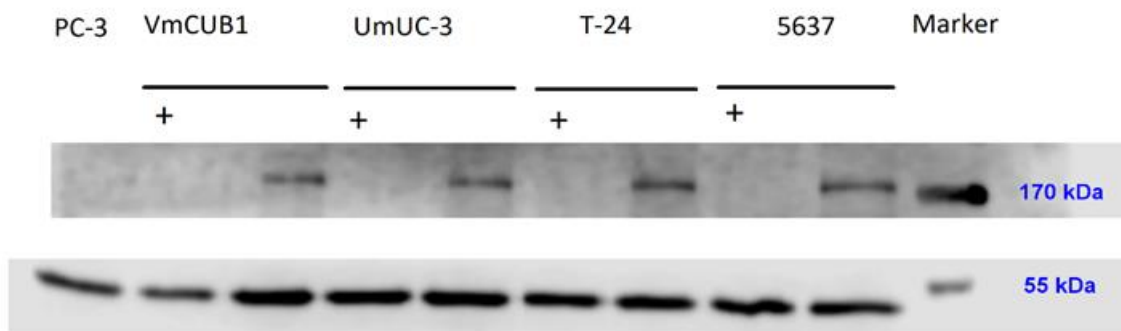


Abb. 28: Western-Blot zum Nachweis der DNMT1-Expression auf Proteinebene oben: (+) Behandlung mit 5000 nM Azacitidin, DNMT1. Unten: α -Tubulin zur Kontrolle

3.3 Einfluss von Decitabin und Azacitidin auf die Klonogenität

Die Fähigkeit Klone zu bilden zeigt das langfristige Wachstumspotential von Zellen an. Anhand eines Klonogenitäts-Assays sollte ermittelt werden, ob UC-Zelllinien nach einer 72-stündigen Behandlung von Decitabin bzw. Azacitidin noch in der Lage sind Klone zu bilden. Hierbei wurde wiederum alle 24 Stunden das Zytostatikum mit dem Medium erneuert. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:100 und 1:400 in 10 cm Schalen ausgesät und so lange beobachtet, bis die mit DMSO behandelte Kontrolle nahezu konfluent besiedelt war. Danach wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt.

Bei den Klonogenitätsversuchen mit Decitabin wurden verschiedene Ansätze gewählt, um herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt ein Effekt durch die Therapie einsetzt. Insgesamt unterdrückte Decitabin ab einer Konzentration von 500 nM die Klonogenität, ab 5000 nM waren keine Klone mehr zu sehen, die einzige Ausnahme bildete 5637.

Bei UM-UC-3 setzte bei einer 72 h-Behandlung, sowohl in der 1:100- als auch der 1:400-Verdünnung, eine Minderung der Klonogenität ab einer Dosierung von 500 nM ein. Am deutlichsten ist dies in der 1:400-Reihe zu sehen, da die Zellen bei 1:100 Verdünnung leicht überwachsen. Auch bei einer 24 h-Behandlung mit Decitabin sieht man ab 500 nM ähnliche Ergebnisse.

VM-CUB-1 verhielt sich ähnlich, jedoch konnte man hier schon bei einer 10 nM-Behandlung über 72 h weniger Klone beobachten. Bei einer 24-stündigen Behandlung lässt sich dieser Effekt erst ab 500 nM Decitabin beobachten. Behandelt man die UCC T-24 mit Decitabin, so lassen sich ab einer Konzentration von 500 nM weniger Klone beobachten; besonders deutlich wird dies in der 1:400-Verdünnung. RT-112 scheint sehr sensibel auf Decitabin zu reagieren, ab einer Konzentration von 10 nM Decitabin ist die Klonogenität sichtbar reduziert, bei 500 nM sind nur noch vereinzelt Klone sichtbar. 639-V zeigte ab einer Dosis von 10 nM Decitabin eine mögliche Reduktion der Klone, ab 500 nM waren keine Klone mehr sichtbar. Die einzige UCC, auf die Decitabin wenig Einfluss hatte, war 5637. Hier zeigte sich selbst bei einer Dosis von 5000 nM kaum eine Änderung der Klonogenität (Abb. 29-31).

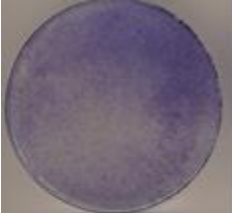
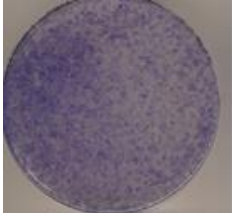
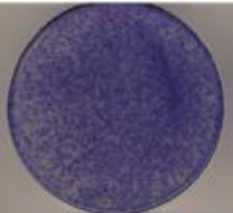
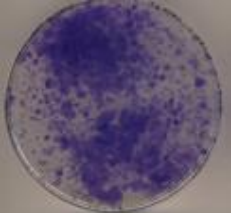
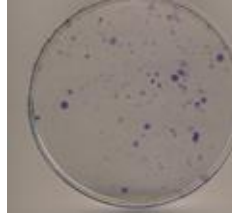
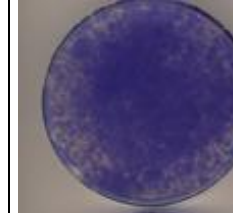
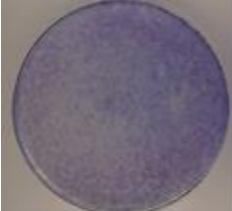
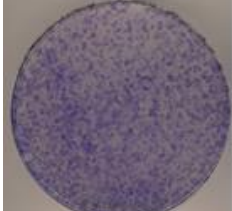
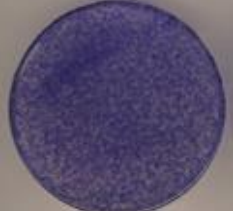
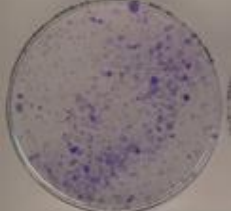

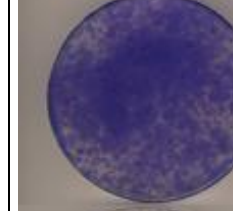
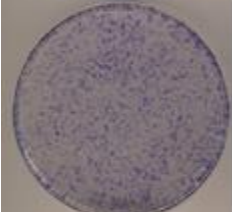
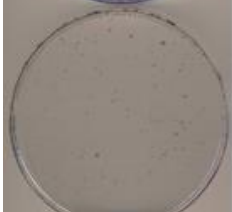
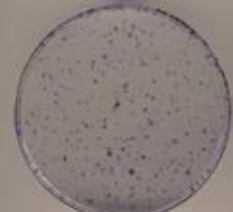


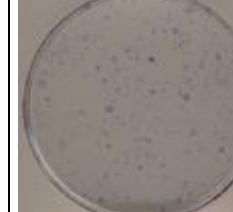






UM-UC-3 Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	UM-UC-3 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	UM-UC-3 Verdünnung 1:400, 24 h-Behandlung	VM-CUB-1 Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	VM-CUB-1 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	VM-CUB-1 Verdünnung 1:400, 24 h-Behandlung	Konzentration Decitabin [nM]
						0
						10
						500
						5000

Abb. 29: Klonogenitäts-Assay mit Decitabin-behandelten UCC

T-24 Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	T-24 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	RT-112 Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	RT-112 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	5637 Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	5637 Verdünnung 1:100, 24 h-Behandlung	Konzentration Decitabin [nM]
						0
						10
						500
						5000

Abb. 30: Klonogenitäts-Assay mit Decitabin-behandelten UCC

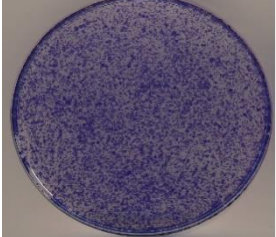
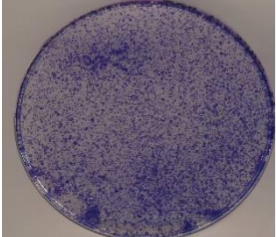
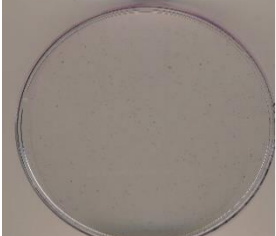
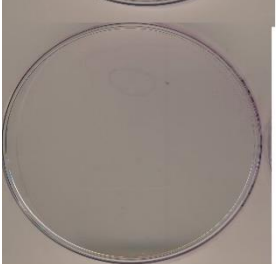
639-V Verdünnung 1:100, 72 h-Behandlung	Konzentration Decitabin [nM]
	0
	10
	500
	5000

Abb. 31: Klonogenitäts-Assay mit Decitabin-behandelten UCC

Die mit Azacitidin behandelten Zelllinien verhielten sich im Klonogenitätsassay untereinander sehr ähnlich. Bei keiner der 6 UC-Zelllinien konnte bei einer 10 nM Behandlung ein Effekt beobachtet werden. Erst ab einer Konzentration von 500 nM Azacitidin wurden bei allen Proben weniger Klone gebildet. Zu beachten ist hierbei, dass bei dieser Konzentration bereits in der Vitalitätsanalyse eine deutliche Reduktion der Zellzahl zu beobachten war, sodass hier wahrscheinlich weniger Zellen transferiert wurden. Bei einer Konzentration von 5000 nM Azacitidin konnten nur bei RT-112 Klone beobachtet werden; die anderen UC wiesen keine Klone mehr auf (Abb. 32-33).

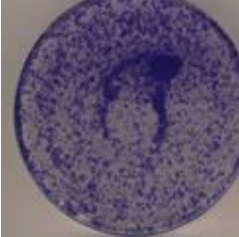
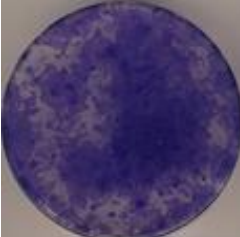
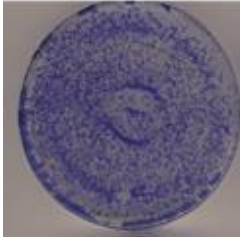
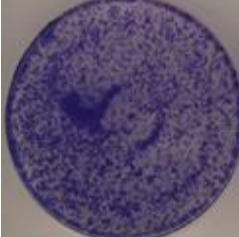
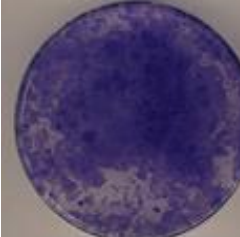
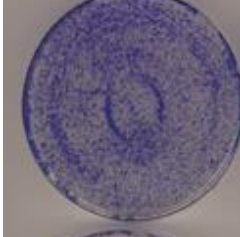
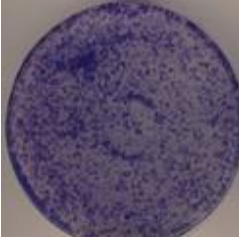
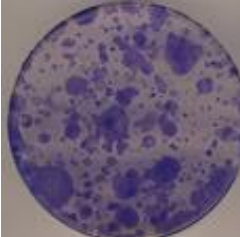
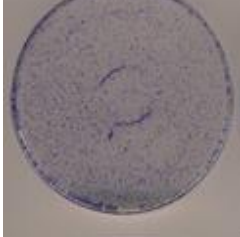
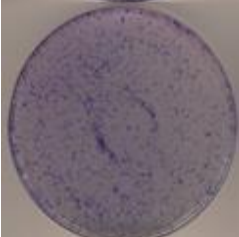


RT-112 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	5637 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	639-V Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	Konzentration Azacitidin [nM]
			0
			10
			500
			5000

Abb. 32: Klonogenitäts-Assay mit Azacitidin-behandelten UCC

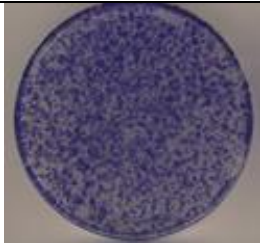
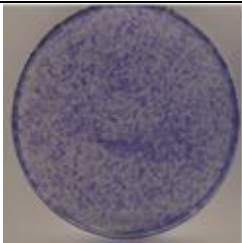
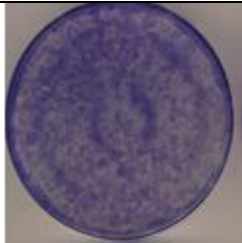
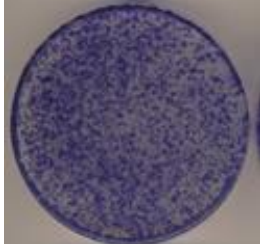
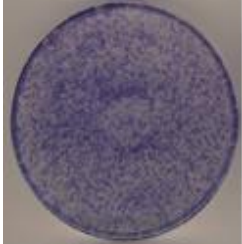
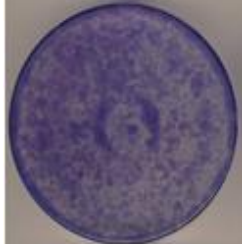
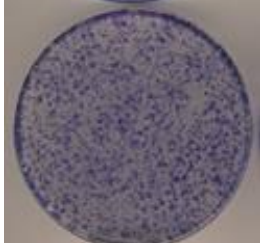
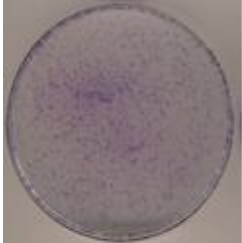
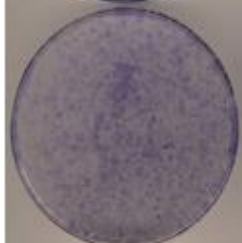
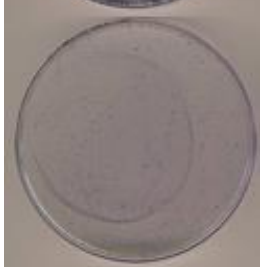


T-24 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	UM-UC-3 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	VM-CUB-1 Verdünnung 1:400, 72 h-Behandlung	Konzentration Azacitidin [nM]
			0
			10
			500
			5000

Abb. 33: Klonogenitäts-Assay mit Azacitidin-behandelten UCC

3.4 Soft-Agar-Assay

Ein Soft-Agar-Assay ist eine wichtige Methode in der Karzinogenese-Forschung, bei der zusätzlich zur Klonogenität die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum geprüft werden kann. Diese geht in der Regel mit einer verstärkten Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* einher. Hier wurde getestet, wie sich Urothelkarzinom-Zellen nach einer Behandlung mit Decitabin bzw. Azacitidin verhalten.

Dazu wurden die Zellen standardmäßig über 72 h mit Decitabin oder Azacitidin behandelt. Nach 3 Tagen wurde ein Bottom-Layer in eine 6-cm Schale gegossen, und darauf ein Top-Layer mit 100.000 Zellen pro Milliliter. Anschließend wurden die Zellen zeitnah inkubiert. Die Zelllinie 5637 bildet keine Klone in Soft-Agar und wurde deshalb nicht getestet.

Im Soft-Agar-Assay hatte Decitabin bei allen getesteten Zellen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum. VM-CUB-1 und RT-112 zeigten in den Kontrollen viele einzelne kleine Kolonien-Gruppen, und bei einer Dosis von 500 nM bildeten diese etwas weniger und kleinere Kolonien.

Bei UM-UC-3, T-24 und 639-V wuchsen in der Kontroll-Probe jeweils viele Zellen mit vielen größeren Kolonien. UM-UC-3, 639-V und besonders T-24 reagierten bereits auf niedrige Dosen von Decitabin; hier konnte bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine verminderte Kolonien Zahl beobachtet werden und die Kolonien waren kleiner. Ab einer Konzentration von 500 nM wurden nur noch sehr wenige kleine Klone beobachtet.

Die Proben von Azacitidin und Decitabin wurden unterschiedlich lang inkubiert, da sich bei Azacitidin schnellere Wirkungen abzeichneten. UC-Zelllinien verhielten sich im Soft-Agar-Assay nach einer Azacitidin-Behandlung anders als mit Decitabin behandelte Zellen. Bei Azacitidin-Versuchsreihen wuchsen in den Kontrollen jeweils große Zell-Agglomerationen, die sich bis in eine Behandlungsdosis von 500 nM beobachten ließen. Erst bei der maximalen Dosis von 5000 nM gab es bei UM-UC-3 und T-24 weniger und kleinere Kolonien, VM-CUB-1, RT-112 und 639-V sahen unverändert aus (Abb.34-35).

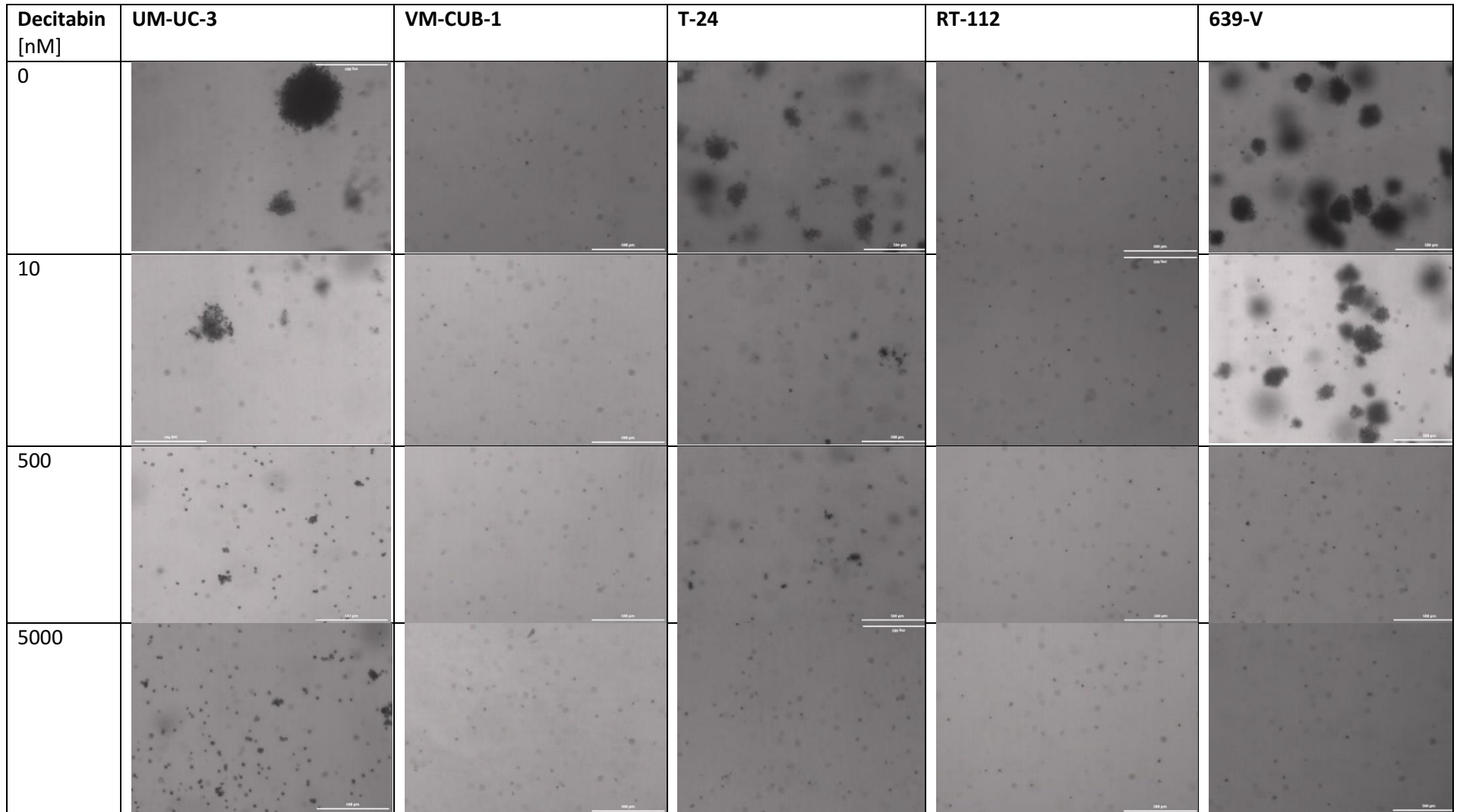


Abb. 34: Soft Agar Assay mit Decitabin-behandelten Tumorzelllinien

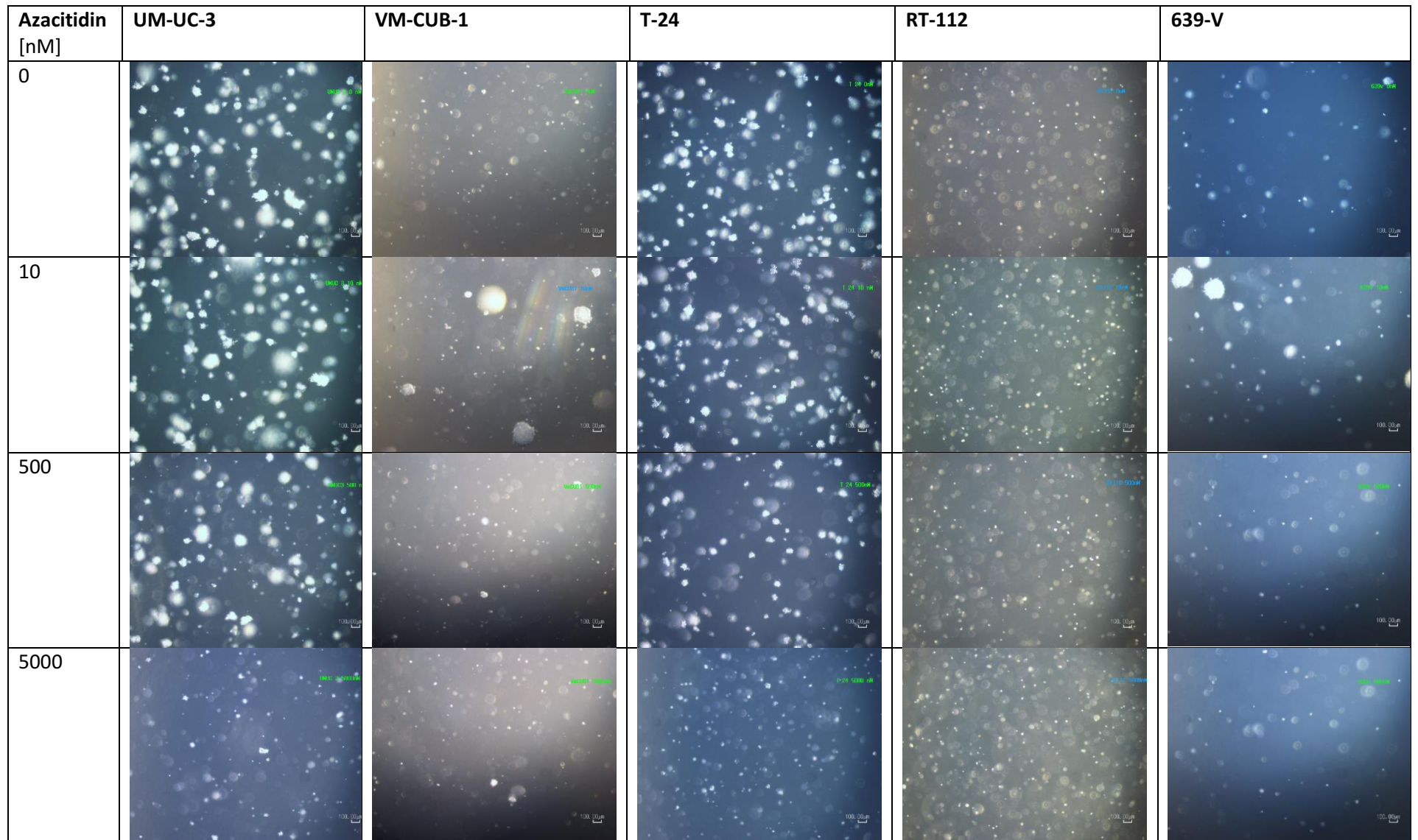


Abb. 35: Soft Agar Assay mit Azacitidin-behandelten Tumorzelllinien

3.5 Auswirkungen einer siRNA-induzierten Herabregulation von DNMT1

3.5.1 Auswirkungen auf die Protein-Expression

Azacitidin und Decitabin binden nach Einbau in die DNA die DNA-Methyltransferasen kovalent, führen zu ihrem Abbau und verhindern somit eine Remethylierung der DNA nach deren Replikation. Die DNMT1 stellt die hauptsächliche DNA-Methyltransferase-Aktivität in vielen Zellen dar, besonders nach der Replikation. Um zu testen, in welchem Umfang die oben beschriebenen Effekte auf Inaktivierung der DNMT1 beruhen oder doch ein zytotoxischer Effekt hierfür verantwortlich ist, wurde ein Knock-Down der DNMT1 mittels spezifischer siRNA durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Zellen mit Kontroll-siRNA ohne Wirkung auf zelluläre mRNAs („non-targeting“, siRNA-NT) behandelt. So kann gesichert werden, dass etwaige Effekte auf einem DNMT1-spezifischen Mechanismus beruhen. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine RNAiMAX nach Herstellerangaben verwendet.

Durch die Transfektion von siRNA konnte ein erfolgreicher Knock-Down der DNMT1 mRNA in den UCC VM-CUB-1 und UM-UC-3 erzielt werden (Abb. 36). Dieser Knock-Down konnte auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 37).

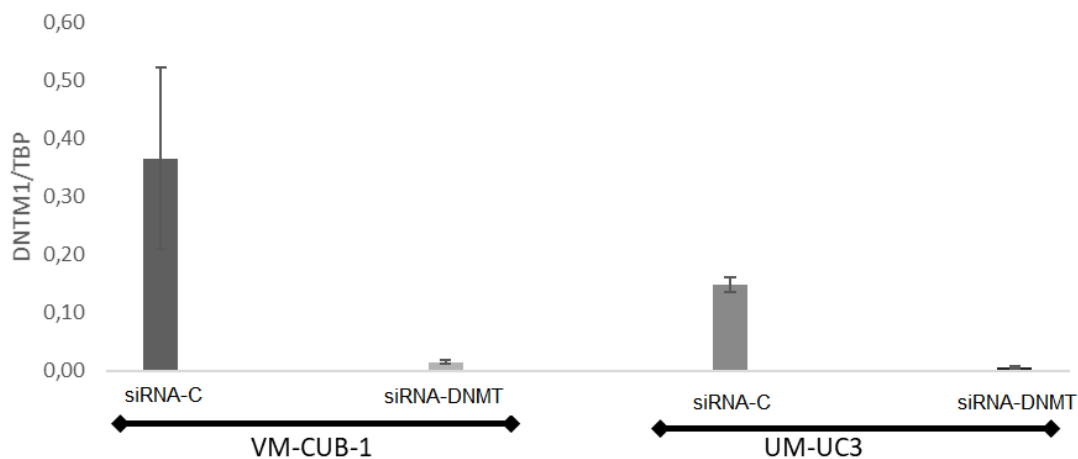


Abb. 36: qPCR-Bestimmung der Expression des DNMT1 Gens in zwei UCCs nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 oder Kontroll-siRNA (siRNA-C)

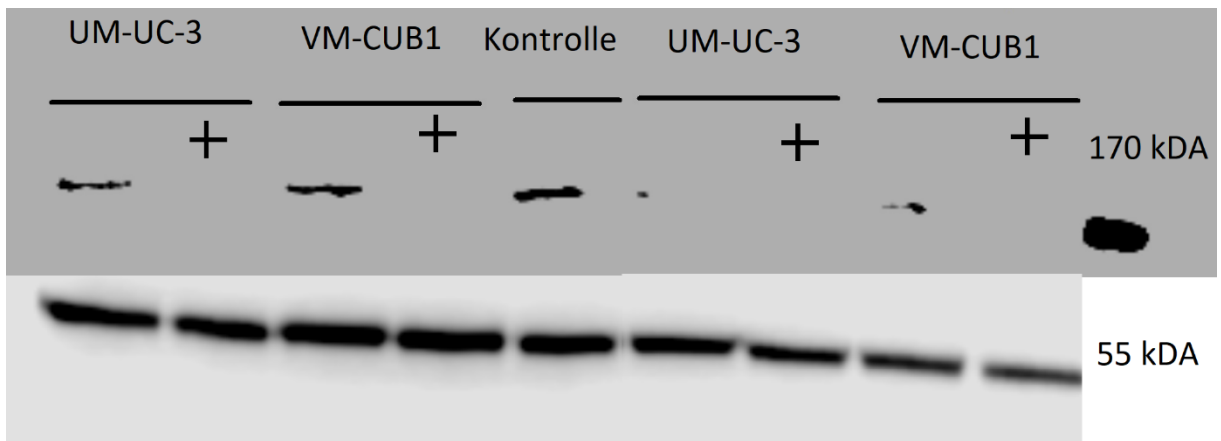


Abb. 37: Western-Blot zum Nachweis der DNMT1-Expression auf Proteinebene in 2 UCCs nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 (+) oder Kontroll-siRNA. Oben: DNMT1, Kontrolle bezeichnet ein Lysat aus PC-3-Zellen. Unten: α -Tubulin wurde zur Überprüfung

3.5.2 Auswirkungen auf die Gen-Expression

Wie nach der Behandlung mit den DNMT-Inhibitoren wurde die Genexpression nach 72 h gemessen; dabei wurden die Gene berücksichtigt, die in diesen Versuchen tendenziell induziert worden waren.

VM-CUB-1 exprimierte *MX-1* im Vergleich zu UM-UC-3 stärker. Jedoch ließ sich durch den DNMT1-Knock-Down die Expression nicht signifikant steigern. Bei UM-UC-3 wurde durch einen Knock-Down von DNMT1 die Expression auf ungefähr das Doppelte gesteigert (Abb. 38).

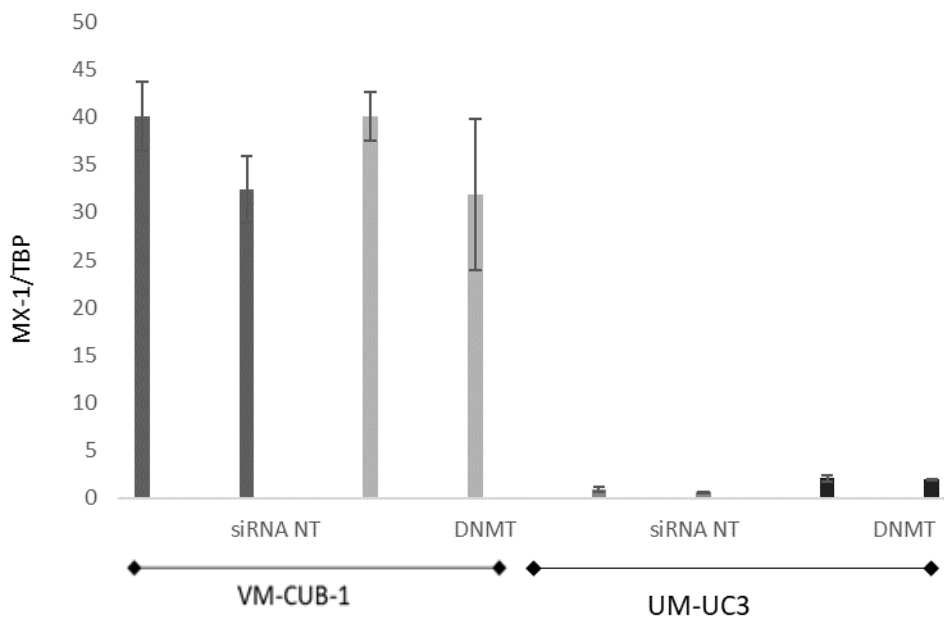


Abb. 38: qPCR-Bestimmung der Expression des *MX-1*-Gens in zwei UCCs nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 oder Kontroll-siRNA (NT). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Proben sowie deren technische Variation.

Nach einem DNMT1 Knock-Down ließ sich weder bei VM-CUB-1 noch bei UM-UC-3 eine signifikante Veränderung der *MAGE-A3* Expression nachweisen. Basal bestand ein deutlicher Unterschied zwischen VM-CUB-1 und UM-UC-3 (Abb. 39).

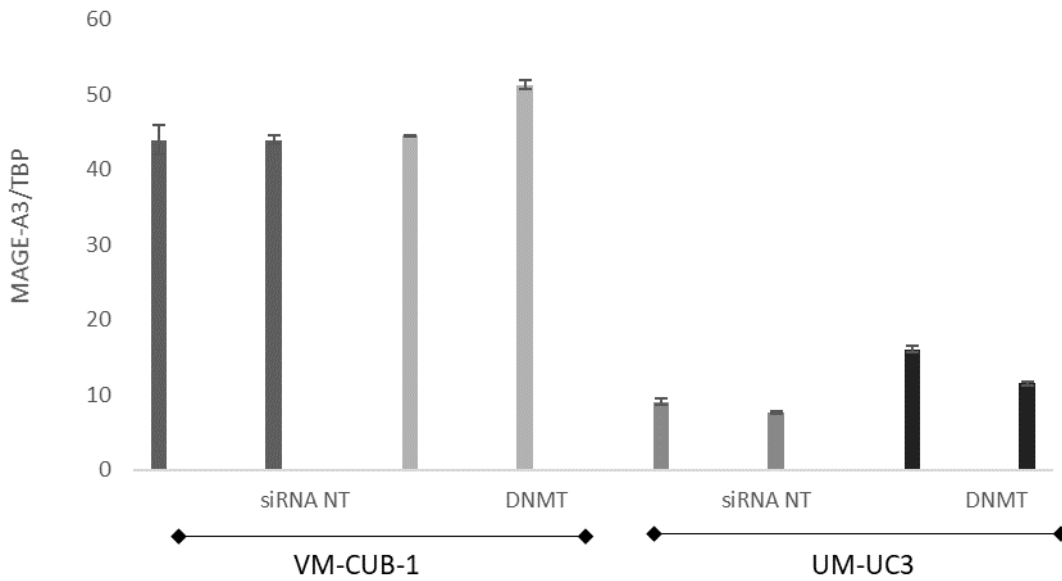


Abb. 39: qPCR-Bestimmung der Expression des MAGe-A3 Gens in zwei UCCs nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 oder Kontroll-siRNA (NT). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Proben sowie deren technische Variation.

LINE-1 wird in VM-CUB-1 stärker exprimiert als in UM-UC-3. Nach dem Knock-Down ließ sich in keiner Zelllinie eine signifikante Veränderung nachweisen (Abb. 40)

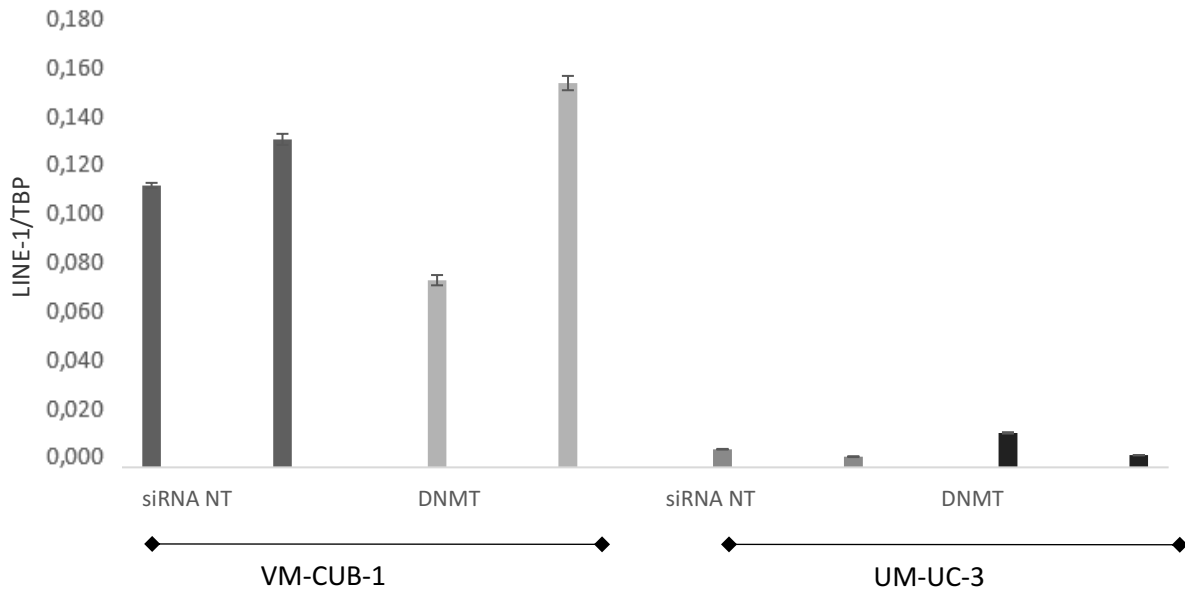


Abb. 40: qPCR-Bestimmung der Expression des LINE-1 Gens in zwei UCCs nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 oder Kontroll-siRNA (NT). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Proben sowie deren technische Variation.

3.5.2 Auswirkungen auf die DNA-Methylierung

DNA aus UM-UC-3 und VM-CUB-1 wurden nach einem Knock-Down Versuch einer Bisulfit-Pyrosequenzierung auf LINE-1 Methylierung unterzogen. Es wurden jeweils drei biologische Replikate angefertigt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied nach einem Knock-Down beobachten (Abb. 41).

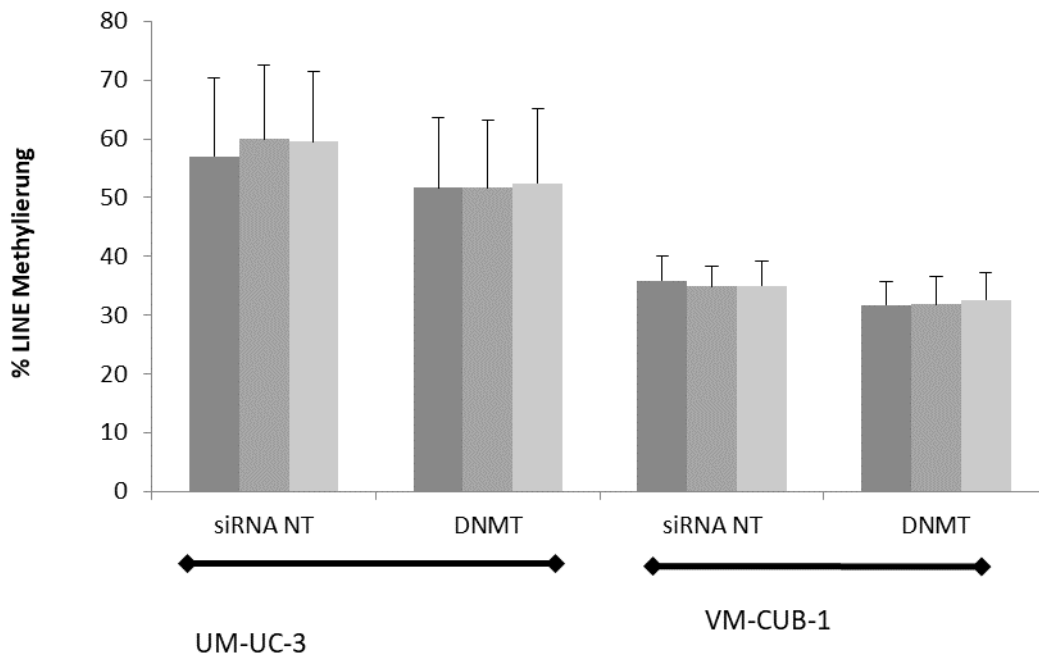


Abb. 41: DNA-Methylierungsgrad bestimmt von UCC nach Transfektion von siRNA gegen DNMT1 oder Kontroll-siRNA mittels Pyrosequenzierungsanalyse von LINE-1 Sequenzen. Mittelwert \pm SEM über 4 CpG-Stellen

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss Decitabin und Azacitidin auf Urothelkarzinom-Zelllinien (UCC) haben und mögliche Erklärungen für die Mechanismen zu finden, die hinter deren Effekten stecken. Dabei war die erste Fragestellung wie sich die Effekte beider Substanzen voneinander unterscheiden bzw. welche Gemeinsamkeiten sie haben.

4.1 Wie unterscheiden sich Azacitidin und Decitabin in ihren Effekten?

Decitabin und Azacitidin sind Cytidin-Analoga und unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur nur in der Art der Ribose. Decitabin wird lediglich in die DNA eingebaut, Azacitidin dagegen zu 80% in die RNA und nur zu ungefähr 20 % in die DNA (Abb. 42) [64].

In randomisiert kontrollierten Phase III Studien erzielten beide Substanzen bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) eine ähnliche Rate an komplettem Ansprechen, jedoch nicht beim medianen Überleben. Hier führte Azacitidin zu einer verlängerten medianen Lebensdauer bei Hoch-Risiko MDS Patienten, was für Decitabin nicht gezeigt werden konnte [35, 65]. In weiteren Studien wurde bei AML Zelllinien beschrieben, dass gegenüber Decitabin resistente Zellen weiterhin gegenüber Azacitidin sensibel bleiben können. Dies könnte bei diesen Zellen daran gelegen haben, dass Decitabin auf Grund pharmakologischer Mechanismen insuffizient in die DNA eingebaut wurde [66].

Bei der Behandlung von Urothelkarzinomzelllinien zeigen sich teilweise große Unterschiede zwischen Azacitidin und Decitabin.

Zunächst ist auffällig, dass Decitabin im Gegensatz zu Azacitidin selbst bei hohen Konzentrationen von 5000 nM innerhalb von 72 h kaum einen Einfluss auf die Vitalität hat. Azacitidin ist hier wirksamer und reduzierte die Vitalität einiger Zelllinien ab einer Konzentration von 5000 nM auf unter 30%. Dies konnte bei keiner Zelllinie nach Decitabin-Behandlung gesehen werden. Betrachtet man dagegen die Klonogenität nach der Behandlung, so erzielte Decitabin effektivere Ergebnisse. Hier konnte selbst bei einer Konzentration von 10 nM bei VM-CUB-1 eine gewisse Unterdrückung der Klonogenität gezeigt werden. Azacitidin konnte diese Effekte erst bei weit höheren Konzentrationen erzielen. Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch der Soft-Agar Assay. So lässt sich ein erstes Fazit ziehen: Azacitidin ist kurzfristig toxischer als Decitabin, jedoch unterdrückt Decitabin schon bei niedrigen Konzentrationen die Fähigkeit Klone zu bilden.

Durch Genexpressionsanalysen verschiedener Gene sollten mögliche Auslöser und Signalwege überprüft werden, die für diese Effekte verantwortlich sein könnten. Vergleicht man, welchen Einfluss die beiden Substanzen auf die Genexpression haben, lässt sich schwer ein einheitlicher Effekt finden. Decitabin führte bei keinem der ausgesuchten Zielgene einheitlich zu einer signifikanten Induktion oder Inhibition. Durch hohe Azacitidin-Konzentrationen wurde hingegen eine vermehrte Expression des *CTCF* Gens erreicht. Bei allen anderen Genen war auch hier keine einheitliche Tendenz nach der Behandlung zu sehen. Diese Beobachtungen könnten verschiedene Ursachen haben.

Eine Möglichkeit ist, dass die Effekte auf der Genebene zu einem späteren Zeitpunkt als dem gewählten messbar werden. Nach fünf Tagen einer Decitabin-Behandlung ergab sich eine deutliche Vitalitätsinhibition. Bei einer Verdopplungszeit von ungefähr einem Tag dauert es bis zu drei Tage, bis in beiden Strängen der DNA eine Basen-Analogen eingebaut wurde. Zudem ist es unklar, wie effizient die Cytidin-Analoga in jedem Replikationszyklus eingebaut werden. Schließlich muss die demethylierte DNA in der Folge für die Genexpression transkribiert sind. Es wäre möglich, dass die Effekte mittels qRT-PCR erst später als nach drei Tagen signifikant messbar sind. Bender et al. beschreiben ebenfalls Versuche, in denen der Methylierungsgrad der genomischen DNA (Blasen- und Kolonkarzinom Zellen) nach 2 μ M Azacitidin zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde. Hier zeigte sich ein progressiver Abfall des Methylierungsniveaus, das Maximum der Demethylierung war nach 48 h erreicht [67]. Erfolgt eine signifikante Demethylierung erst nach 48 h, wären deren Auswirkungen vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar.

Dies würden auch die Beobachtungen bei den Klonogenitäts-Versuchen erklären, bei denen die Auswirkungen mit deutlicher Verzögerung wirksam werden. Azacitidin wird sofort in die RNA eingebaut und kann so schneller auf die Genexpression wirken. Dies könnte der Grund sein, warum die unmittelbare Zytotoxizität höher ist und warum die Genexpression bereits nach drei Tagen verändert ist. Wenn die beiden Substanzen also über die epigenetische Wechselwirkung auf die Genexpression wirken, wäre dies eine mögliche Erklärung, warum Azacitidin schneller wirkt, jedoch nicht so langanhaltend.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist die Verstoffwechslung der beiden Substanzen. So wird Azacitidin wie bereits erwähnt größtenteils in die RNA eingebaut und nur teilweise in die Desoxyform überführt. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Azacitidin durch verschiedene Enzyme vermittelt wird und Mutationen in der einzigen Desoxycytidin-Kinase Resistenz-Mechanismen vermitteln [68].

Die Methylierung der DNA steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Genexpression. Eine weitere Frage war daher, ob sich der Grad der Methylierung durch eine Behandlung mit den beiden Substanzen ändern lässt.

Durch Azacitidin ließ sich zwar eine Reduktion des Methylierungsgrades erzielen, jedoch erst ab einer Konzentration von 5000 nM (Ausnahmen: VM-CUB-1 und 639-V). Decitabin konnte in der Konzentration von 500 nM bei allen UCC, außer bei RT-112, den Methylierungsgrad auf fast die Hälfte reduzieren. Auffällig war hier, dass bei höheren Dosen der Grad der Methylierung wieder zunahm. Dies könnte entweder durch einen Messfehler erklärt werden oder dadurch, dass die Zellen überlebt haben, die einen höheren Methylierungsgrad aufwiesen. Dass Decitabin den DNA-Methylierungsgrad bei niedrigeren Konzentrationen stärker senkt als Azacitidin könnte sich durch seinen vermehrten Einbau in die DNA erklären lassen.

Ähnliche Ergebnisse hatten auch Venturelli et al. beschrieben [64]. Sie stellten fest, dass Decitabin, jedoch nicht Azacitidin, bei p53-Wildtyp Tumorzellen eine Seneszenz induziert. Azacitidin hingegen wirkte dosisabhängig auf die Zellvitalität, ähnlich wie in den hier dargestellten Versuchen, und verminderte den p53 Protein-Spiegel. Allerdings ist p53 in allen verwendeten UCC durch Mutationen inaktiviert [53]. Lyko et al. [69] beschreiben, dass Decitabin die DNMT1 stärker inhibiert als Azacitidin und zusätzlich mehr DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Dies könnte ein möglicher Grund sein, warum Decitabin hier stärkere Effekte erzielt. Auch Pali et al. [70] haben DNA-Doppelstrangbrüche nach Decitabin-Behandlung beschrieben und mit der verstärkten DNMT1-Inhibition eine mögliche Erklärung dieses Phänomens gegeben. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, warum sich die Substanzen, die sich chemisch sehr ähnlich sind, sehr stark in ihrer Wirkungsweise unterscheiden, siehe Abb. 42. Für Urothelkarzinomzelllinien kann zusammenfassend gesagt werden, dass Azacitidin zytotoxischer ist, Decitabin jedoch die langfristige Zellvermehrung besser unterbindet. Dies deutet darauf hin, dass der letztere Effekt über die DNA und nicht über die RNA erzielt wird.

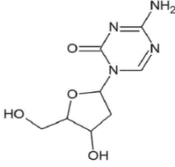
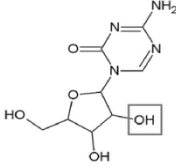
Characteristics	5-aza-CR	5-aza-dC
Chemical structure		
RNA incorporation	60%–80% RNA incorporation	No RNA incorporation
DNA incorporation	20%–40% DNA incorporation	100% DNA incorporation
Transcriptional regulation pattern	In low doses less and in high doses more differentially regulated genes than 5-aza-dC	In low doses more and in high doses less differentially regulated genes than 5-aza-CR
Protein biosynthesis	Inhibition of protein biosynthesis	No inhibition of protein biosynthesis
DNA strand breaks	Weaker DNA damage compared with 5-aza-dC	Increased DNA damage compared with 5-aza-CR
Chromosomal damage	Weak micronuclei formation	Strong micronuclei formation
NK cell activity	Reduction of NK cell activity	Enhancement of NK cell activity

Abb. 42: Vergleich von Azacitidin und Decitabin aus [64] – Genehmigung erteilt durch den Verlag (AACR Journals License-Nr.: 4734250266165)

4.2 Welche Konzentrationen der beiden Substanzen sind wirksam?

Die applizierte Dosis hängt in der klinischen Anwendung mit den Ausprägungen der Nebenwirkungen zusammen. Um eine möglichst wenig belastende und nebenwirkungsarme Therapie durchführen zu können, ist es daher essenziell zu wissen, ab welcher Konzentration Substanzen *in vitro* wirken und wie lange sie verabreicht werden müssen.

Welche Konzentrationen der beiden Substanzen sind also wirksam? Speziell lässt sich fragen, ob auch bei Urothelkarzinom-Zellen niedrige Konzentrationen im nanomolaren Bereich die Zellproliferation oder die Überlebensfähigkeit vermindern. Diese Fragestellung zu beantworten ist kompliziert, da einige Variablen berücksichtigt werden müssen. Die Antwort könnte davon abhängen, welche Parameter gemessen werden, zu welchem Zeitpunkt sie gemessen wurden, wie lange die Behandlung dauerte und welche UCC ausgewählt wurden, sowie wahrscheinlich von weiteren unbekanntem Faktoren. Um einen Überblick über diese Parameter zu bekommen, wurden unterschiedliche Experimente ausgewählt, durchgeführt und ausgewertet. So wurden für eine Dosis-Wirkungskurve zehn Werte von 10 nM bis 10 µM ausgewählt und 72 h lang behandelt, wobei die Substanz alle 24 h erneuert wurde. Hier konnte bei Azacitidin in der Regel ab 5 µM eine signifikante Vitalitätssenkung erreicht werden, bei Decitabin veränderte sich die Vitalität oberhalb von 100-500 nM kaum noch. Eine maximale Reduktion auf 40 % erfolgte bei der Zelllinie T-24. In diesem Ansatz gab es auch keine großen Unterschiede, ob man die Zellen nur einmal oder dreimal mit

Decitabin behandelt. Lag der Messzeitpunkt bei 120 h, so zeigten UM-UC-3 und VM-CUB-1 jeweils eine relative Vitalität von 25 bzw. 35 %.

Betrachtet man hingegen die Klonogenität und das verankerungsunabhängige Wachstum im Soft-Agar, so zeigen sich ganz andere, interessante Ergebnisse. Hier muss man ebenfalls zwischen Decitabin und Azacitidin unterscheiden. Bereits bei einer Konzentration von 10 nM Decitabin konnte eine Reduktion der Zahl von Klonen (bei VM-CUB-1 und RT-112) gezeigt werden, bei einer Konzentration von 500 nM gab es so gut wie keine Klone mehr. Auch hier wurde getestet, wie sich eine einmalige Applikation des Medikaments auswirkt; selbst diese senkte sichtbar die Anzahl der Klone, jedoch nicht ganz so stark wie eine Behandlung über 72 Stunden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Konzentration, ab der keine Klone mehr gebildet werden, zwischen 10 und 500 nM liegt, wenn die Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen behandelt werden. Diese Effekte werden jedoch erst nach einigen Replikations-Zyklen sichtbar. Zu erwähnen ist, dass die Zelllinie 5637, vermutlich auf Grund einer längeren Verdopplungszeit [71], von diesen Beobachtungen nahezu ausgenommen ist.

Bei Azacitidin dagegen ließ sich die Unterdrückung der Koloniebildung bei niedrigen Dosierungen nicht beobachten. Möglich wäre, dass die Substanz diesen Effekt nicht hervorruft oder dass die Dauer der Behandlung zu kurz gewählt worden ist. Um diese Vermutungen weiter zu bestätigen, sollte eine Zelllinie erneut mit Azacitidin in verschiedenen Konzentrationen für einen längeren Zeitraum behandelt werden.

4.3 Über welche Mechanismen wirken die Substanzen?

Um der Frage nachzugehen, auf welche Art und Weise Decitabin und Azacitidin wirken, wurde untersucht, wie sich der Grad der DNA-Methylierung, die DNMT1 und die Expression typischer Indikatorgene verändern. Dieser Ansatz bezog die folgenden Überlegungen mit ein:

Eine zentrale Annahme für die Wirkung von Decitabin und Azacitidin ist, dass durch die Inhibition der DNMT1 und DNMT3A/B die DNA demethyliert wird. Die entstehende Hypomethylierung kann vielfältige Effekte haben. Beispielsweise könnten bestimmte Gene reaktiviert werden. So wurde bei Tumorgeweben von Patienten mit Kolonkarzinomen beschrieben, dass der EGF-Rezeptor durch Methylierung abgeschaltet sein kann und hypomethylierte Tumoren signifikant besser auf die Kombinationstherapie mit Irinotecan und Cetuximab ansprechen als hypermethylierte [72]. Durch eine Inhibition der DNMTs wurde in einem Mausmodell beim Neuroblastom eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin aufgehoben [73]. Auch beim metastasierten Melanom

besteht eine Chemoresistenz. Hier wurde beobachtet, dass das *APAF1* Gen nicht mehr aktiv ist, welches wiederum nach p53-Aktivierung im Komplex mit Caspase 9 und Cytochrom C Apoptose induziert. Mittels Decitabin-Behandlung konnte der Spiegel an APAF-1 erhöht werden, die Zellen somit wieder für die Chemotherapie sensitiviert und die Apoptose induziert werden.

Ein weiteres Ziel einer Reaktivierung ist *CDKN2A*, einem Tumorsuppressor-Gen, welches für die Regulatorproteine p53 und RB1 kodiert, durch diese Proteine können Zellzyklus-Kontrollpunkte und der Zellzyklus reguliert werden. Verschiedene Arbeiten beschreiben eine Reaktivierung dieser Proteine [74]. Ähnlich wird eine Reaktivierung von *CDKN2B* bei der Behandlung der AML diskutiert [41].

Eine weitere Möglichkeit ist, dass Tumorstammzellen durch eine niedrig dosierte Decitabin-Therapie angegriffen werden. Beispielsweise werden durch eine solche Behandlung microRNAs, speziell miR4-97, in verschiedenen hämatologischen- und soliden Tumorzelllinien wieder vermehrt exprimiert. Dadurch werden Stammzellen für eine Chemotherapie sensitiviert [40].

Neben der Reexpression von Zellzyklus-Inhibitoren und Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints ist eine weitere mögliche Wirkung von DNMT-Inhibitoren die Aktivierung einer Immunantwort. Dies könnte über eine vermehrte Interferon-I-Antwort als Folge der Transkriptionsaktivierung endogener Retroviren verursacht werden. Die entstehenden Transkripte aktivieren den MDA5/MAVS/IRF7 Signalweg, wodurch die Tumorzelle signalisiert, dass sie von einem Virus befallen sei [75]. Dies wiederum aktiviert das Immunsystem. Endogene Retroviren werden in manchen Tumorzellen methylierungsabhängig transkribiert. Dieser Prozess soll erst nach einiger Zeit wirksam werden, was die auch hier beobachtete verzögerte Wirkung mit erklären könnte. Chiapinelli *et al.* [28] haben diesen Mechanismus in Ovarialkarzinomzellen detailliert untersucht. Decitabin rief demnach in niedrigen Dosierungen eine endogene virale Antwort hervor, welche nicht bei hohen Dosierungen beobachtet werden konnte. Hier standen die zytotoxischen Effekte im Vordergrund. Auch konnte Azacitidin diese Veränderungen nicht hervorrufen [28]. Roulois *et al.* haben ähnlich bei kolorektalen Tumor Zellen *in vitro* beobachtet, dass durch den Einsatz von low-dose Decitabin endogene retrovirale Elemente induziert wurden. Der aktivierte (MDA5/MAVS/IRF7) Signalweg könnte zudem als mögliches therapeutisches Ziel dienen [75].

Diese diskutierten Möglichkeiten lassen sich nicht immer vollständig voneinander abgrenzen und könnten auch synergistisch wirken.

Folgende Fragen galt es zu klären: Wie verhält sich die Proteinexpression der DNMT1, wenn man Decitabin und Azacitidin einsetzt? Ändert sich durch den Einsatz von demethylierenden Substanzen

der Methylierungsgrad der DNA und damit auch die Expression von verschiedenen Genen? Um die Kernfrage zu lösen, ob die Inhibition der DNMT1 für die Effekte verantwortlich ist, wurde ein Knock-Down der DNMT1 durchgeführt. Mittels dieses Versuchs sollten die zytotoxischen und epigenetischen Wirkungen von Decitabin und Azacitidin teilweise separiert werden (siehe 4.4).

Der Methylierungsgrad der DNA wurde nach 72 h Behandlung gemessen. Auffällig ist, dass vor allem durch eine Decitabin-Behandlung mit 500 nM der Methylierungs-Grad nahezu halbiert wurde und bei 5000 nM wieder zunahm. Dies könnte daran liegen, dass eine Art Selektion stattgefunden hat und die Zellen überlebt haben, die einen hohen Grad an Methylierung aufweisen. In der Literatur wurde auch beschrieben, dass Decitabin nicht immer ausreicht um die DNA zu demethylieren, wenn die de-novo-Methyltransferasen DNMT-3A/B bei starker Expression die Inaktivierung von DNMT1 kompensieren [76]. Diese Möglichkeit müsste im Folgenden untersucht werden (vgl. 4.4). Eine weitere Möglichkeit ist, dass ab einer höheren Dosierung zytotoxische Effekte vorrangig sind und die DNA weniger demethyliert wird. Nicht völlig auszuschließen ist auch, dass es sich um einen technischen Fehler handelt. Betrachtet man dazu die Azacitidin-behandelten Zelllinien, so ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Zwar sinkt der Grad der Methylierung, jedoch nicht so sehr wie bei Decitabin. Erst ab 5000 nM gibt es eine auffällige Verminderung. Dies könnte daran liegen, dass Decitabin in höheren Anteilen in die DNA eingebaut wird und direkt dort demethylierend wirken kann, während nur bei höheren Konzentrationen von Azacitidin ein ausreichender Einbau in die DNA erfolgt.

Da die Hypothese im Raum steht, dass durch diese Demethylierung die Expression bestimmter reprimierter Gen wieder induziert wird, wurden verschiedene Gene ausgewählt und ihre Expression mittels qRT-PCR überprüft; auch hier wurde nach einer 72 h-Behandlung gemessen. *MX-1* ist ein Indikator für die Interferon-I-Antwort. Bei VM-CUB-1 konnte eine Verdopplung von *MX-1* erzielt werden, hier sank sie jedoch bei 5000 nM Decitabin wieder ab. Durch Azacitidin konnte bei keiner der getesteten Zellen eine signifikante Änderung erzielt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nach dieser Behandlungsdauer keine signifikante Interferon-I-Antwort vorliegt.

Die Gene *MAGE-A3* und *CTCF* werden stark DNA-methylierungsabhängig transkribiert [63]. *MAGE-A3* spielt auch als Testis-Cancer-Antigen in der Immunantwort eine Rolle. Erwartungsgemäß würde die Expression nach einer Behandlung mit demethylierenden Substanzen ansteigen. Decitabin induzierte eine *CTCF*-Expression bei RT-112 und UM-UC-3, Azacitidin zusätzlich bei T-24, insgesamt jedoch in geringerem Ausmaß. *MAGE-A3* wurde durch keines der beiden Medikamente einheitlich beeinflusst werden. Bei der Expression von *LINE-1* zeigte sich keine wesentliche Änderung, obwohl diese Sequenzen auch DNA-methylierungsabhängig exprimiert werden [63]. Um herauszufinden, wie

sich eine niedrig dosierte Therapie auf Zellzyklus-Inhibitoren auswirkt, wurde das *p21* kodierende Gen *CDKN1A* untersucht. Hier induzierte Decitabin bei UM-UC-3 eine Verdopplung, bei den übrigen Zelllinien teilweise einen Abfall, Azacitidin erzielte keine Veränderung.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst nicht die Erwartungen zu erfüllen, besonders in Hinsicht auf die Genexpression. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten: Die Behandlungsdauer scheint - anhand der Klonogenitätsergebnisse gesehen - ausreichend zu sein, Decitabin unterdrückt eindeutig die Klonogenität. Jedoch dauert es möglicherweise länger, bis sich eine Behandlung auf die Genexpression auswirkt, vor allem bei langsam wachsenden Zellen. Dies würde erklären, warum UM-UC-3 als schnellwachsende Zelllinie am ehesten eine Veränderung erfährt. Verschiedene Arbeiten haben beschrieben, dass eine Therapie mit niedrig dosiertem Decitabin bis zum Ansprechen einen Monat benötigt. Dies würde dafür sprechen, dass es sich auch in den UCC um epigenetische Effekte handelt, die verzögert eintreten [37, 77] Diese Interpretation würde sowohl mit den Beobachtungen bei der Zellvitalität als auch der DNA-Methylierungsanalyse übereinstimmen. Interessant wäre es, die Zellen nach mehr als 72 h noch einmal zu testen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in UCC andere Gene beeinflusst werden als die ausgewählten und diese den langfristigen Effekt vermitteln. Des Weiteren wäre es denkbar, dass eine Decitabin- oder Azacitidin-Behandlung die Genexpression weniger beeinflusst und über Zytotoxizität wirkt. *In vivo* würde zudem das Immunsystem beeinflusst werden. Dies wurde jüngst auch von Chiapinelli *et al.* beschrieben [28] und bestätigt frühere Beobachtungen von Wrangle *et al.* [51], die durch eine niedrig dosierte Azacitidin-Therapie beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) bei bestimmten Patienten Immuncheckpoints aktivieren konnten. Hierbei handelte es sich vor allem um den PD-L1 Rezeptor, der dann als therapeutisches Zielmolekül dienen kann.

4.4 Lassen sich die beobachteten Effekte der beiden Nukleosidanaloga gleichermaßen durch siRNA-vermittelte Herunterregulation ("Knock-Down") der DNMT1 auslösen?

Die Experimente zum Knock-Down von DNMT1 sollten helfen den Wirkmechanismus der Nukleosidanaloga besser zu verstehen. Im Einzelnen waren die Fragen: Wirkt Decitabin lediglich durch die Inaktivierung der DNMT1 und damit über eine Demethylierung, woraus eine Reaktivierung stumm geschalteter Gene resultiert? Wie verhalten sich also die Klonogenität und die Genexpression?

Ziel des Knock-Down war die DNMT1, welche für die Methylierung neu synthetisierter DNA nach der Replikation zuständig ist. Die DNMT3A/B hingegen sind in diesem Experiment nicht betroffen. Hierzu

wurden die Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 ausgewählt, da diese zuvor sehr sensibel auf eine Decitabin-Behandlung reagiert hatten. Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass die DNMT1 Genexpression nach der Transfektion erfolgreich unterdrückt wurde und nur noch ein Bruchteil der zuvor exprimierten DNMT1 mRNA nachzuweisen war. Der Western-Blot bestätigte dies auf der Protein-Ebene, hier war keine DNMT1 mehr nachweisbar. Wird auf Grund dieser Veränderung nun die DNA demethyliert und die Genexpression generell verändert? Tatsächlich veränderte sich der Grad der DNA-Methylierung nur geringfügig. Um die Ergebnisse mit den Effekten der Nukleosidanaloge vergleichen zu können, wurden die gleichen Gene analysiert. Auch diese veränderten sich nicht signifikant. Decitabin und Azacitidin hatten auf diese Parameter keinen durchgehend starken Einfluss, jedoch auf die Klonogenität. Hier zeigten sich jedoch nach DNMT1 Knock-Down ähnliche Klonzahlen und -größen wie in den Kontrollen. Für diesen markanten Unterschied zu einer Decitabin-Behandlung gibt es verschiedene mögliche Erklärungen:

- DNMT1 Knock-Down wird über andere Methyltransferasen kompensiert: Auffällig ist, dass sich bei den DNMT1 Knock-Down-Zellen in der Pyrosequenzierung keine nennenswerte Veränderung der DNA-Methylierung nachweisen ließ. Sowohl auf der Protein- als auch auf RNA-Ebene konnte nachgewiesen werden, dass der Knock-Down erfolgreich war. Möglich wäre es, dass der Knock-Down der DNMT1 durch die anderen DNA-Methyltransferasen kompensiert werden kann und die DNA in Tumorzellen methyliert bleibt. Alternativ könnte der DNMT1 Knock-Down in den Tumorzellen zu transient sein, indem sie das Enzym schnell wieder reexprimieren können. Dies würde auch erklären, warum sich sowohl die Genexpression als auch die Klonogenität nicht wesentlich beeinflussen ließen. Beide Kompensationsmechanismen wurde bereits bei einigen Tumorzellen nach einer Decitabin-Behandlung beschrieben, besonders, dass die DNMT3A/B den Knock-Down von DNMT1 kompensieren können [76].
- Epigenetische Veränderungen werden erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar: Die verminderte Methylierung der DNA und die folgenden Veränderungen der Genexpression werden möglicherweise nicht innerhalb von 72 Stunden durch eine Decitabin-, Azacitidin-Behandlung oder einen Knock-Down erreicht. Es könnten noch mehr Replikationszyklen notwendig sein, um beide DNA-Stränge zu demethylieren. Es wurde angenommen, dass sich die Zellen innerhalb von 72 Stunden dreimal repliziert haben. Nach diesen 3 Zyklen wäre – bei vollständiger Inhibition der DNMTs - in vierzehn von sechzehn DNA-Strängen ein Cytidin-Analogon eingebaut. Möglicherweise wären die Veränderungen der DNA-Methylierung erst nach mehr als 72 Stunden ausreichend, um die Genexpression messbar zu verändern.

Des Weiteren besitzen Decitabin und Azacitidin eine kurze Halbwertszeit [78]. SGI-110 ist ein DNMT-Inhibitor mit einer verlängerten Halbwertszeit. Dieser wurde von Griffiths et al. bei Ovar-Tumorzelllinien und bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in einer Dosis von 0,1 - 5 μM über sechs Tage eingesetzt. Hier zeigte sich, dass eine Applikation von fünfmal täglich effektiver ist als eine Applikation dreimal pro Woche, da so die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, die S-Phase des Zellzyklus zu treffen. Nachgewiesen wurde hier eine CTA-Promotor- und globale DNA-Hypomethylierung, was zu einer Expression von Zelloberflächen-Immunmarkern sowie einer CD8+ T-Zellaktivierung führte [79].

- Decitabin wirkt nicht über epigenetische Effekte: Der Knock-Down hat nachweislich funktioniert. Eine mögliche Erklärung dafür, warum er gänzlich unterschiedliche und weitaus weniger eindrucksvolle Ergebnisse als die Behandlung mit Decitabin lieferte, ist, dass die Ursache für die Inhibition der Klonogenität durch Decitabin nicht über die Genexpression und DNA-Methylierung erfolgt. Die niedrigen Dosen von Decitabin könnten ausreichen, um anhaltend DNA-Protein-Addukte und persistierende DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren. Die Auswirkungen von Doppelstrangbrüchen würden nicht zu einer direkten Inhibition des Wachstums führen, die Zellen jedoch möglicherweise daran hindern sich langfristig zu vermehren. Hierfür würde auch sprechen, dass sich die Genexpression durch eine Decitabin-Behandlung kaum beeinflussen ließ. Durch die induzierte Genomschädigung können Zellzyklus-Inhibitoren aktiviert werden und die Zellen dadurch in Zell-Seneszenz und Zellzyklus-Arrest fallen [29, 64]. Dies würde unter anderem erklären, warum die Behandlung keine nennenswerten zytotoxischen Effekte hatte.
- Decitabin wirkt schneller als ein Knock-Down der DNMT1: Decitabin kann sofort nach Applikation in die DNA der Tumorzellen eingebaut werden. Hier wird die DNMT1 kovalent gebunden. Im vorigen Abschnitt wurde diskutiert, dass es mehrere Replikations-Zyklen dauert, bis die Substanz wirkt und die DNA effizient hypomethyliert wird. Ein Knock-Down unterbindet die RNA Transkription der DNMT1. So dauert es, bis sich dies auf die Protein-Ebene und dann wiederum auf die Methylierung der DNA auswirkt. Es wäre also möglich, dass eine Veränderung der DNA-Methylierung und folglich auch der Genexpression länger dauert, als zum ausgewählten Zeitpunkt erkennbar wird. Jedoch würde dies nicht die Effekte auf die Klonogenität erklären. Ghoshal et al. [80] haben herausgefunden, dass Decitabin auf proteasomaler Ebene eine Verminderung der DNMT1 bewirkt und dies unabhängig von der Transkription geschieht. Diese Beobachtungen trafen auch bei nur geringen Dosierungen von 0,1 μM Decitabin zu.

- Kombination verschiedener Mechanismen: Es ist wahrscheinlich, dass für diese Ergebnisse nicht ein Mechanismus allein verantwortlich ist, sondern verschiedene Mechanismen synergistisch wirken und sich gegenseitig begünstigen. Es wäre also beispielsweise möglich, dass Decitabin bei geringen Dosen in die DNA eingebaut wird, alleine jedoch keine Doppelstrangbrüche induziert.
Durch diese Irritation könnten zum Beispiel Immunantworten induziert oder Zellcheckpoints aktiviert und die Genexpression beeinflusst werden.
Ähnliche Phänomene werden aktuell von verschiedenen Gruppen beschrieben. Die Fehlregulation von Cyclin-abhängige Kinasen 4/6 (CDK4/6) ist an der Entartung von Zellen beteiligt. Die Arbeit von Zhao et al. [81] zeigt, dass der Einsatz von CDK4/6 Inhibitoren bei Tumorzellpopulationen, im Tierexperiment und in einer klinischen Studie mit Brustkrebs-Patienten einen Zellzyklus-Arrest sowie eine Immunantwort induziert. Hierfür wird die Kombination von epigenetischen Veränderungen sowie die Aktivierung von Immuncheckpoints verantwortlich gemacht. Über CDK4/6 wird die Transkription des *DNMT1* Gens aktiviert. Entsprechend wurde durch den Einsatz von CDK4/6-Inhibitoren die DNA-Methylierung reduziert. In dieser Arbeit wurden folgende Effekte beobachtet: Regulator-T-Zellen wurden supprimiert, zytotoxische T-Zellen werden angeregt die Tumorzellen zu vernichten. In diesem Zusammenhang werden zusätzlich endogene retrovirale Elemente exprimiert ("viral mimicry"). Es entsteht doppelsträngige RNA, welche im Endeffekt zu einer Interferon-Antwort mit Tumorantigenpräsentation führt. Auch hier wurde kein direkter Zelltod beschrieben, sondern Zellseneszenz und Zellzyklus-Arrest.

5. Ausblick

Eine Behandlung von Urothelkarzinomzelllinien mit niedrig dosiertem Decitabin unterdrückt erfolgreich deren langfristiges Wachstum. Diese positiven Ergebnisse bieten einen neuen Ansatzpunkt für die bisher limitierte medikamentöse Therapie des Urothelkarzinoms.

Es konnten zudem erste wichtige Einblicke in den komplexen Wirkungsmechanismus gewonnen werden, auf denen weitere Versuche aufgebaut werden sollten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bisher noch kein Mechanismus identifiziert wurde, der alle Beobachtungen hinreichend erklärt.

Demnach ist es essenziell, die Vorgänge in den Tumorzellen unter und nach der Behandlung mit Decitabin oder Azacitidin weiter im Detail zu verfolgen. Dazu wäre eine Versuchsreihe besonders interessant, die nicht nur die verschiedenen Parameter nach verschiedenen Konzentrationen von Decitabin untersucht, sondern auch nach verschiedenen Zeitpunkten. Zudem wäre es sinnvoll, weitere Zellzyklus-Checkpoints und weitere mögliche Zielgene zu verfolgen.

In einem weiterführenden Ansatz könnte untersucht werden, wie sich die beiden Medikamente in Kombination mit verschiedenen anderen Substanzen auswirken. Sensibilisiert eine solche Behandlung z.B. zuvor Cisplatin resistent gewordene Zellen? Dies legt eine Studie nahe, die 16 verschiedene Chemotherapeutika bei Kolonkarzinomzellen testete. Keine der Substanzen zeigte in der Monotherapie eine Wirkung. Wurde jedoch zeitgleich Decitabin eingesetzt, bewirkten platinhaltige Substanzen eine vermehrte Expression von Genen wie *MLH1* (einem DNA Mismatch Repair Gen), hemmten dagegen die Expression von HP1 α (das für die Stabilität des Heterochromatins entscheidend ist). In dieser Studie wurden Konzentrationen von 25 nM Decitabin eingesetzt. Weiterhin ergaben hier unterschiedliche Dosen verschiedene Genexpressionsmuster. Mit höheren Dosen konnte - ebenso wie in dieser Arbeit - keine weitere Reduktion der DNA-Methylierung erzielt werden [82].

Eine naheliegende Kombination ist die mit HDAC-Inhibitoren, da DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung bei der Repression von Genen interagieren [83]. Hierzu gibt es eine große Anzahl an Untersuchungen. Auch Histon-Methyltransferasen und -Demethylasen sind essenziell für die Regulation der Genexpression über Histonmodifikationen. So wurden erste Experimente bei Brustkrebs-Zelllinien durchgeführt, die Inhibitoren der Histondemethylase KDM5B in Kombination mit Decitabin einsetzten und hierdurch eine Reduktion der Vitalität beobachteten [84]. Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass durch diese Kombination endogene Retroviren, eine Interferon Antwort und

immunmodulatorische Signalwege im Vergleich vermehrt aktiviert wurden und hierdurch Apoptose induziert wurde.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse basieren auf *in vitro*-Versuchen an Urothelkarzinomzelllinien. Diese können sich von *in vivo*-Versuchen grundsätzlich unterscheiden, weshalb sich die Resultate nicht direkt auf Patienten mit einem Urothelkarzinom übertragen lassen. Daher wäre ein weiterer notwendiger Schritt, die Versuche in Tiermodellen wie dem Chorioallantoismembran-Modell im Hühnerei [85] oder in ein geeignetes Mausmodell zu übertragen [86].

6. Literatur

1. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 11. Ausgabe ed. 2017, Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
2. Antoni, S., et al., *Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends*. *Eur Urol*, 2017. 71(1): p. 96-108.
3. Wolff, E.M., G. Liang, and P.A. Jones, *Mechanisms of Disease: genetic and epigenetic alterations that drive bladder cancer*. *Nat Clin Pract Urol*, 2005. 2(10): p. 502-10.
4. Ploeg, M., K.K. Aben, and L.A. Kiemeny, *The present and future burden of urinary bladder cancer in the world*. *World J Urol*, 2009. 27(3): p. 289-93.
5. Bertz, S., et al., *Urothelial Bladder Cancer: An Update on Molecular Pathology with Clinical Implications*. *European Urology Supplements*, 2017. 16(12): p. 272-294.
6. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms*. 2016.
7. Alfred Witjes, J., et al., *Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer*. *Eur Urol*, 2017. 71(3): p. 462-475.
8. Bellmunt, J., et al., *Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†*. *Annals of Oncology*, 2014. 25(suppl_3): p. iii40-iii48.
9. Maase, H.v.d., et al., *Long-Term Survival Results of a Randomized Trial Comparing Gemcitabine Plus Cisplatin, With Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, Plus Cisplatin in Patients With Bladder Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. 23(21): p. 4602-4608.
10. De Santis, M., et al., *Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986*. *J Clin Oncol*, 2012. 30(2): p. 191-9.
11. Rosenberg, J.E., et al., *Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial*. *The Lancet*, 2016. 387(10031): p. 1909-1920.
12. Netto, G.J., *Role for anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor in advanced urothelial carcinoma*. *The Lancet*, 2016. 387(10031): p. 1881-1882.
13. Morrison, C.D., et al., *Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(6): p. E672-81.
14. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. *Nat Rev Cancer*, 2015. 15(1): p. 25-41.
15. Cheng, T., et al., *Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting*. *PLoS One*, 2013. 8(2): p. e57284.
16. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. *Nature*, 2014. 507(7492): p. 315-22.
17. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The Epigenomics of Cancer*. *Cell*, 2007. 128(4): p. 683-692.
18. Shen, L. and R.A. Waterland, *Methods of DNA methylation analysis*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007. 10(5): p. 576-81.
19. Ting, A.H., et al., *Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation*. *Cancer Res*, 2006. 66(2): p. 729-35.
20. Okano, M., et al., *DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development*. *Cell*, 1999. 99(3): p. 247-257.

21. De Smet, C., A. Lorient, and T. Boon, *Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(11): p. 4781-90.
22. Florean, C., et al., *Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications*. *Epigenomics*, 2011. 3(5): p. 581-609.
23. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. *Nat Biotechnol*, 2010. 28(10): p. 1057-68.
24. Schulz, W.A. and W. Goering, *DNA methylation in urothelial carcinoma*. *Epigenomics*, 2016. 8(10): p. 1415-1428.
25. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *Epigenetic Determinants of Cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016. 8(9).
26. Maldonado, L. and M.O. Hoque, *Epigenomics and ovarian carcinoma*. *Biomark Med*, 2010. 4(4): p. 543-70.
27. McGarvey, K.M., et al., *Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state*. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3541-9.
28. Chiappinelli, K.B., et al., *Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses*. *Cell*, 2015. 162(5): p. 974-86.
29. Zhong, B., et al., *Structural optimization of non-nucleoside DNA methyltransferase inhibitor as anti-cancer agent*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016. 26(4): p. 1272-5.
30. Lyko, F. and R. Brown, *DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(20): p. 1498-506.
31. Zeidan, A.M., Y. Linhares, and S.D. Gore, *Current therapy of myelodysplastic syndromes*. *Blood Rev*, 2013. 27(5): p. 243-59.
32. Germing, U., et al., *Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment*. *Dtsch Arztebl Int*, 2013. 110(46): p. 783-90.
33. Kuendgen, A., et al., *Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature*. *Oncotarget*, 2018. 9(45): p. 27882-27894.
34. Santos, F.P., et al., *Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010. 10(1): p. 9-22.
35. Lubbert, M., et al., *Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group*. *J Clin Oncol*, 2011. 29(15): p. 1987-96.
36. Wijermans, P., et al., *Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients*. *J Clin Oncol*, 2000. 18(5): p. 956-62.
37. Juergens, R.A., et al., *Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer*. *Cancer Discov*, 2011. 1(7): p. 598-607.
38. Joeckel, T.E. and M. Lubbert, *Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: an update*. *Semin Hematol*, 2012. 49(4): p. 330-41.
39. Zhao, J., *Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid*. *Pharmacol Ther*, 2016. 160: p. 145-58.
40. Liu, L., et al., *Low-dose DNA-demethylating agent enhances the chemosensitivity of cancer cells by targeting cancer stem cells via the upregulation of microRNA-497*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016. 142(7): p. 1431-9.
41. Tsai, H.C., et al., *Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells*. *Cancer Cell*, 2012. 21(3): p. 430-46.

42. Han, H., E.M. Wolff, and G. Liang, *Epigenetic alterations in bladder cancer and their potential clinical implications*. *Adv Urol*, 2012. 2012: p. 546917.
43. Chung, W., et al., *Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. 20(7): p. 1483-91.
44. Marques-Magalhaes, A., et al., *Targeting DNA Methyltransferases in Urological Tumors*. *Front Pharmacol*, 2018. 9: p. 366.
45. Schulz, W.A., et al., *Epigenetics of urothelial carcinoma*. *Methods Mol Biol*, 2015. 1238: p. 183-215.
46. Chihara, Y., et al., *Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis*. *BMC Cancer*, 2013. 13(1): p. 275.
47. Ghosh, M., et al., *Targeted therapies in urothelial carcinoma*. *Curr Opin Oncol*, 2014. 26(3): p. 305-20.
48. Loriot, Y., et al., *Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2019. 381(4): p. 338-348.
49. van Kessel, K.E., et al., *Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research*. *Nat Rev Urol*, 2015. 12(12): p. 681-94.
50. Xylinas, E., et al., *An Epigenomic Approach to Improving Response to Neoadjuvant Cisplatin Chemotherapy in Bladder Cancer*. *Biomolecules*, 2016. 6(3): p. 37.
51. Wrangle, J., et al., *Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine*. *Oncotarget*, 2013. 4(11): p. 2067-79.
52. Fonsatti, E., et al., *Functional up-regulation of human leukocyte antigen class I antigens expression by 5-aza-2'-deoxycytidine in cutaneous melanoma: immunotherapeutic implications*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(11): p. 3333-8.
53. Grimm, M.O., et al., *Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines*. *Urol Res*, 1995. 23(5): p. 293-300.
54. Bellet, D., et al., *Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells*. *Cancer Res*, 1997. 57(3): p. 516-23.
55. Grossman, H.B., et al., *Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures*. *J Urol*, 1986. 136(4): p. 953-9.
56. Masters, J.R., et al., *Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines*. *Cancer Res*, 1986. 46(7): p. 3630-6.
57. O'Toole, C., et al., *Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy*. *Int J Cancer*, 1972. 10(1): p. 77-91.
58. Bender, C.M., M.M. Pao, and P.A. Jones, *Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines*. *Cancer Res*, 1998. 58(1): p. 95-101.
59. Elliott, A.Y., et al., *In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract*. *Cancer Res*, 1976. 36(2 Pt 1): p. 365-9.
60. Schulz, W.A., et al., *Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer*. *Mol Cancer*, 2007. 6: p. 14.
61. Goering, W., T. Ribarska, and W.A. Schulz, *Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer*. *Carcinogenesis*, 2011. 32(10): p. 1484-92.
62. Pinkerneil, M., et al., *Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms*. (1538-8514 (Electronic)).
63. Kreimer, U., et al., *HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma*. *Front Oncol*, 2013. 3: p. 255.
64. Venturelli, S., et al., *Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells*. *Mol Cancer Ther*, 2013. 12(10): p. 2226-36.

65. Fenaux, P., et al., *Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study*. *The Lancet Oncology*, 2009. 10(3): p. 223-232.
66. Qin, T., et al., *Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines*. *Blood*, 2009. 113(3): p. 659-67.
67. Bender, C.M., et al., *Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(10): p. 6690-8.
68. Stegmann, A.P., et al., *De novo induced mutations in the deoxycytidine kinase (dck) gene in rat leukemic clonal cell lines confer resistance to cytarabine (AraC) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)*. *Leukemia*, 1995. 9(6): p. 1032-8.
69. Stresemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. *Int J Cancer*, 2008. 123(1): p. 8-13.
70. Palli, S.S., et al., *DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B*. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(2): p. 752-71.
71. Thievensen, I., et al., *E-cadherin involved in inactivation of WNT/beta-catenin signalling in urothelial carcinoma and normal urothelial cells*. *Br J Cancer*, 2003. 88(12): p. 1932-8.
72. Scartozzi, M., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene promoter methylation and cetuximab treatment in colorectal cancer patients*. *Br J Cancer*, 2011. 104(11): p. 1786-90.
73. Qiu, Y.Y., B.L. Mirkin, and R.S. Dwivedi, *Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells*. *Cancer Detect Prev*, 2005. 29(5): p. 456-63.
74. Alcazar, O., et al., *Epigenetic regulation by decitabine of melanoma differentiation in vitro and in vivo*. *Int J Cancer*, 2012. 131(1): p. 18-29.
75. Roulois, D., et al., *DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts*. *Cell*, 2015. 162(5): p. 961-73.
76. Patel, K., et al., *Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme*. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(13): p. 4313-24.
77. Treppendahl, M.B., L.S. Kristensen, and K. Gronbaek, *Predicting response to epigenetic therapy*. *J Clin Invest*, 2014. 124(1): p. 47-55.
78. Samlowski, W.E., et al., *Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(17): p. 3897-905.
79. Srivastava, P., et al., *Immunomodulatory action of the DNA methyltransferase inhibitor SGI-110 in epithelial ovarian cancer cells and xenografts*. *Epigenetics*, 2015. 10(3): p. 237-46.
80. Ghoshal, K., et al., *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(11): p. 4727-41.
81. Goel, S., et al., *CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity*. *Nature*, 2017. 548(7668): p. 471-475.
82. Qin, T., et al., *Epigenetic synergy between decitabine and platinum derivatives*. *Clin Epigenetics*, 2015. 7(1): p. 97.
83. Jiang, T., et al., *Chidamide and decitabine can synergistically induce apoptosis of Hodgkin lymphoma cells by up-regulating the expression of PU.1 and KLF4*. *Oncotarget*, 2017. 8(44): p. 77586-77594.
84. Leadem, B.R., et al., *A KDM5 Inhibitor Increases Global H3K4 Trimethylation Occupancy and Enhances the Biological Efficacy of 5-Aza-2'-Deoxycytidine*. *Cancer Res*, 2018. 78(5): p. 1127-1139.
85. Skowron, M.A., et al., *Applying the chicken embryo chorioallantoic membrane assay to study treatment approaches in urothelial carcinoma*. *Urol Oncol*, 2017. 35(9): p. 544 e11-544 e23.

86. Kobayashi, T., et al., *Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges*. Nat Rev Cancer, 2015. 15(1): p. 42-54.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt insbesondere Herrn Professor Wolfgang A. Schulz für die Betreuung meiner Doktorarbeit, der zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Herr Professor Schulz war stets geduldig und unterstützend tätig, von Beginn der Forschungsarbeiten bis hin zur Fertigstellung der Dissertation.

Ebenso möchte Ich mich beim gesamten Team des urologischen Forschungslabors bedanken für die intensive Betreuung.

Herrn Professor P. Albers danke ich für die Nutzung des urologischen Forschungslabors.

Bei der Düsseldorf School of Oncology möchte ich mich für die Unterstützung mittels eines Stipendiums und strukturierten Ausbildungsprogramms während meiner Forschungszeit bedanken.

Bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung und Motivation bedanken, ohne diese wäre dieses Projekt nicht zu realisieren gewesen.