

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

**Molekulare Mechanismen erworbener Cisplatinresistenz in
Urothelkarzinomzellen unter besonderer Berücksichtigung
der DNA-Schadensantwort**

Dissertation

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

Vorgelegt von
Annika Höhn, geb. Geist

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Höhn, A.; Krüger, K.; Skowron, M. A.; Bormann, S.; Schumacher, L.; Schulz, W. A.; Hoffmann, M. J.; Niegisch, G.; Fritz, G.:

Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin resistance of urothelial carcinoma cells

Oncotarget, Vol. 7 (2016), Nr. 27, S. 41320-41335

Zusammenfassung (deutsch)

Die Prognose lokal fortgeschrittener und metastasierter Urothelkarzinome wird durch Resistenzentwicklung gegenüber den in der Erstlinientherapie eingesetzten Cisplatin-basierten Chemotherapien erheblich limitiert. Cisplatin bildet Intra- und Interstrang-Crosslinks an der DNA, was die Aktivierung der DNA-Schadensantwort mit Einleitung eines Zellzyklusarrests sowie der DNA-Reparatur zur Folge hat. Irreparable DNA-Schäden führen zur Einleitung der Apoptose. Ziel dieser Arbeit ist, Mechanismen erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen mit Fokus auf die DNA-Schadensantwort zu evaluieren und deren Bezug zur Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) zu untersuchen. Dazu wurden die beiden Urothelkarzinom-Zelllinien J-82 und RT-112 als Repräsentanten eines mesenchymalen bzw. epithelialen Phänotyps - angelehnt an die klinische Verabreichung von Cisplatin - pulsatil (zyklisch intermittierend) über mehrere Wochen mit Cisplatin behandelt. Beide Zelllinien wiesen während der Resistenzentwicklung deutliche phänotypische Veränderungen im Sinne der EMT auf. Die entstandenen zwei- bis dreifach resistenteren Zelllinien J-82^R und RT-112^R zeigten beide eine erhöhte G₂/M-Fraktion in der Durchflusszytometrie. Während eine geringere SubG₁-Fraktion reduzierte Apoptose in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen implizierte, wiesen die J-82^R-Zellen eine geringere Anzahl Cisplatin-induzierter DNA-Schäden und eine tendenziell verminderte Aktivierung der DNA-Schadensantwort auf als die jeweiligen Ursprungszellen. In der mRNA-Expressionsanalyse waren in den mesenchymaleren J-82^R-Zellen die antioxidativen Enzyme *Hämoxygenase 1* (HMOX1) und *Glutathion-S-Transferase μ 1* (GSTM1) hochreguliert. In keiner der beiden Cisplatin-resistenten Zelllinien ergaben sich hingegen Veränderungen der mRNA-Expression von DNA-Reparaturfaktoren. Auch die mRNA-Expression der meisten Resistenzfaktoren mit Bezug zur Apoptose blieb unverändert. Überraschenderweise war jedoch in beiden Cisplatin-resistenten Zelllinien die mRNA von *XIAP-Associated Factor 1* (XAF1) überexprimiert, was zunächst paradox erscheint, da XAF1 ein Inhibitor des antiapoptischen Proteins *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein* (XIAP) ist. Unter verschiedenen getesteten Modulatoren der DNA-Schadensantwort erwies sich ein selektiver Inhibitor der Checkpointkinase 1 (CHK1) in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen als signifikant effektiver im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven J-82-Zellen. CHK1-Inhibition könnte somit ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen sein.

Zusammenfassung (englisch)

The prognosis of locally advanced and metastatic urothelial carcinoma is limited considerably by the development of cisplatin resistance. Cisplatin-based chemotherapies are the first line treatment of urothelial carcinoma. Cisplatin forms intra- and interstrand crosslinks at the DNA resulting in activation of the DNA damage response followed either by a cell cycle arrest and DNA repair mechanisms or by apoptosis in case of irreparable DNA damage. To evaluate the mechanisms of acquired cisplatin resistance focussing on the DNA damage response and their relation to epithelial-mesenchymal transition (EMT), two urothelial carcinoma cell lines – RT-112 and J-82, representing an epithelial or mesenchymal phenotype respectively – were exposed to pulsatile cisplatin application over several weeks according to the clinical administration of cisplatin in chemotherapies. Both RT-112 and J-82 showed morphologic changes relating to EMT during the development of cisplatin resistance. The cisplatin-resistant cell lines RT-112^R and J-82^R resulting from the selection were 2-3-fold more resistant to cisplatin treatment than the corresponding parental cells. They both showed a significantly increased G₂/M-fraction in flow cytometry. While in RT-112^R cells the detected reduced SubG₁-fraction indicates decreased apoptosis, J-82^R cells showed a lower amount of Cisplatin-induced DNA damage and a tendency towards reduced activation of the DNA damage response compared to their respective parental cells. In the mesenchymal-like J-82^R cells, the mRNA expression of the antioxidative enzymes *Heme Oxygenase 1* (HMOX1) und *Glutathione S-Transferase μ1* (GSTM1) was upregulated. None of the cisplatin resistant cell lines exhibited alterations in the mRNA expression of DNA repair factors in qRT-PCR. The mRNA expression of most resistance factors concerning the apoptotic pathway also remained unchanged. Surprisingly the mRNA of *XIAP-Associated Factor 1* (XAF1) was overexpressed in both J-82^R and RT-112^R, a finding appearing contradictory at first as XAF1 inhibits the antiapoptotic protein *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein* (XIAP). Amongst several modulators of the DNA damage response, a selective inhibitor of checkpoint kinase 1 (CHK1) was significantly more effective in the cisplatin resistant cell line J-82^R than in the cisplatin sensitive cell line J-82. CHK1 inhibition could therefore be a promising therapeutic strategy to overcome acquired cisplatin resistance in urothelial carcinoma.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 Binding Protein 1
9-1-1	Proteinkomplex aus Rad9, Rad1 und Hus1
γH2AX	Histonvariante H2AX, an Serin 139 phosphoryliert
ΔNp63	N-terminal truncated p63
ΔNp73	N-terminal truncated p73
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AP-1	Activator Protein 1
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARE	Antioxidant Response Element
ASK1	Apoptosis Signal regulating Kinase 1
ATF2	Activating Transcription Factor 2
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	ATPase copper transporting α
ATP7B	ATPase copper transporting β
ATR	Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3 related
ATRIP	ATR Interacting Protein
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
BARD1	BRCA1-Associated RING Domain protein 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large protein
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BIR	Break-Induced Replication
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat-Containing protein 5; Survivin (IAP = Inhibitor of Apoptosis Protein)
BRCA (1/2)	Breast Cancer (1/2), early onset

c-Abl	cellular A belson murine leukemia viral oncogene homolog 1
c-IAP	cellular I nhibitor of A poptosis P rotein
c-Jun	cellular avian sarcoma virus 17 (japanisch: junana = 17) homolog
c-Myc	cellular M yelocytomatosis onogene
CAD	Caspase-Activated D Nase
CAF	Cancer-Associated Fibroblasts
CARD	Caspase A ctivation and R ecruitment D omain
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CD90	Cluster of D ifferentiation 90
Cdc25(A-C)	Cell d ivision cycle 25 (A-C) phosphatase
CDK (1-6)	Cyclin- D ependent K inase (1-6) (deutsch: Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	complementary D N A (deutsch: komplementäre DNA)
CHK (1/2)	C heckpointkinase (1/2)
CHOP	C /EBP H omologous P rotein (C/EBP=CCAAT/Enhancer Binding Protein)
CK14	Cytokeratin 14
COX2	Cyclooxygenase 2
CPC	Chromosomal P assenger C omplex
CRISPR	Clustered R egularly I nterspaced S hort P alindromic R epeats
CRM1	Chromosomal R egion M aintenance 1
CT	Computertomographie
CtIP	C -terminal B inding P rotein I nteracting P rotein
CTR1	Copper T ransporter 1
CX3	Komplex aus RAD51C und XRCC3
D-Loop	D isplacement L oop
dATP	D esoxyadenosin t riphosphat
dHJ	double H olliday J unction
DISC	D eath- I nducing S ignaling C omplex
DNA	D eoxyribonucleic A cid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	D N A -dependent P rotein K inase
DNA-PKcs	D N A -dependent P rotein K inase catalytic subunit
DR5	D eath R eceptor 5

DYRK1B/	Dual specificity tyrosine -phosphorylation- Regulated Kinase 1B
MIRK	Minibrain-Related Kinase
E2F	E2 Transcription Factor
EGF	Epidermal G rowth Factor
EGFR	Epidermal G rowth Factor R eceptor
EME1	Essential M eiotic Endonuclease 1
EMT	Epithelial- M esenchymale T ransition
ER	Endoplasmatisches R etikulum
ERBB2/	v- Erb-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HER2	Human Epidermal growth factor R eceptor 2
ERCC1	Excision R epair C ross- C omplementation group 1
ERCC2/	Excision R epair C ross- C omplementation group 2
XPD	Xeroderma P igmentosum, complementation group D
ERCC3/	Excision R epair C ross- C omplementation group 3
XPB	Xeroderma P igmentosum, complementation group B
ERCC4/	Excision R epair C ross- C omplementation group 4
XPF	Xeroderma P igmentosum, complementation group F
ERCC6/	Excision R epair C ross- C omplementation group 6
CSB	Cockayne S ndrome group B protein
ERCC8/	Excision R epair C ross- C omplementation group 8
CSA	Cockayne S ndrome group A protein
ERK	Extracellular S ignal- R egulated K inase
ETAA	Ewing T umor A ssociated A ntigen
EXO1	Exon uklease 1
FA	Fanconi A nämie
FADD	Fas- A ssociated via D eath D omain
FANC (A-T)	F anconi anemia complementation group (A-T)
Fas/	F as cell surface death receptor /
CD95	C luster of D ifferentiation 95
FGFR	F ibroblast G rowth Factor R eceptor
Fos / c-Fos	cellular F inkel- B iskis- J inkins murine o steosarcoma oncogene homolog
FOXO	F orkhead B ox P rotein O
G₁-Phase	G ap- P hase 1

G₂-Phase	Gap-Phase 2
GDP	Guanosindiphosphat
GGR	Global Genomic Repair
GP130	Glykoprotein 130
GPX1	Glutathionperoxidase 1
GRB2	Growth factor Receptor Binding protein 2
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GSTM1	Glutathion-S-Transferase μ 1
GTP	Guanosintriphosphat
GULP1	Engulfment adapter Phosphotyrosine binding domain containing 1
H2AX	Histonvariante H2AX
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatocellular Carcinoma (deutsch: Hepatozelluläres Karzinom)
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HIPK2	Homeodomain Interacting Protein Kinase 2
HMOX1	Hämoxygenase 1 (= HO-1)
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (deutsch: Plattenepithelkarzinom des Kopf-/Hals-Bereichs)
HO-1	Hämoxygenase 1 (= HMOX1)
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
HSP (70/90)	Heat Shock Protein (70/90)
HSPA1B	Heat Shock Protein A1B, gehört zur HSP70-Familie
HR	Homologous Recombination
HtrA2/	High temperature requirement protein A2
Omi	Omi stress-regulated endoprotease
Hus1	Hydroxyurea sensitive 1
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated DNase
IC₅₀/	Inhibitory Concentration 50%/80%, hier: inhibitorische Konzentration, bei
IC₈₀	der das Zellwachstum um 50% bzw. 80% inhibiert wird

IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB-Kinase
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRF1	Interferon R egulatory F actor 1
JAK	J anus k inase
jBid	durch JNK-vermittelte Spaltung entstandenes Bid -Fragment
JNK (1/2)	J un- N -terminal K inase (1/2)
Jun	avian sarcoma virus 17 (japanisch: jun ana = 17) homolog
K-Ras	K irsten R at sarcoma virus oncogene homolog, eine Ras-Isoform
kDa	K ilodalton
KEAP1	K elch-like Enoyl-CoA Hydratase- A ssociated P rotein 1
Ku (70/80)	Lupus Ku autoantigen protein p70/80
M-Phase	M itose-Phase
MAMs	M itochondria- A ssociated M embranes
MAP	M itogen A ctivated P rotein
MAP-2K	M itogen A ctivated P rotein K inase K inase
MAP-3K	M itogen A ctivated P rotein K inase K inase K inase
MAPK	M itogen A ctivated P rotein K inase
Mcl-1	M yeloid cell leukemia protein 1
MDC1	M ediator of D N A damage C heckpoint protein 1
Mdm2	M ouse d ouble m inute 2 homolog
MEK	M APK E RK K inase
miRNA	m icro R NA
MK2	M APK-activated protein K inase 2
MKK	M itogen-activated Protein K inase K inase (siehe MAP-2K)
MKP1	M itogen-activated protein K inase P hosphatase 1
MLH1	M utator protein L H omolog 1
MMEJ	M icrohomology- M ediated E nd J oining
MMR	D N A M ismatch R epair
MPF	M itose- P romoting F actor / M aturation- P romoting F actor, Komplex aus CDK1 und Cyclin B

MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions pore
MRE	Metal Response Element
MRE11	Meiotic Recombination 11 Homolog 1
MRN	M=MRE11, R=RAD50, N=NBS1 MRN-Komplex: Proteinkomplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
mRNA	messenger RNA
MRP (2/5)	Multidrug Resistance-associated Protein (2/5)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH (2/6)	Mutator protein S Homolog (2/6)
MT1A	Metallothionein 1A
mtDNA	mitochondriale DNA
MTF2	Metal Response Element Binding Transcription Factor 2
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
mTORC	mechanistic Target Of Rapamycin Complex
MUC1	Mucin 1
MUC1-C	Mucin 1, C-terminale Untereinheit
MUS81	MMS and UV-Sensitive protein 81 (MMS=Methylmethansulfonat; UV= Ultraviolett)
Mut (L/S)	Mutator protein (L/S)
MutLa	Mutator protein L α , Heterodimer aus MLH1 und PMS2
MutSa	Mutator protein S α , Heterodimer aus MSH2 und MSH6
MutSβ	Mutator protein S β , Heterodimer aus MSH2 und MSH3
Myc	Myelocytomatosis onogene
Myc-nick	Spaltprodukt, das bei der Spaltung von Myc durch Calpain entsteht
MVAC	M=Methotrexat, V=Vinblastin, A=Adriamycin(=Doxorubicin), C=Cisplatin MVAC-Schema: Chemotherapieprotokoll mit den o.g. Substanzen
NAD⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid , oxidierte Form
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat , reduzierte Form
NAT2	N-Acetyltransferase 2
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1
NEMO	NF-κB Essential Modulator
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur

NF-κB	Nuclear Factor kappa -light-chain-enhancer of activated B -cells
NF-Υ	Nuclear Transcription Factor Υ
NHEJ	Non- H omologous End J oining
NMD	Nonsense-mediated m RNA D ecay
NRF2	Nuclear factor erythroid 2 R elated F actor 2
NSCLC	Non- S mall-Cell Lung Carcinoma (deutsch: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
O₂^{•-}	Superoxid-Anion
OGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1
p16/ CDKN2A	Protein p16 CDK-Inhibitor 2A
p21	Protein p21 ; CDK-Inhibitor 1A
p38	MAP-Kinase p38
p53	Tumorprotein p53
p63	Tumorprotein p63
p73	Tumorprotein p73
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PARC	p53-associated P arkin-like Cytoplasmic protein
PARP	Poly(A D P - R ibose)- P olymerase
PAXX	Paralog of X R C C4 and X L F
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (deutsch: Polymerase-Kettenreaktion)
PD-1	Programmed cell Death 1
PD-L1	Programmed cell Death 1 Ligand 1
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3 -Kinase
PIN1	Peptidylpropyl-cis/trans-Isomerase NIMA-interacting 1 (NIMA = Never In Mitosis A)
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMS2	Postmeiotic Segregation increased 2

PNK	Polynukleotidkinase
POLH	DNA-Polymerase η
Puma	P53 upregulated modulator of apoptosis
qRT-PCR	Real-time quantitative Reverse Transcription PCR
RAD (1-54)	Radiation repair protein (1-54)
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma protein kinase
RAP80	Receptor Associated Protein 80
Ras	Rat sarcoma GTPase
Rb	Retinoblastom-Protein
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonucleic Acid (deutsch: Ribonukleinsäure)
RNF (8/168)	Ring Finger Protein (8/168)
ROS	Reactive Oxygen Species (deutsch: reaktive Sauerstoffspezies)
RPA	Replication Protein A
S-Phase	Synthese-Phase
SCLC	Small-Cell Lung Carcinoma (deutsch: kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDSA	Synthesis-Dependent Strand Annealing
SIAH	Seven In Absentia Homolog 1
siRNA	small interfering RNA
SLX4/ FANCP	Synthetic Lethal of unknown function 4 Fanconi anemia complementation group P
Smac/ DIABLO	Second mitochondria derived activator of caspases / Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point
SOS	Son Of Sevenless
SOX2	SRY-Box 2 (SRY = Sex Detreeming Region of Y)
STAT (1-3)	Signal Transducer and Activator of Transcription (1-3)
SubG₁	Fraktion mit reduziertem DNA-Gehalt (weniger als die G₁-Fraktion) in der Propidiumiodid-Durchflusszytometrie
SWSAP1	SWS1-Associated Protein 1 (SWS1 = SWIM domain-containing and Srs2-interacting protein 1)
TAK1	Transforming growth factor β-Activated Kinase 1
TAO	Thousand And One amino acids protein

TAp63	Transactivation domain containing p63
TCR	Transcription-Coupled Repair
TFIIH	Transcription Factor IIH
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNF (α)	Tumornekrosefaktor (α)
TNFAIP2	TNFα-Induced Protein 2
TNM	T= Tumor , N= Nodus , M= Metastasen TNM-Klassifikation: System zur Stadieneinteilung maligner Tumore
TopBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAIL	TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TUR-BT	Transurethrale Resektion eines Blasentumors
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
UVSSA	UV-Stimulated Scaffold protein A (UV=Ultraviolett)
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless/Integrated
XAF1	XIAP-Associated Factor 1
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
XLF	XRCC4-Like Factor
XPA	Xeroderma Pigmentosum, complementation group A
XPC	Xeroderma Pigmentosum, complementation group C
XPG/ ERCC5	Xeroderma Pigmentosum, complementation group G Excision Repair Cross-Complementation group 5
XRCC (2-4)	X-Ray Repair Cross Complementing protein (2-4)
YAP1	Yes-Associated Protein 1
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bösartige Tumoren der Harnblase	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Histologie des Urothels	2
1.1.4 Epithelial-Mesenchymale Transition	3
1.1.5 Symptomatik	3
1.1.6 Diagnostik	4
1.1.7 Stadieneinteilung	4
1.1.8 Stadienabhängige Prognose	5
1.1.9 Therapieoptionen	5
1.2 Cisplatin	6
1.2.1 Klinische Verwendung	6
1.2.2 Vergleich mit anderen Platinverbindungen	6
1.2.3 Wirkmechanismus	7
1.2.3.1 Interaktion von Cisplatin mit der DNA	7
1.2.3.2 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für Cisplatin-induzierte Toxizität ..	9
1.3 Die DNA-Schadensantwort und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz	10
1.3.1 ATM, ATR und DNA-PK - Die Initiatoren der DNA-Schadensantwort	10
1.3.1.1 Aktivierung von ATM	11
1.3.1.2 Aktivierung von ATR	11
1.3.1.3 Aktivierung der DNA-PK	12
1.3.2 Frühe Schritte der DNA-Schadensantwort	12
1.3.2.1 Phosphorylierung der Histonvariante H2AX	12
1.3.2.2 Phosphorylierung von MDC1	13
1.3.2.3 Aktivierung von 53BP1 und Bedeutung für die DNA-Schadensantwort ..	13
1.3.2.4 Aktivierung von BRCA1 und Bedeutung für die DNA-Schadensantwort .	14
1.3.2.5 Poly-ADP-Ribosylierung	14
1.3.3 Regulation der Transkription im Zuge der DNA-Schadensantwort	16
1.3.3.1 Bedeutung von p53 für die DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz.....	16
1.3.3.2 Bedeutung von p63-Isoformen für die DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz.....	18

1.3.3.3 Bedeutung des c-Abl-/p73-Signalwegs für die DNA-Schadensantwort ...	19
1.3.3.4 Bedeutung von NF-κB für die DNA-Schadensantwort	20
1.3.3.5 Bedeutung von p21 für die DNA-Schadensantwort	20
1.3.4 Zellzyklusregulation im Rahmen der DNA-Schadensantwort	21
1.3.4.1 G ₁ /S-Checkpoint	22
1.3.4.2 Intra-S-Checkpoint	24
1.3.4.3 G ₂ /M-Checkpoint	25
1.3.5 Bedeutung von MAP-Kinase-Signalwegen für die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz	25
1.3.5.1 Jun-N-terminale Kinasen (JNKs)	26
1.3.5.2 p38	28
1.3.5.3 Extracellular Signal Regulated Kinases (ERKs)	30
1.4 DNA-Reparaturmechanismen und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz	31
1.4.1 Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Läsionen	31
1.4.1.1 Nukleotid-Exzisionsreparatur	31
1.4.1.1 a) Bedeutung von ERCC1 für Cisplatinresistenz	32
1.4.1.2 Mismatch-Reparatur (MMR)	33
1.4.1.2 a) Bedeutung von MSH2 und MLH1 für Cisplatinresistenz	34
1.4.1.3 Transläsionssynthese	34
1.4.1.3 a) Bedeutung der DNA-Polymerase η (POLH) für Cisplatinresistenz ...	35
1.4.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	35
1.4.2.1 Homologous Recombination (HR)	36
1.4.2.1.1 Break-Induced Replication (BIR)	37
1.4.2.1.2 Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA)	37
1.4.2.1.3 Double Holliday Junction (dHJ)	38
1.4.2.1 a) Bedeutung von BRCA1 und BRCA2 für Cisplatinresistenz	38
1.4.2.1 b) Funktion von XRCC3 und dessen Bedeutung für Cisplatinresistenz	39
1.4.2.2 Non-Homologous End Joining (NHEJ)	40
1.4.3 Reparatur von DNA-Interstrang-Crosslinks: Der Fanconi-Anämie-Signalweg	41
1.4.4 Rolle der Poly-ADP-Ribosylierung für die DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur	42
1.5 Die Apoptose und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz	43
1.5.1 Ablauf der Apoptose	43
1.5.1.1 Der intrinsische Signalweg	44
1.5.1.2 Der extrinsische Signalweg	47

1.5.1.3 Die gemeinsame Endstrecke der Apoptose	47
1.5.2 Cisplatinresistenz-vermittelnde Proteine mit Bezug zur Apoptose	48
1.5.2 a) Bcl-2	48
1.5.2 b) XAF1	49
1.5.2 c) Survivin	50
1.5.2 d) Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs)	52
1.5.2 e) Calpaine	54
1.5.2 f) Caspasen	55
1.6 Cisplatin-Resistenzmechanismen ohne Bezug zur DNA-Schadensantwort, DNA-Reparatur oder Apoptose	56
1.6.1 Membrantransporter	56
1.6.1 a) Der Influx-Transporter CTR1	56
1.6.1 b) Die Efflux-Transporter ATP7A und ATP7B	57
1.6.1 c) Der Efflux-Transporter MRP2	57
1.6.2 Intrazytoplasmatische Nukleophile und antioxidative Enzyme	57
1.6.2 a) Glutathionperoxidase GPX1	58
1.6.2 b) Glutathion-S-Transferase μ 1 (GSTM1)	59
1.6.2 c) Metallothionein MT1A	59
1.6.2 d) Hämoxygenase 1 (HO-1, HMOX1)	60
1.6.2 e) Kinase DYRK1B/MIRK	60
1.6.3 Resistenzmechanismen ohne direkten Bezug zur Cisplatin-induzierten Signaltransduktion	61
1.6.3 a) ERBB2/HER2 und der PI3-Kinase/Akt-Signalweg	61
1.6.3 b) Hitzeschockproteine	63
1.7 Ziele der Arbeit	65
2 Publizierte Originalarbeit	66
<i>Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin resistance of urothelial carcinoma cells</i>	
Höhn, A.; Krüger, K.; Skowron, M. A.; Bormann, S.; Schumacher, L.; Schulz, W. A.; Hoffmann, M. J.; Niegisch, G.; Fritz, G.	
Oncotarget, Vol. 7, Nr. 27, S. 41320-41335 (2016)	
3 Ergänzung der Ergebnisse	67

4 Diskussion	69
4.1 Diskussion von in der Studie angewandten Methoden	69
4.1.1 Selektion der Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen	69
4.1.1.1 Vergleich des Selektionsschemas mit der klinischen Anwendung von Cisplatin	69
4.1.1.2 Vor- und Nachteile des Selektionsschemas im Vergleich zu kontinuierlicher Cisplatinexposition	70
4.1.1.3 Beurteilung des pulsatilen Expositionsschemas im Hinblick auf die Anwendbarkeit in Zellkulturmodellen	70
4.1.2 Detektion von γ H2AX- und 53BP1-Foci durch Immunfluoreszenz	71
4.1.2.1 Eignung von γ H2AX- und 53BP1-Foci als Marker für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden.....	71
4.1.2.2 Zeitliche Aspekte bei der Entstehung von γ H2AX- und 53BP1-Foci	71
4.1.3 Berücksichtigung dosisbezogener Aspekte bei der Interpretation der Ergebnisse	72
4.2 Bedeutung der Epithelial-Mesenchymalen Transition für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen.....	73
4.2.1 Bedeutung von Tumorstammzellen für den Zusammenhang von Cisplatinresistenz und EMT.....	74
4.2.2 Zusammenhang zwischen EMT und reaktiven Sauerstoffspezies	76
4.2.3 Beziehung zwischen EMT und Proteinen der HSP70-Familie	77
4.3 Bedeutung von Veränderungen der DNA-Schadensantwort für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen.....	77
4.3.1 Veränderungen der Formierung von γ H2AX- und 53BP1-Foci im Vergleich der Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien	77
4.3.2 Veränderungen der Zellzyklusregulation in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen	78
4.3.3 Pharmakologische Modulation der DNA-Schadensantwort als Strategie zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen	80
4.3.3.1 Checkpointkinase-Inhibitoren	81
4.3.3.1.1 Wirksamkeit von CHK-Inhibitoren bei der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin in präklinischen Studien	81
4.3.3.1.2 Tumorzellen mit erhöhter Suszeptibilität gegenüber CHK1-Inhibitoren	81
4.3.3.1.3 Bedeutung der erhöhten Sensitivität der Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen gegenüber CHK1-Inhibitoren	82
4.3.3.1.4 Erschwerte klinische Etablierung von CHK1-Inhibitoren	83

4.4 Bedeutung von DNA-Reparaturfaktoren für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen	84
4.4.1 Beteiligung in dieser Arbeit untersuchter DNA-Reparaturfaktoren an der Resistenzentwicklung	84
4.4.2 Potentielle Beteiligung hier nicht untersuchter DNA-Reparaturfaktoren an der Resistenzentwicklung – Ausblick	85
4.4.2.1 Fanconi-Anämie-Signalweg	85
4.4.2.2 DNA-Polymerase ζ	86
4.5 Bedeutung von Cisplatin-Resistenzmechanismen mit Bezug zur Apoptose in Urothelkarzinomzellen.....	87
4.5.1 Veränderungen der SubG1-Fraktion in der Durchflusszytometrie in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen	87
4.5.2 Bedeutung der paradoxen Hochregulierung von XAF1 für die Cisplatin-resistenz von Urothelkarzinomzellen.....	88
4.5.2.1 Rolle von XAF1 als Zellzyklusregulator	88
4.5.2.2 Rolle von XAF1 bei der Umverteilung von XIAP in den Nukleus	89
4.5.2.3 Bezugnahme auf andere Studien, in denen eine paradoxe Hochregulierung von XAF1 nachgewiesen wurde	89
4.5.2.3.1 Hypothese zum Zusammenhang von XAF1 und EMT	90
4.5.2.3.2 Prognostischer Einfluss einer paradoxen Hochregulierung von XAF1 in anderen Tumorentitäten.....	90
4.5.2.4 XAF1 als potentielles therapeutisches Ziel in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen	90
4.5.2.5 Hochregulierung von XAF1 als möglicher Nebeneffekt eines übergeordneten Signalwegs	91
4.5.2.5.1 Zusammenhang zwischen dem JNK-Signalweg und der XAF1-Expression	91
4.5.2.5.2 Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor STAT1 und der XAF1-Expression.....	92
4.5.2.6 Inhibition der Translation von XAF1 als mögliche Ursache der paradoxen Hochregulierung der XAF1-mRNA	93
4.5.2.7 Mögliche Bedeutung dysfunktionaler Spleißvarianten von XAF1	94
4.5.2.8 Zusammenfassung der Hypothesen zur paradoxen Hochregulierung von XAF1	94
4.6 Bedeutung von Cisplatin-Resistenzmechanismen ohne Bezug zur DNA-Schadensantwort oder Apoptose in Urothelkarzinomzellen.....	95
4.6.1 Paradoxe Hochregulierung von Efflux-Transportern	95
4.6.2 Überexpression antioxidativer Enzyme	97

4.6.2.1 Die Hämoxxygenase 1 als potentieller Angriffspunkt zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz	97
4.6.2.2 Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NRF2 als mögliche Ursache der Überexpression antioxidativer Enzyme	97
4.6.2.3 Zusammenhang zwischen Zellzyklusregulatoren und der Expression antioxidativer Enzyme	98
4.7 Ausblick: Weitere potentielle Angriffspunkte zielgerichteter Therapien zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen	99
4.7.1 Autophagie-Inhibitoren	100
4.7.2 Modulation des Raf/MEK/ERK und PI3-Kinase/ Akt/mTOR-Signalwegs ...	100
4.7.2.1 Inhibition des Onkoproteins MUC1-C	101
4.7.2.2 Inhibition des Transmembranproteins Glykoprotein 130	101
4.7.2.3 Inhibition von Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	101
4.7.2.3.1 FGFR-Inhibitoren	102
4.7.2.3.2 EGFR-Inhibitoren	102
4.7.2.4 Zusammenfassung zu Modulatoren des Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/ Akt/mTOR-Signalwegs	102
4.7.3 Histondeacetylase-Inhibitoren	103
4.7.4 Androgenrezeptor-Antagonisten	104
4.8 Schlussfolgerungen	104
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Bösartige Tumoren der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie

Bösartige Neubildungen der Harnblase sind die weltweit neunthäufigste Krebsart [1], unter Männern sogar die siebthäufigste [2]. Männer sind drei- bis viermal häufiger von Harnblasenkrebs betroffen als Frauen [3]. Die höchste Inzidenz weisen hochentwickelte Industrienationen auf [4].

1.1.2 Ätiologie

Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Harnblasentumoren ist Tabakkonsum, worauf ca. 50% der Neuerkrankungen an Urothelkarzinomen zurückgeführt werden [5]. Es wird angenommen, dass dieser Risikofaktor die hohe Inzidenz von Harnblasenkrebs in hochentwickelten Industrienationen erklärt [4]. Darüber hinaus stellt die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und chlorierten Kohlenwasserstoffen einen bedeutsamen Risikofaktor dar [6]. Davon sind z.B. Beschäftigte in der Gummi-, Textil-, Farb- und Metallindustrie betroffen [7]. Harnblasenkrebs ist bei relevanter Exposition gegenüber aromatischen Aminen in Deutschland eine anerkannte Berufskrankheit [8]. Schistosoma haematobium, ein Parasit, der vor allem in Afrika vorkommt, kann im Rahmen von chronischen Entzündungsreaktionen Plattenepithelkarzinome der Harnblase induzieren [9]. Dieser Risikofaktor bedingt die hohe Inzidenz von Blasenkrebs in Nordafrika, insbesondere in Ägypten [2]. Weitere erwiesene Risikofaktoren sind Trinkwasserkontamination durch Arsen sowie Exposition gegenüber flüssigen Metallen vor allem in Entwicklungsländern [10]. Auch andere Faktoren, die mit einer chronischen Reizung der Harnblase einhergehen, können die Entstehung von Blasenkrebs fördern, z.B. die dauerhafte Versorgung mit einem Blasenkatheter [11] oder medikamenten-induzierte Schädigungen, z.B. durch das Alkylanz Cyclophosphamid [12]. Außerdem kann eine stattgehabte Strahlentherapie im kleinen Becken die Entstehung von Blasenkrebs begünstigen [13].

Eine genetische Prädisposition für Urothelkarzinome stellen Defekte der N-Acetyltransferase NAT2, die an der Detoxifikation von aromatischen Aminen beteiligt ist [14] sowie der Glutathion-S-Transferase μ 1 (GSTM1) [15] dar. Ein weiterer genetisch bedingter Risikofaktor ist das Hereditäre Nicht-Polyposis assoziierte Kolorektale Karzinom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC, Lynch-Syndrom*). Es handelt sich um autosomal-dominant vererbte Gendefekte in der Mismatch-Reparatur, einem DNA-Reparaturmechanismus (siehe 1.4.1.2) [16]. Insbesondere sind die Gene MSH2, MSH6 und MLH 1 betroffen [17]. Die Mutation geht vor allem mit einem erhöhten Risiko für die frühzeitige Entartung von kolorektalen Adenomen einher, ist aber auch mit einem

erhöhten Risiko für Endometriumkarzinome und zahlreiche weitere Neoplasien assoziiert, u.a. Harnblasenkarzinome [16].

1.1.3 Histologie des Urothels

Histologisch handelt es sich bei Blasentumoren in über 90% der Fälle um Urothelkarzinome [18]. Weitere Entitäten sind z.B. Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome [18]. In dieser Arbeit werden Urothelkarzinomzellen untersucht. Das Urothel ist ein spezialisiertes epitheliales Gewebe, welches in den ableitenden Harnwegen vorkommt [19]. Es setzt sich aus einer Basalzellschicht, einer intermediären Schicht und den oberflächlichen Deckzellen, den sog. *Umbrella cells* zusammen [20]. Die Basalzellen bilden die unterste Schicht des Urothels. Sie sind einkernig und über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden [21]. Desmosomen verbinden Basalzellen mit den darüber liegenden Intermediärzellen [19].

Die Intermediärzellen bilden bei Menschen bis zu fünf Schichten aus [22]. Die Anzahl der Zellschichten scheint in Abhängigkeit vom Füllungszustand der Harnblase zu variieren; bei gefüllter Blase sind weniger Schichten, bei leerer Blase mehr Schichten erkennbar [20]. Die genauen Mechanismen dieser Anpassung insbesondere im Hinblick auf Zellkontakte zwischen den Intermediärzellen sind noch unklar [22]. Die Schicht von Intermediärzellen unmittelbar unterhalb des Urothels ist teilweise differenziert und weist Merkmale der Deckzellen auf, z.B. diskoide Vesikel und Uroplakine (siehe unten) [22]. Bei Verlust von Deckzellen können sie schnell ausdifferenzieren und die Funktion der Deckzellen übernehmen [23].

Die Deckzellen sind wesentlich größer als die anderen Zellen des Urothels, häufig polyploid und mehrkernig [20]. Sie enthalten diskoide Vesikel, die bei Zunahme des Blasenvolumens durch Exozytose in die Zellmembran integriert werden können [24]. Bei leerer Harnblase nehmen die Deckzellen eine buckelige Oberflächenform an, bei gefüllter Harnblase flachen sie deutlich ab; jede Deckzelle überdeckt dann mehrere Intermediärzellen [19]. In der Harnblase kann sich das Urothel somit an große intraluminalen Volumenschwankungen anpassen [25]. Um die darunter liegenden Gewebsschichten vor dem hochosmolaren Urin und seinen gewebsschädigenden Bestandteilen zu schützen, bilden die Deckzellen eine effektive Barriere [26]. Sie sind lumenseitig über wasserundurchlässige *Tight Junctions*, darunterliegenden *Zonulae adhaerentes* und *Maculae adhaerentes* interzellulär miteinander verbunden [27]. Spezialisierte Transmembranproteine, sogenannte Uroplakine, bilden an der apikalen Plasmamembran Plaques [24]. Die Plaques tragen zur Undurchlässigkeit und Abschirmung des Epithels gegenüber dem Urin bei [28]. Die basalseitige Zellmembran der Deckzellen setzt außerdem Mediatoren und Neurotransmitter frei, die Informationen über den Füllungszustand der Blase an die tiefer gelegenen Gewebsschichten übertragen, z.B. ATP, Adenosin und Acetylcholin sowie *Epidermal Growth Factor* (EGF) [29].

1.1.4 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Bei der Entstehung von Urothelkarzinomen ist die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) von Bedeutung [30]. Der Prozess ist in der Embryonalentwicklung physiologisch, wenn Zellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren, indem sie Zell-Zell-Kontakte aufgeben [31]. Sie können dann die Basalmembran des Epithels passieren und in andere Regionen einwandern, wo sie wieder zu Epithelzellen ausdifferenzieren [32]. Auch bei der Entstehung von Tumoren insbesondere im Zuge der Metastasierung ist der Prozess der EMT von entscheidender Bedeutung für die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen [31].

Aufgrund seiner hohen Spezialisierung und seiner Barrierefunktion gegenüber dem hochosmolaren Urin ist das Urothel stark polarisiert (siehe 1.1.3) [33]. Um migrieren zu können, muss die Zelle ihre Polarität aufgeben [33]. Die Epithelial-Mesenchymale Transition hat in Urothelkarzinomen durch Verlust von Zellkontakten und epithelialen Eigenschaften entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der Muskelinvasivität [30], die wiederum maßgeblich für Prognose und Therapieoptionen ist (siehe 1.1.8 und 1.1.9). Im Zuge der EMT verlieren die Zellen E-Cadherin und exprimieren verstärkt Vimentin [34]. E-Cadherin ist am Aufbau von epithelialen Zellkontakten, z.B. Zonulae adhaerentes und Desmosomen beteiligt [19]. Vimentin ist als Intermediärfilament Teil des Zytoskeletts mesenchymaler Zellen und wird in der Pathologie als Marker für mesenchymale Tumoren genutzt [35]. E-Cadherin und Vimentin dienen daher als Surrogatparameter für den Fortschritt der EMT einer Tumorzelle [34, 36]. In Urothelkarzinomen sind niedrige E-Cadherin- und hohe Vimentin-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert [36].

In dieser Arbeit werden die humanen Urothelkarzinom-Zelllinie RT-112 und J-82 verglichen. Während die Zelllinie RT-112 epithelialen Charakter und hohe E-Cadherin-Expression aufweist, wird J-82 als Zelllinie mit mesenchymalen Eigenschaften beschrieben und exprimiert vermehrt Vimentin [37, 38].

1.1.5 Symptomatik

Das Leitsymptom beim Harnblasenkarzinom ist die schmerzlose Makrohämaturie (makroskopisch sichtbares Blut im Urin) [39]. Weitere Symptome, die jedoch seltener auftreten, können Irritationen der Harnblase mit Dysurie (Schmerzen beim Wasserlassen), Pollakisurie (häufigem Wasserlassen) oder Harndrang sein [39]. Harnaufstau mit einhergehenden Flankenschmerzen, Harnverhalt sowie Beinödeme treten in der Regel in späteren Erkrankungsstadien auf und sind Folgen von lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum [40]. Symptome einer konsumierenden Erkrankung wie allgemeine Schwäche und Leistungsminderung, Tumoranämie, ungewollter Gewichtsverlust und Nachtschweiß stellen sich in der Regel erst in weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ein [40].

1.1.6 Diagnostik

Die Urinzytologie weist zwar eine hohe Spezifität, jedoch nur eine geringe Sensitivität für die Detektion von Harnblasenkarzinomen auf und ist zum Screening bzw. Ausschluss daher nicht geeignet [41]. Im Falle eines begründeten Verdachts auf ein Harnblasenkarzinom ist die transurethrale, ggf. Fluoreszenz-assistierte Zystoskopie der Goldstandard der Diagnostik [42]. Tumorsuspekte Befunde werden möglichst vollständig in toto oder fraktioniert (in sogenannter *Piece-Meal-Technik*) reseziert [42]. Anschließend erfolgt die histologische Aufarbeitung des gewonnenen Materials. Bei muskelinvasiven Tumoren sind zur Klärung der Tumorausdehnung und des Vorliegens von Fernmetastasen zusätzlich eine Computertomographie (CT) von Thorax und Abdomen sowie des kleinen Beckens mit urographischer Phase erforderlich [43]. Alternativ kann in Abdomen und Becken auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden [43].

1.1.7 Stadieneinteilung [44, 45]

Urothelkarzinome werden durch die TNM-Klassifikation in Stadien eingeteilt.

T bezeichnet dabei die Ausdehnung des Tumors, N die Anzahl und Ausdehnung befallener Lymphknoten, M das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Ta	Nicht-invasiver papillärer/exophytischer Tumor	Intraepithelialer Tumor ohne Überschreitung der Basalmembran
Tis	Nicht-invasiver flacher/nicht-exophytischer Tumor	
T1	Der Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe zwischen Epithel und Muskulatur (Lamina propria).	
T2	Der Tumor infiltriert die Blasenmuskulatur (Lamina muscularis propria). (T2a: Nur die innere Hälfte; T2b auch die äußere Hälfte der Muskulatur)	
T3	Der Tumor infiltriert das die Blase umgebende Bindegewebe. (T3a: nur mikroskopisch nachweisbar; T3b: auch makroskopisch nachweisbar)	
T4	Der Tumor zeigt blasenüberschreitendes Wachstum und infiltriert Prostata, Samenbläschen, Uterus oder Vagina (T4a) bzw. Becken- oder Bauchwand (T4b).	

N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Solitärer befallener Lymphknoten im kleinen Becken (hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal oder präsakral)
N2	Multiple befallene Lymphknoten im kleinen Becken (hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal oder präsakral)
N3	Befallene Lymphknoten entlang der Arteriae iliacae communes

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Mindestens eine Fernmetastase (M1a: in nicht-regionären Lymphknoten; M1b: außerhalb von Lymphknoten)

1.1.8 Stadienabhängige Prognose

In ca. 75% der Fälle wird Blasenkrebs in einem frühen, nicht muskelinvasiven Stadium diagnostiziert [6]. Ca. 25% der Blasenkarzinome sind jedoch bei Diagnosestellung bereits muskelinvasiv und mit einer schlechteren Prognose assoziiert [6]. Das Fünf-Jahres-Überleben bei invasiven, nicht-metastasierten Blasenkarzinomen beträgt im Mittel ca. 64%, wobei T3 oder T4a Tumore mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 36,5% eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen als T1 oder T2 Tumore mit 69% [46, 47]. 5% der Blasenkarzinome weisen bei der Erstdiagnose bereits Metastasen oder das Stadium T4b auf und haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5,5% eine sehr schlechte Prognose [46, 47].

1.1.9 Therapieoptionen

Nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome (Ta, Tis, T1) werden lokal zystoskopisch durch transurethrale Blasentumorresektion (TUR-BT) therapiert [48]. Abhängig vom Rezidivrisiko erfolgt eine Erhaltungstherapie mit lokaler Instillation inaktivierter Tuberkulose-Erreger (Bacille Calmette-Guérin, BCG), die eine lokale Immunantwort auslösen; dadurch werden die intraepithelialen Tumorzellen zerstört [49]. Auch Instillationen von Chemotherapeutika wie Mitomycin C, Epirubicin oder Pirarubicin werden zur Rezidivprophylaxe angewendet [50]. Eine zweite Resektion nach zwei bis sechs Wochen wird empfohlen, um residuelles Tumorgewebe zu detektieren und das Rezidivrisiko zu verringern [42]. Bei Rezidiven trotz intravesikaler Therapie oder G3-Histologie (geringer Differenzierung) sollte eine radikale Zystektomie auch bei T1-Tumoren erwogen werden [42].

Bei lokal muskelinvasiven Karzinomen (T2-T4a) ohne Fernmetastasierung ist eine radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie indiziert [45]. Eine Kombination mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie wird empfohlen, da diese das Überleben signifikant verbessert [45]. Bei metastasierten Karzinomen werden Zytostatika und ggf. Strahlentherapie in palliativer Intention eingesetzt. Zur Chemotherapie ist eine Kombinationstherapie aus Cisplatin und mindestens einem weiteren Zytostatikum erste Wahl, sofern keine Kontraindikationen gegenüber Cisplatin vorliegen [39]. Zumeist wird Gemcitabin zur Kombinationstherapie verwendet, aber auch Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin (MVAC-Schema) werden in Kombination mit Cisplatin zur Chemotherapie beim Harnblasenkarzinom eingesetzt [45]. Die Kombination aus Cisplatin mit Gemcitabin weist im metastasierten Stadium ein günstigeres Nebenwirkungsspektrum und geringere Normalgewebstoxizität auf als das MVAC-Schema [51]; für die neoadjuvante Therapie fehlen jedoch randomisierte, kontrollierte Studien. Cisplatin wird in beiden Kombinationstherapien in der Dosierung 70 mg / m² Körperoberfläche eingesetzt [52]. Nur Patienten, die aufgrund ihres Allgemeinzustands, einer vorbestehenden Nieren- oder Herzinsuffizienz, einer vorbestehenden Hörschädigung oder Neuropathie nicht für eine Cisplatin-basierte Therapie geeignet sind,

sollten in der Erstlinie mit Carboplatin/Gemcitabin oder alternativ bei positivem PD-L1-Status mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt werden [43].

Initial sprechen Urothelkarzinome häufig gut auf Cisplatin-basierte Chemotherapien an [53], obwohl einige Tumore intrinsische Cisplatinresistenz aufweisen [54]. Im Verlauf einer zunächst wirksamen Cisplatintherapie kann es jedoch auch zur erworbenen Resistenzentwicklung kommen [55], sodass das Tumorwachstum nicht mehr kontrolliert werden kann. Intrinsische und erworbene Resistenz gegenüber Cisplatin stellen ein erhebliches Problem in der Systemtherapie des Harnblasenkarzinoms dar [55]. Die noch immer erheblich eingeschränkte Langzeitprognose in fortgeschrittenen Tumorstadien (siehe 1.1.8) unterstreicht die Wichtigkeit und Dringlichkeit neue Therapieansätze zu entwickeln, um Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen zu überwinden.

1.2 Cisplatin

1.2.1 Klinische Verwendung

Cis-Diammindichloridoplatin (Cisplatin) ist als Tumorthapeutikum seit über 40 Jahren in klinischem Gebrauch und wird bei zahlreichen Tumorentitäten - meistens in Kombination mit anderen medikamentösen Tumorthapeutika - verabreicht [56]. Cisplatin-basierte Chemotherapien sind u.a. erste Wahl der Systemtherapie bei Hodentumoren mit herausragenden Ergebnissen [57], kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [58], Urothelkarzinomen der Harnblase (siehe 1.1.9), cholangiozellulären Karzinomen [58], Zervixkarzinomen [59], Osteosarkomen [60] und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereichs [61]. Zu den schwerwiegendsten Nebenwirkungen gehören Nephro- [62] und Ototoxizität [63], Neurotoxizität [64] sowie ausgeprägtes Erbrechen [65]. Seltener tritt auch eine Knochenmarksdepression mit Panzytopenie und erhöhter Infektanfälligkeit auf [66]. Insbesondere die Nephrotoxizität ist dosislimitierend für Cisplatin [67].

1.2.2 Vergleich mit anderen Platinverbindungen

Aufgrund der ausgeprägten Normalgewebstoxizität wurde das weniger nephro- und ototoxische Carboplatin entwickelt, bei dem vor allem die Knochenmarkstoxizität dosislimitierend ist [67]. Carboplatin ist jedoch in vielen Tumoren weniger wirksam als Cisplatin [68]. Carboplatin hat den gleichen Wirkmechanismus wie Cisplatin und weist daher eine vollständige Kreuzresistenz mit Cisplatin auf [69] - das bedeutet, dass Tumoren, die resistent gegenüber Cisplatin sind, auch nicht auf eine Therapie mit Carboplatin ansprechen. Oxaliplatin hingegen unterscheidet sich strukturell stärker von Cisplatin, sodass Oxaliplatin-Addukte zu anderen Konformationsänderungen in der DNA führen als Cisplatin-Addukte [70]. Daher bestehen Unterschiede in der Erkennung der DNA-Läsionen [71, 72]. Dies bedingt letztendlich ein anderes Wirkspektrum von Oxaliplatin, sodass Oxaliplatin auch in Cisplatin-resistenten Zellen wirksam sein kann

[73]. Im Gegensatz zu Cisplatin und Carboplatin wird Oxaliplatin bei Kolonkarzinomen angewendet [69], während es in der Therapie von Harnblasenkarzinomen nicht zum Einsatz kommt. Die gravierendste Nebenwirkung von Oxaliplatin ist die Neurotoxizität, die stärker ausgeprägt ist als bei Cisplatin [74]. Die anderen o.g. Nebenwirkungen von Cisplatin treten unter Oxaliplatin-Therapie nur selten auf [69]. Die chemische Struktur von Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin ist in Abb. 1 dargestellt (siehe unten).

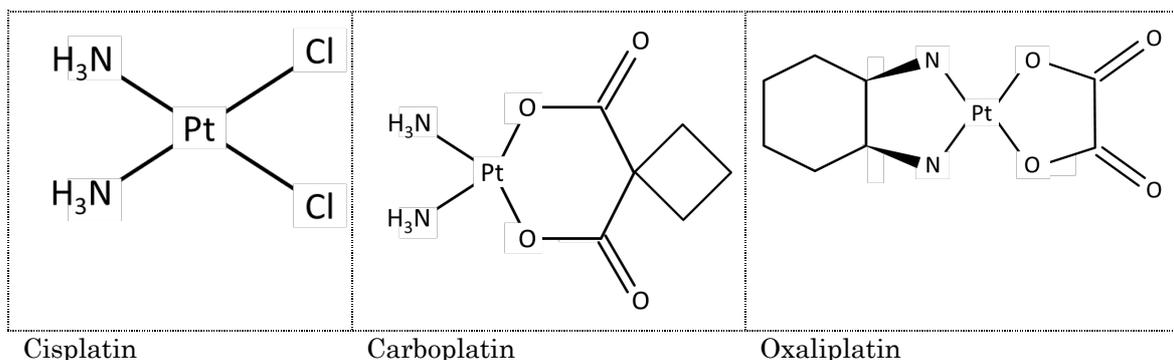


Abb. 1: Chemische Struktur von Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin

1.2.3 Wirkmechanismus

Das ungeladene Cisplatin wird durch passive Diffusion oder aktiv durch Membrantransporter in die Zelle aufgenommen [75]. Aufgrund der intrazellulär geringen Chloridkonzentration werden 1-2 Chloridatome gegen Wassermoleküle ausgetauscht, sodass das Cisplatinmolekül eine positive Ladung annimmt und mit nukleophilen Gruppen der DNA reagiert [76]. Zusätzlich zur Interaktion mit nukleärer DNA (siehe 1.2.3.1), die als wesentlicher Wirkmechanismus von Cisplatin angesehen wird, ist ein Teil der Zytotoxizität von Cisplatin auch auf andere Reaktionspartner zurückzuführen [77]. Nur etwa 1% des intrazellulären Cisplatins bindet an die nukleäre DNA, der übrige Anteil reagiert mit zytoplasmatischen Strukturen bzw. Proteinen in Zellorganellen oder interagiert mit der mitochondrialen DNA [78]. Neben Cisplatin-induzierten DNA-Schäden werden vor allem die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (siehe 1.2.3.2), die direkte Interaktion von Cisplatin mit proapoptotischen Proteinen in der Mitochondrienmembran (siehe 1.5.2 d) sowie die Einleitung einer ER-Stressantwort (siehe 1.5.1.1) als relevante Mechanismen für die Zytotoxizität von Cisplatin angesehen [77].

1.2.3.1 Interaktion von Cisplatin mit der DNA

Die bevorzugte Bindungsstelle von Cisplatin an der DNA ist das N7-Atom der Purinbasen Guanin und (geringer ausgeprägt) Adenin [79]. Dort bildet Cisplatin zunächst Monoaddukte mit der DNA [69]. Über 90% der Monoaddukte reagieren dann mit einem weiteren N7-Atom einer nahegelegenen Purinbase und bilden so Crosslinks [80]. Diese können entweder innerhalb des gleichen DNA-Strangs entstehen (Intrastrang-Crosslink) oder zwischen den beiden komplementären DNA-Strängen (Interstrang-Crosslink) [69]. Die Intrastrang-Crosslinks entstehen entweder zwischen zwei benachbarten Basen (1,2-

Intrastrang-Crosslink) oder über ein Basenpaar hinweg (1,3-Intrastrang-Crosslink) [81]. Fast zwei Drittel der Cisplatin-Addukte an der DNA sind Intrastrang-Crosslinks zwischen zwei unmittelbar benachbarten Guaninen [82]. Seltener sind 1,2-Intrastrang-Crosslinks mit Adeninbeteiligung und 1,3-Intrastrang-Crosslinks zwischen Guaninen [81]. Interstrang-Crosslinks und Monoaddukte machen nur einen geringen Anteil (zusammen unter 5%) der Cisplatin-Addukte aus [83]. Die Cisplatin-Addukte an der DNA sind in Abb. 2 veranschaulicht (siehe unten).

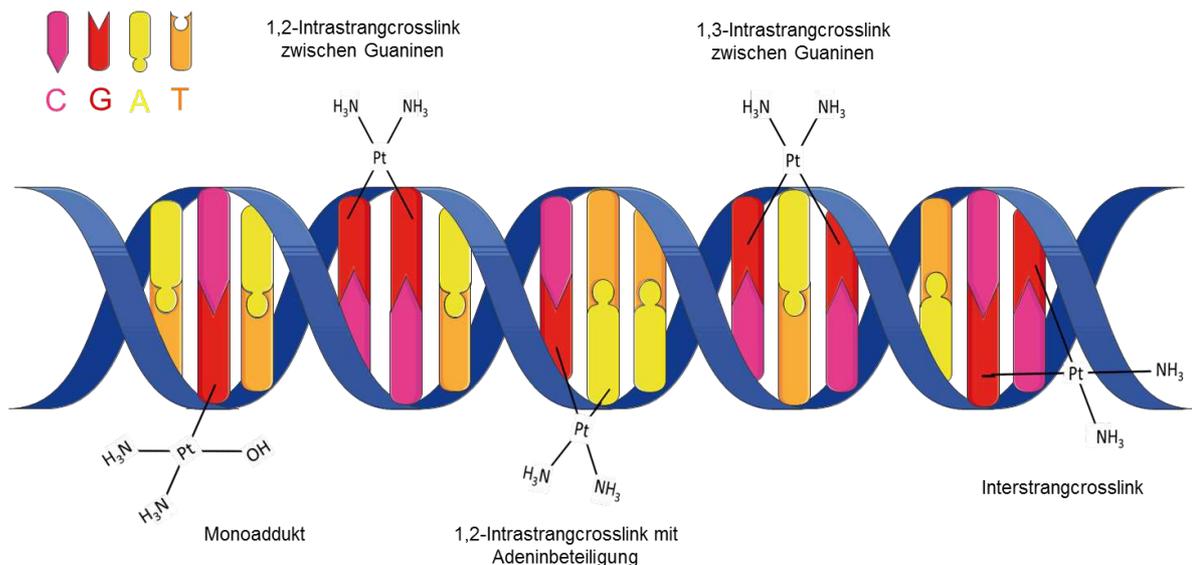


Abb. 2: Cisplatin-Addukte an der DNA

Die häufigsten Cisplatin-Addukte an der DNA sind 1,2-Intrastrang-Crosslinks zwischen zwei benachbarten Guaninen. Seltener sind 1,2-Intrastrang-Crosslinks mit Adeninbeteiligung und 1,3-Intrastrang-Crosslinks. Monoaddukte und Interstrang-Crosslinks machen den geringsten Anteil der Cisplatin-Addukte an der nukleären DNA aus.

Abkürzungen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

(Beim Erstellen dieser Abbildung wurden die Nukleinsäure-Designs von *Servier Medical Art* genutzt, lizenziert unter der Creative-Commons-Lizenz Attribution 3.0.)

Die DNA-Crosslinks verändern die Konformation der DNA und behindern in der Umgebung die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren [80]. Replikation und Transkription werden durch diese Konformationsänderungen blockiert [84]. An kollabierten Replikationsgabeln können sekundär DNA-Doppelstrangbrüche entstehen [85]. Sowohl an Einzelstrangbereiche blockierter Replikationsgabeln als auch an DNA-Doppelstrangbrüche werden Sensorproteine rekrutiert, die die DNA-Schadensantwort einleiten (siehe 1.3.1). Die Intrastrang-Crosslinks werden durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) (siehe 1.4.1.1) repariert, die Interstrang-Crosslinks durch eine Kombination aus NER, DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und Transläsionssynthese [86] (siehe 1.4.3).

1.2.3.2 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für Cisplatin-induzierte Toxizität

Der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wird ein relevanter Anteil an der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität zugeschrieben [87]. Cisplatin trägt auf verschiedene Arten zum intrazellulären Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies bei [88]. Es kann kovalent an Sulfhydrylgruppen antioxidativer Enzyme binden und diese so inaktivieren [89]. Neben der Konjugation an Metallothioneine (siehe 1.6.2 c), kann auch die Konjugation von Cisplatin an Glutathion zur Inaktivierung von Cisplatin führen. Dies trägt allerdings zum Verbrauch der antioxidativen Radikalfänger bei und begünstigt so oxidativen Stress [90]. Außerdem beeinträchtigt Cisplatin die Aufnahme- und Transportkapazität für metallische Spurenelemente wie Kupfer und Selen durch Competition um die Transporter [88], was die Funktion antioxidativer Enzyme beeinträchtigt. Kupfer ist essentieller Cofaktor der Superoxiddismutase (siehe auch 1.6.2 e), Selen kommt als Selenocystein in der Glutathionperoxidase (siehe 1.6.2 a) vor [91]. Des Weiteren wird durch Bindung von Cisplatin an mitochondriale DNA (mtDNA) infolge einer Transkriptionsblockade die Synthese von Proteinen der Elektronentransportkette der oxidativen Phosphorylierung beeinträchtigt und somit die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies begünstigt [92]. Tumorzellen sind für die Reduktion antioxidativer Kapazitäten besonders anfällig, da in Tumorzellen stoffwechselbedingt mehr reaktive Sauerstoffspezies produziert werden [93].

Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies führt zur Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg, indem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) mit Proteinen reagieren, die an der Porenbildung in der Mitochondrienmembran beteiligt sind, z.B. *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) (siehe auch 1.5.2 d) [94]. Die damit verbundene Konformationsänderung der Poren bedingt deren Öffnung, sodass Cytochrom c ins Zytoplasma freigesetzt wird und der intrinsische Weg der Apoptose (siehe 1.5.1.1) eingeleitet wird [94]. Durch Entweichen von intramitochondrialem Cytochrom c ins Zytoplasma wird die Elektronentransportkette unterbrochen und es entstehen zusätzliche reaktive Sauerstoffspezies, was zur Signalverstärkung des intrinsischen Wegs der Apoptose beiträgt [95]. Zudem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass reaktive Sauerstoffspezies auf den extrinsischen Signalweg der Apoptose (siehe 1.5.1.2) Einfluss nehmen [96]. Bei vermehrter ROS-Produktion wird die Expression von TRAIL und Fas-Ligand hochreguliert [94]. Außerdem lagern sich nach Bindung von Liganden die Todesrezeptoren in Cholesterol- und Spingolipid-reichen Signalplattformen, sogenannten *Lipid Rafts*, in der Zellmembran zusammen [97]. In die *Lipid Rafts* werden NADPH-Oxidasen rekrutiert, welche $O_2^{\cdot-}$ produzieren [98, 99]. Die MAP-3-Kinase *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) ist in unstimulierten Zellen an Thioredoxin gebunden und wird dadurch inaktiv gehalten [100]. Nach ROS-bedingter Oxidation von zwei Cysteinresten des Thioredoxins unter Bildung einer Disulfidbrücke dissoziiert Thioredoxin von der ASK1 ab, sodass diese aktiviert werden kann und eine MAP-Kinase-Kaskade eingeleitet wird, was schließlich zur Aktivierung des JNK- und p38-Signalwegs führt [100]. Auch über diesen Signalweg kann somit ROS-induzierte Apoptose vermittelt werden (siehe auch 1.3.5.1 und 1.3.5.2).

Darüber hinaus können reaktive Sauerstoffspezies, vor allem das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), auch selbst DNA-Schäden verursachen, indem sie mit der DNA reagieren und Basen oxidieren [101]. Mehr als zwanzig Basenmodifikationen durch oxidative Schädigung der DNA sind bekannt [101], wobei 8-Oxoguanin am häufigsten vorkommt [102]. 8-Oxoguanin kann durch Basenexzisionsreparatur eliminiert werden [103]. Unrepariert verursacht 8-Oxoguanin bei der Replikation DNA-Doppelstrangbrüche, die wiederum Apoptose induzieren [103].

1.3 Die DNA-Schadensantwort und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz

Die DNA-Schadensantwort beinhaltet sowohl Reparaturmechanismen und Toleranz gegenüber DNA-Schäden, als auch die Einleitung der Apoptose bei irreparablen Schäden [104]. Bei der Aktivierung von Reparaturmechanismen wird parallel häufig ein Zellzyklusarrest (Details siehe 1.3.4) über die Aktivierung von Checkpointkinasen eingeleitet, um der Zelle die nötige Zeit für die Reparaturmechanismen zu verschaffen [105]. Zellen mit erheblichen DNA-Schäden können außerdem in einen dauerhaften Zellzyklusarrest übergehen, sodass keine Zellteilung mehr zustande kommt; dieser Prozess wird als Seneszenz bezeichnet [106]. Die Mechanismen der DNA-Schadensantwort sind vielfältig und umfassen neben posttranslationalen Modifikationen von Proteinen auch die Beeinflussung von Genexpression, Proteinbiosynthese, Transport- und Abbauprozessen [107]. Für diese Arbeit relevante Schritte der frühen DNA-Schadensantwort sind in Abb. 3 (siehe Seite 15) dargestellt.

1.3.1 ATM, ATR und DNA-PK – Die Initiatoren der DNA-Schadensantwort

Die Serin-/Threonin-Kinasen ATM, ATR und DNA-PK haben große Bedeutung für die Erkennung von DNA-Schäden [104]. Durch Phosphorylierung zahlreicher nachgeschalteter Proteine initiieren sie die DNA-Schadensantwort [85]. Während ATM und DNA-PK mithilfe von Sensorproteinen hauptsächlich an DNA-Doppelstrangbrüche rekrutiert werden, bindet ATR an die Einzelstrangbereiche blockierter Replikationsgabeln sowie an Einzelstrangbrüche [108]. Nachdem sie aktiviert worden sind (Details siehe 1.3.1.1 bis 1.3.1.3), beeinflussen ATM, ATR und DNA-PK gegenseitig ihre Aktivität [109]. So können sich ATM und ATR gegenseitig phosphorylieren oder die autokatalytische Aktivierung der jeweils anderen Proteinkinase vermitteln, indem deren Rekrutierung zu bereits erkannten DNA-Schäden erleichtert wird [110]. Auch ATM und DNA-PK können sich gegenseitig phosphorylieren und so die Wahl des DNA-Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche beeinflussen [111] (siehe 1.4.2). Darüber hinaus können alle drei Proteinkinasen Autophosphorylierungen vornehmen, die ihre Aktivität modifizieren [105].

1.3.1.1 Aktivierung von ATM

Die Rekrutierung von ATM an DNA-Doppelstrangbrüche erfolgt durch den MRN-Komplex, bestehend aus jeweils zwei MRE11-, RAD50- und NBS1-Proteinen [112]. Dieser Sensorkomplex erkennt und prozessiert die Enden des Doppelstrangbruchs [113]. MRE11 bildet das Zentrum des MRN-Komplexes und interagiert direkt mit RAD50, NBS1 und der DNA [114]. MRE11 hat Endo- und Exonukleaseaktivität zur Prozessierung der Enden des Doppelstrangbruchs (siehe 1.4.2.1). RAD50 hält die beiden Enden des DNA-Doppelstrangbruchs dicht beieinander, um DNA-Reparatur zu ermöglichen [115]. Durch seine ATPase-Aktivität kann RAD50 unter ATP-Verbrauch eine Konformationsänderung des MRN-Komplexes herbeiführen, wodurch die Nukleaseaktivität des MRE11 Proteins an- oder abgeschaltet werden kann [116]. NBS1 rekrutiert ATM an den DNA-Doppelstrangbruch und übernimmt regulatorische Funktionen im MRN-Komplex [117]. Auf die Bindung von ATM an den MRN-Komplex folgt die Aktivierung von ATM durch Autophosphorylierung und Dissoziation des zuvor inaktiven Dimers in ein Monomer [109]. ATM übernimmt nun wesentliche Teile der weiteren Signaltransduktion durch Phosphorylierung zahlreicher Substrate [105]. Dazu gehören Proteinkinasen, wie z.B. die Checkpointkinase 2 (CHK2), die einen Zellzyklusarrest induzieren kann (siehe 1.3.4), Transkriptionsfaktoren wie p53 (siehe 1.3.3.1) und Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind [112].

1.3.1.2 Aktivierung von ATR

Im Gegensatz zu ATM und DNA-PKcs wird ATR nicht primär durch Doppelstrangbrüche, sondern durch einzelsträngige DNA an blockierten Replikationsgabeln rekrutiert [118]. Das Replikationsprotein A (RPA) bindet während der normalen Replikation an frei liegende einzelsträngige DNA, um deren Abbau durch Nukleasen und die Formierung von Sekundärstrukturen zu verhindern [119]. Wenn Helikasen trotz des Replikationsblocks fortfahren, DNA zu entwinden, persistieren langstreckig einzelsträngige DNA-Bereiche, an die RPA gebunden ist [120]. Dies führt nachfolgend zur Bindung von ATRIP, der regulatorischen Untereinheit von ATR, an die Einzelstrangbereiche, wodurch ATR rekrutiert wird [121].

An der Aktivierung von ATR ist unter anderem der sogenannte *9-1-1 Komplex*, ein Heterotrimer aus Rad9, Rad1 und Hus1, beteiligt. 9-1-1 hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem Prozessivitätsfaktor PCNA [122], dessen drei Untereinheiten eine Ringklemmenkonfiguration bilden, die Replikation koordinieren und verhindern, dass die DNA-Polymerase δ während der Replikation von der DNA abdissoziiert [123]. An blockierten Replikationsgabeln wird 9-1-1 durch ein Ladeprotein ATP-abhängig auf die DNA aufgeladen [124]. Neben 9-1-1 wird auch das *DNA Topoisomerase II Binding Protein 1* (TopBP1) rekrutiert [118]. TopBP1 interagiert mit Rad9, ATRIP und ATR, wodurch ATR vermehrte Kinaseaktivität entwickelt [105]. Daneben kann die Stimulation der Kinaseaktivität von ATR auch mithilfe des Aktivatorproteins ETAA erfolgen, das direkt an RPA bindet [125].

Aktiviertes ATR vermittelt nun die weitere DNA-Schadensantwort. Eine der wichtigsten Funktionen von ATR ist die Phosphorylierung und konsekutive Aktivierung der Checkpointkinase 1 (CHK1), die einen Zellzyklusarrest bewirken kann (siehe 1.3.4). Zahlreiche Substrate von ATM werden auch durch ATR phosphoryliert, sodass ATR ähnliche Funktionen in der DNA-Schadensantwort ausführen kann wie ATM [126]. Eine spezifische Funktion von ATR ist die Aktivierung des Fanconi-Anämie-Signalwegs, der die DNA-Reparatur von Interstrang-Crosslinks, wie sie durch Cisplatin verursacht werden, ausführt [127] (siehe 1.4.3).

1.3.1.3 Aktivierung der DNA-PK

Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die sich aus einer großen katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) und dem Heterodimer Ku zusammensetzt [128]. Ku besteht wiederum aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 70 bzw. etwa 80 kDa (Ku70 und Ku80) [128]. Ku70 und Ku80 bilden zusammen eine Ringstruktur, die die Enden doppelsträngiger DNA-Brüche umschließt [129]. Nach Bindung von Ku an die DNA wird die DNA-PKcs an die Enden der Doppelstrangbrüche rekrutiert [130]. Ku stabilisiert die Interaktion der DNA-PKcs mit der DNA, funktioniert als regulatorische Untereinheit der DNA-PK und stimuliert die Kinaseaktivität der DNA-PKcs [131]. Die Hauptaufgabe der DNA-PK ist die Aktivierung und Regulierung des *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) [132], eines Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche (siehe 1.4.2.2). Durch Autophosphorylierung werden Konformationsänderungen der DNA-PK eingeleitet, die die nachfolgenden Schritte des NHEJ erleichtern [133]. Die DNA-PKcs phosphoryliert außerdem die Schlüsselkomponenten des NHEJ, Ku70 und Ku80, XRCC4, XLF und Artemis [132]. ATM wird durch die DNA-PK an mehreren Stellen inhibitorisch phosphoryliert, wodurch das NHEJ gefördert und die DNA-Reparatur mittels *Homologous Recombination* (HR) gehemmt wird [111] (siehe 1.4.2).

1.3.2 Frühe Schritte der DNA-Schadensantwort

1.3.2.1 Phosphorylierung der Histonvariante H2AX

Einer der ersten Schritte der DNA-Schadensantwort ist die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX am Serinrest 139 [134]. Das dort phosphorylierte H2AX wird als γ H2AX bezeichnet [135]. Die Phosphorylierung erfolgt sowohl durch ATM und DNA-PKcs infolge von Doppelstrangbrüchen als auch durch ATR infolge von Replikationsstress [134-136]. In der Umgebung eines DNA-Doppelstrangbruchs wird H2AX auf einer Länge von mehreren Millionen Basenpaaren bzw. tausender Nukleosomen phosphoryliert und der DNA-Schaden so markiert [137] – es kommt zur erheblichen Verstärkung der DNA-Schadensantwort durch lokale Aktivierung von ATM und Rekrutierung weiterer Signalmoleküle [135]. γ H2AX-markiertes Chromatin wird nicht transkribiert, um unerwünschte Interaktionen zwischen Transkription und DNA-Reparatur zu vermeiden [105]. Die durch γ H2AX markierten DNA-Bereiche bilden

sogenannte nukleäre γ H2AX-Foci [137]. Diese können mittels Immunfluoreszenz lichtmikroskopisch detektiert werden [138]. Da die Anzahl der γ H2AX-Foci 1:1 mit der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche korreliert [139], wird sie als Methode zur Detektion und Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen genutzt [140].

1.3.2.2 Phosphorylierung von MDC1

Neben dem MRN-Komplex und ATM wird in der Frühphase der DNA-Schadensantwort auch MDC1 an Doppelstrangbrüche rekrutiert [105]. MDC1 kann über zwei verschiedene Bindungsdomänen sowohl an ATM als auch an γ H2AX binden und so die Bindung von ATM an den Doppelstrangbruch stabilisieren [141]. Das gebundene ATM phosphoryliert dann MDC1, welches nach seiner Phosphorylierung auch mit dem MRN-Komplex interagiert und diesen in Position hält [142]. Zudem phosphoryliert ATM weitere H2AX Moleküle in der Umgebung, sodass nachfolgend immer mehr MDC1/MRN/ATM-Komplexe gebildet und stabilisiert werden [143]. Darüber hinaus ist MDC1 an der Rekrutierung und Stabilisierung weiterer Proteine der DNA-Schadensantwort an γ H2AX-markierten DNA-Schäden beteiligt, darunter 53BP1 und BRCA1 [143]. Phosphoryliertes MDC1 rekrutiert die Ubiquitinligasen RNF8 und konsekutiv RNF168, die mithilfe von Konjugationsenzymen H2AX und anderen Histone ubiquitinieren [144]. Infolge dieser Ubiquitinierung von Histonen wird 53BP1 an den Doppelstrangbruch rekrutiert und gebunden [145]. Ubiquitiniertes H2AX wird außerdem durch RAP80 erkannt, das an die markierten Histone bindet und unter anderem mit *Abraxas* und BRCA1 (siehe 1.3.2.4) einen Komplex bildet [146]. Durch Bindung an die Doppelstrangbrüche und Interaktion mit ubiquitiniertem γ H2AX bilden sich 53BP1-Foci und BRCA1-Foci, die ebenfalls durch Immunfluoreszenz detektiert werden können und mit den γ H2AX-Foci kolokalisiert sind [147]. In dieser Arbeit wird die Bildung von γ H2AX- und 53BP1-Foci in Reaktion auf Cisplatinexposition untersucht.

1.3.2.3 Aktivierung von 53BP1 und Bedeutung für die DNA-Schadensantwort

ATM phosphoryliert bereits in der Frühphase der DNA-Schadensantwort 53BP1 [148]. 53BP1 hat selbst keine enzymatische Aktivität, vielmehr fungiert es als Plattform zur Rekrutierung von Effektorproteinen der DNA-Schadensantwort [149]. ATM wird infolge der Interaktion mit 53BP1 autophosphoryliert und aktiviert [150]. Sowohl für die Interaktion von ATM mit CHK2 [149] als auch für die Interaktion von ATR mit CHK1 [151] ist 53BP1 erforderlich. So trägt 53BP1 sowohl zum Zellzyklusarrest infolge von Doppelstrangbrüchen als auch infolge von Replikationsstress bei [150]. In der G₁-Phase des Zellzyklus begünstigt 53BP1 die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch *Non-Homologous End Joining* (NHEJ; siehe 1.4.2.2). Unabhängig von der Zellzyklusphase beziehungsweise seiner Funktion für das NHEJ interagiert 53BP1 mit p53 (siehe 1.3.3.1) und ist essentiell für dessen hinreichende Aktivierung [152]. 53BP1 ermöglicht durch seine Interaktion mit p53 die Transkription abhängiger Gene und ist somit auch an der Einleitung der Apoptose beteiligt [152].

1.3.2.4 Aktivierung von BRCA1 und Bedeutung für die DNA-Schadensantwort

In Reaktion auf DNA-Schäden wird BRCA1 durch ATM bzw. ATR phosphoryliert und so aktiviert. Im Zytoplasma liegt BRCA1 in einem stabilen Komplex mit BARD1 vor [153]. BARD1 stabilisiert BRCA1 und vermittelt die Bindung von BRCA1 an Kinasen und andere Enzyme [154]. In der S- und G₂-Phase des Zellzyklus ist BRCA1 wesentlich an der Einleitung der *Homologous Recombination* zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt (siehe 1.4.2.1). 53BP1 und BRCA1 sind Antagonisten bei der Einleitung der DNA-Reparatur infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen. Während 53BP1 die Reparatur mittels *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) in der G₁-Phase des Zellzyklus begünstigt, ist BRCA1 der Schlüsselfaktor für die Einleitung Homologous Recombination (HR) in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus [155] (siehe 1.4.2). BRCA1 ist außerdem ein Reparaturfaktor im Fanconi-Anämie-Signalweg zur Reparatur von DNA-Interstrang-Crosslinks (siehe 1.4.3). Des Weiteren ist BRCA1 essentiell für die Phosphorylierung von CHK1 durch ATR und den nachfolgenden Zellzyklusarrest in der S-Phase des Zellzyklus in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden [156]. Auch für den CHK1-vermittelten Zellzyklusarrest am G₂/M-Checkpoint werden BRCA1 und dessen Bindungspartner CtIP benötigt [157]. Als Koaktivator von p21 (siehe 1.3.3.5) und p53 (siehe 1.3.3.1) trägt BRCA1 zur Transkription jeweils abhängiger Gene bei und kann p21-vermittelt einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase einleiten [158].

Eine weitere wichtige Funktion von BRCA1 ist die Regulation der DNA-Transkription [159]. BRCA1 übernimmt als Teil des Gesamtzymkomplexes der RNA-Polymerase II regulatorische Funktion [159]. In Reaktion auf DNA-Schäden fungiert das aktivierte Heterodimer aus BRCA1 und BARD1 als Ubiquitinligase, die die RNA-Polymerase II ubiquitiniert und so inhibiert, wodurch die Transkription der beschädigten DNA gestoppt wird [154]. Bemerkenswerterweise ubiquitiniert das aktivierte Heterodimer aus BRCA1 und BARD1 auch γ -Tubulin, das wesentlicher Bestandteil der Zentriomen der Mitosespindel ist, und kann so Einfluss auf den Zellzyklus in der Mitosephase nehmen [160]. Für diese Funktion der Ubiquitinligase während der Mitose ist eine vorherige Phosphorylierung von BRCA1 durch die Checkpointkinase 2 erforderlich [161].

1.3.2.5 Poly-ADP-Ribosylierung

Die Poly-ADP-Ribosylierung gehört neben den bereits genannten Schritten auch zu den frühesten Mechanismen der DNA-Schadensantwort. Aufgrund ihrer engen funktionalen Verknüpfung mit der DNA-Reparatur wird sie in Kapitel 1.4.4 thematisiert.

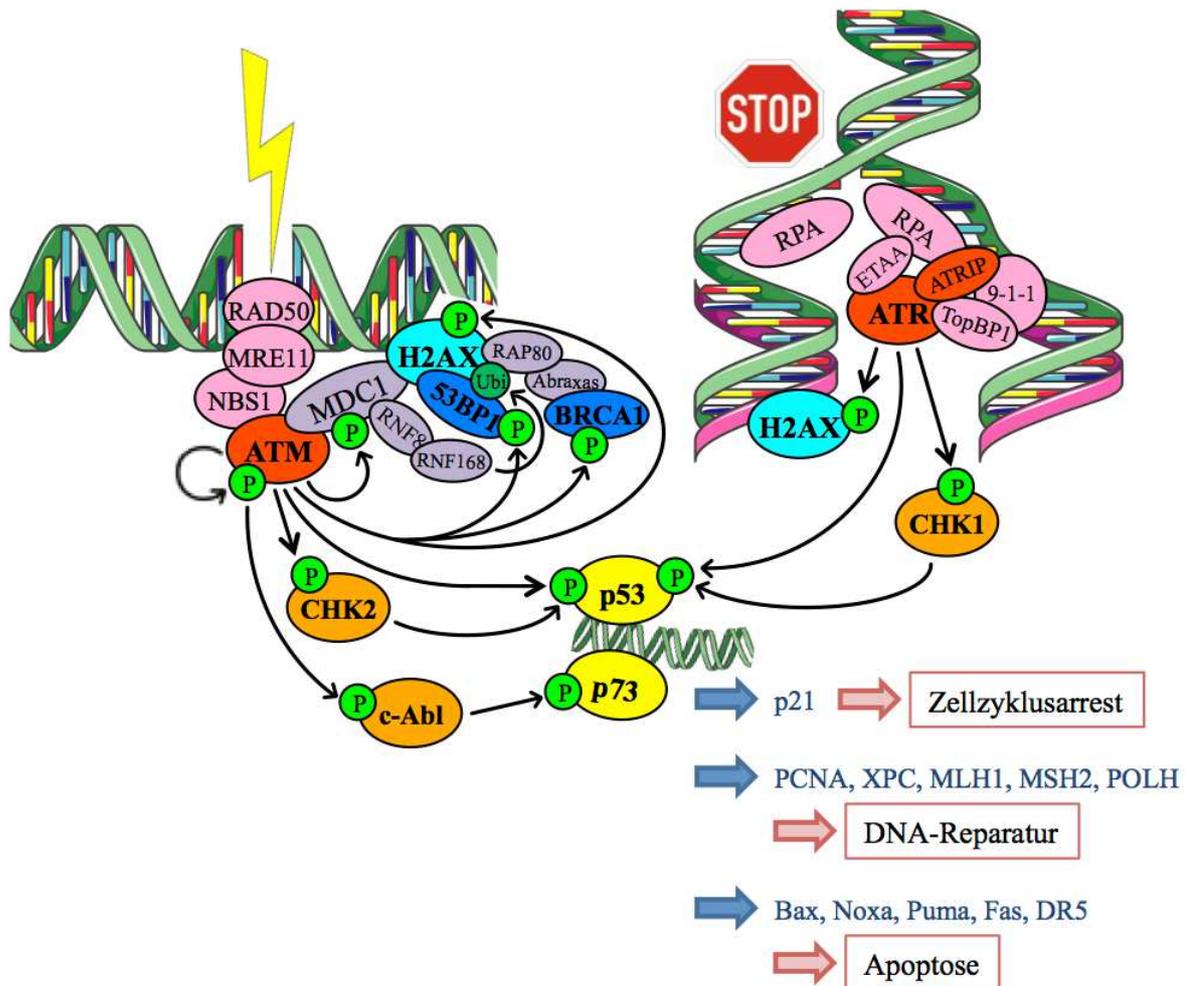


Abb. 3: Frühe Schritte der DNA-Schadensantwort

DNA-Doppelstrangbrüche (links) bzw. blockierte Replikationsgabeln (rechts) führen zur Rekrutierung von ATM bzw. ATR. Dies erfolgt mithilfe von Sensorproteinen, die den DNA-Schaden erkennen und die Aktivierung von ATM bzw. ATR bedingen. ATM und ATR koordinieren dann die weiteren Schritte der DNA-Schadensantwort. Einer der frühesten Schritte der DNA-Schadensantwort ist die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX, die sowohl durch ATR als auch durch ATM erfolgen kann. Dies erleichtert die Rekrutierung weiterer Signalmoleküle und Reparaturfaktoren an den DNA-Schaden und bewirkt eine erhebliche lokale Verstärkung der DNA-Schadensantwort. Sowohl ATM als auch ATR aktivieren durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor p53, dessen Zielgene einen Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur, bei irreparablen Schäden jedoch auch die Apoptose einleiten können. ATM phosphoryliert infolge von DNA-Schäden die Checkpointkinase 2 (CHK2), während ATR die Checkpointkinase 1 (CHK1) aktiviert. Beide Checkpointkinasen können einen Zellzyklusarrest einleiten und zudem p53 aktivierend phosphorylieren. Aktiviertes ATM phosphoryliert zudem die Tyrosinkinase c-Abl, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p73 führt. Die Abbildung illustriert insbesondere die frühen Schritte der DNA-Schadensantwort. Die Beteiligung der p63-, NF- κ B- und MAP-Kinase-Signalwege an der DNA-Schadensantwort ist nicht dargestellt. Auch die Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das Ku70/80-Heterodimer und die nachfolgende Rekrutierung der DNA-PKcs kommen hier nicht zur Darstellung.

Abkürzungen: 9-1-1 = Proteinkomplex aus Rad9, Rad1 und Hus1, 53BP1 = p53 Binding Protein 1, ATM = Ataxia Telangiectasia Mutated, ATR = Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3 related, ATRIP = ATR Interacting Protein, c-Abl = Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1, Bax = Bcl-2-associated X protein, BRCA1 = Breast Cancer 1, CHK1/2 = Checkpointkinase 1/2, DR5 = Death Receptor 5, ETAA = Ewing Tumor Associated Antigen, H2AX = Histonvariante H2AX, MDC1 = Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1,

MLH1 = Mutator protein L Homolog 1, MRE11 = Meiotic Recombination 11, MSH2 = Mutator protein S Homolog 2, NBS1 = Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1, P = Phosphat, p21 = Protein 21, p53 = Tumorprotein 53, p73 = Tumorprotein 73, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, POLH = DNA-Polymerase η , Puma = P53 upregulated modulator of apoptosis, RAD50 = Radiation repair protein 50, RAP80 = Receptor Associated Protein 80, RNF8 = Ring Finger Protein 8, RNF168 = Ring Finger Protein 168, RPA = Replication Protein A, TopBP1 = DNA Topoisomerase II Binding Protein 1, Ubi = Ubiquitin, XPC = Xeroderma Pigmentosum, complementation group C.

(Beim Erstellen dieser Abbildung wurden die Nukleinsäure-Designs von *Servier Medical Art* genutzt, lizenziert unter der Creative-Commons-Lizenz Attribution 3.0.)

1.3.3 Regulation der Transkription im Zuge der DNA-Schadensantwort

1.3.3.1 Bedeutung von p53 für die DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz

Ein sehr bedeutsames Substrat von ATM, ATR und der DNA-PKcs ist das Tumorsuppressorprotein p53, das an verschiedenen Stellen phosphoryliert und so aktiviert werden kann [162]. Nach Aktivierung durch ATM bzw. ATR phosphorylieren außerdem die Checkpointkinasen CHK2 bzw. CHK1 p53, wodurch die Interaktion von p53 mit der Ubiquitinligase Mdm2 inhibiert wird, sodass p53 nicht mehr abgebaut wird [163]. Auch die Ubiquitinligase selbst wird durch ATM phosphoryliert ebenso wie weitere Faktoren, die zur Stabilisierung von p53 beitragen [112].

P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der seine Funktion durch Aktivierung oder Inhibierung von Zielgenen ausführt [164]. Durch Phosphorylierung von p53 wird die Transkription abhängiger Gene induziert oder inhibiert [165]. p53 stimuliert die Transkription von p21, das Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) inhibiert und so einen Zellzyklusarrest bewirken kann [166] (siehe 1.3.4). Gleichzeitig wird die Transkription von DNA-Reparaturgenen stimuliert, z.B. von XPC, welches an der Nukleotid-Exzisionsreparatur beteiligt ist (siehe 1.4.1.1), von MLH1 und MSH2, die Teil der Mismatch-Reparatur sind (siehe 1.4.1.2), sowie der DNA-Polymerase η (POLH), die mittels Translasionssynthese Cisplatin-induzierte Intrastrang-Crosslinks reparieren kann (siehe 1.4.1.3) [167]. Außerdem wird der Prozessivitätsfaktor PCNA p53-abhängig transkribiert, der neben seiner Funktion bei der Replikation an diversen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist [168].

Wenn Doppelstrangbrüche akkumulieren und eine kritische Anzahl überschritten wird, kann p53 auch die Genexpression proapoptotischer Proteine verstärken und so die Einleitung der Apoptose begünstigen [85]. P53 ist durch Induktion von proapoptotischen Genen aus der Bcl-2-Familie (z.B. von Bax [169], Noxa [170] und Puma [171]) und Todesrezeptoren (z.B. Fas und DR5 [165]) sowohl an der Einleitung des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalwegs der Apoptose beteiligt (siehe 1.5.1). Daneben kann p53 die Apoptose auch unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität einleiten, indem zytosolisches p53 zu den Mitochondrien transloziert und in der äußeren Mitochondrienmembran die Interaktion von antiapoptotischen und proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie stört oder direkt proapoptotische Proteine aktiviert [172] (siehe unten).

P53 vermittelt somit abhängig vom Ausmaß des DNA-Schadens entweder einen Zellzyklusarrest und die nachfolgende DNA-Reparatur oder die Einleitung der Apoptose [173]. Welche Funktion von p53 überwiegt, wird vor allem durch posttranslationale Modifikationen bestimmt [174]. Bei gravierenden DNA-Schäden, die nicht repariert werden können, wird p53 u.a. am Serin 46 phosphoryliert [174]. Dies bedingt eine Konformationsänderung von p53 mithilfe der Propylisomerase PIN1, die dazu führt, dass überwiegend die Transkription der proapoptotischen Gene aktiviert wird [174]. Darüber hinaus bedingt die Konformationsänderung - unabhängig von der transkriptionellen Aktivität von p53 - die direkte Aktivierung von Bax durch zytosolisches p53 [175]. Die Phosphorylierung am Serinrest 46 wird durch die Kinase HIPK2 katalysiert [176]. HIPK2 interagiert unter normalen Bedingungen mit der Ubiquitinligase SIAH1 und wird für den proteasomalen Abbau markiert [177]. ATM oder ATR phosphorylieren in Reaktion auf gravierenden genotoxischen Stress SIAH1 und behindern so die Interaktion zwischen SIAH1 und HIPK2, wodurch HIPK2 stabilisiert wird [177]. Die Phosphorylierung von p53 am Serin 46 durch HIPK2 ist auch für die Einleitung der Apoptose infolge Cisplatin-induzierter DNA-Schäden von Bedeutung [178].

Bedeutung von p53-Mutationen für Cisplatinresistenz

P53 gehört zu den bedeutendsten Tumorsuppressoren des menschlichen Organismus und wird aufgrund seiner Funktionen in der DNA-Schadensantwort als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [91]. In über 50% der malignen Tumoren liegt eine somatische Mutation im p53-Gen vor [179]. Mutationen im p53-Gen führen zum Verlust der Tumorsuppressiven Funktionen und fördern die maligne Transformation [179]. Aufgrund der verschiedenen Funktionen von p53 nehmen Mutationen im p53-Gen und Mechanismen, die die Aktivität von p53 regulieren, eine duale Rolle ein und können in unterschiedlichem Kontext sowohl Cisplatinempfindlichkeit als auch -resistenz vermitteln [180]. P53-Mutationen können dazu führen, dass p53 seine Transkriptionsaktivität verliert und die Einleitung der Apoptose infolge von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden beeinträchtigt wird - dies kann Cisplatinresistenz bedingen [54]. Darüber hinaus wird die Bindung des Transkriptionsfaktors NRF2 an die DNA durch Wild-Typ-p53 verhindert, nicht jedoch durch mutiertes p53 [181]. Dadurch wird die Expression der Glutathion-S-Transferase μ 1, der Glutathionperoxidase 1 oder der Hämoxigenase 1 [182] in p53-mutierten Zellen gesteigert, was wiederum direkt oder indirekt Cisplatinresistenz vermitteln kann (siehe 1.6.2). Auch das antiapoptotische Protein Bcl-2 wird über NRF2 reguliert und kann in p53-mutierten Zellen die Apoptose in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden behindern [181]. Andererseits kann Wild-Typ-p53 durch Induktion von p21 zum Zellzyklusarrest führen (siehe oben) und der Zelle so Zeit verschaffen für die Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden [183]. Ob p53-Mutationen eher Cisplatinempfindlichkeit oder -resistenz bedingen, ist u.a. abhängig vom Gewebe und der Zahl der induzierten DNA-Schäden [184].

Da in den meisten Tumoren p53-Mutationen mit schlechterem Gesamtüberleben assoziiert sind und Resistenz gegenüber zytostatischen Therapien begünstigen, wurde in den letzten Jahren zahlreiche Substanzen entwickelt, die die Funktion von mutiertem p53 wiederherstellen können [185]. Dagegen ist die Applikation von Mdm2-Inhibitoren, die dazu führen, dass p53 weniger abgebaut und so stabilisiert wird, v.a. in p53-Wild-Typ-Zellen erfolgversprechend [186]. Die Relevanz dieser therapeutischen Ansätze und des p53-Mutationsstatus für intrinsische und insbesondere erworbene Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen ist jedoch noch weitgehend unklar. In ca. 55-60% der metastasierten Urothelkarzinome der Harnblase liegt eine p53-Mutation vor [187, 188]. In Urothelkarzinomen der Harnblase konnte bislang jedoch in mehreren pro- und retrospektiven Studien kein Zusammenhang zwischen dem p53-Mutationsstatus und dem Ansprechen auf Cisplatin-basierte Chemotherapien nachgewiesen werden [54].

1.3.3.2 Bedeutung von p63-Isoformen für die DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz

TP63 ist ein Gen, das von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert und durch alternatives Spleißen jeweils in mehreren Isoformen exprimiert wird [189]. Die TAp63-Isoformen enthalten eine p53-homologe N-terminale Transaktivierungsdomäne, die Δ Np63-Isoformen nicht [189]. Genau wie p53 sind die p63-Isoformen Transkriptionsfaktoren, die ihre Funktion durch Induktion der Transkription abhängiger Gene entfalten [190]. TAp63 kann wie p53 durch Einleitung der Transkription entsprechender Gene einen Zellzyklusarrest und/oder Apoptose induzieren [191]. Dadurch wird unter anderem die Expression von Todesrezeptoren wie TRAIL und Fas (siehe 1.5.1.2), von proapoptotischen Proteinen wie Bax, Noxa, Puma, Apaf-1 (siehe 1.5.1.1) und diversen Caspasen (siehe 1.5.1), sowie von Proteinen der DNA-Schadensantwort, z.B. p21 und Rad9 hochreguliert [189, 192].

Im Gegensatz dazu ist Δ Np63 in Tumorzellen häufig überexprimiert und hat onkogenes Potential, indem es die Transkriptionsaktivität von TAp63 und p53 behindert [191]. Δ Np63 bindet direkt an den Promotor von p21 und unterdrückt dessen Transkription [193]. Bei der Unterdrückung der Metastasierung von Tumoren scheinen TAp63 und Δ Np63 jedoch synergistische Funktion zu haben [190]. Während TAp63 am stärksten in Oozyten exprimiert wird und dort die genomische Integrität der Keimzellen sicherstellt [194], wird Δ Np63 vor allem in Epithelien und somit auch im Urothel exprimiert [195]. Eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von Δ Np63 ist die Differenzierung des Epithels in der Embryonalentwicklung sowie die Organisation von differenzierten epithelialen Geweben [196], z.B. des Plattenepithels oder Urothels. Δ Np63 aktiviert die Transkription von Cytokeratinen und Adhäsionsmolekülen, die für die Organisation des Epithels entscheidende Bedeutung haben [197]. Gleichzeitig vermittelt Δ Np63 den Erhalt von Stammzellen in der Basalschicht des Epithels, um die Proliferationsfähigkeit des Epithels zu erhalten [198]. Bei der Epithelial-Mesenchymalen Transition wird Δ Np63 herunterreguliert [199]. In Urothelkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die

Expression von Δ Np63 mit zunehmendem Tumorstadium und Grading deutlich abnimmt [200, 201] und Verlust von Δ Np63 zu invasivem Wachstum und Metastasierung führt [202]. Insbesondere scheint dies der Fall zu sein, wenn eine p53-Mutation vorliegt [203]. Das mutierte p53 interagiert mit p63 und beeinträchtigt die Funktionen der p63-Isoformen bei der Organisation des Epithels [203].

In Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden wird Δ Np63 u.a. durch ATM und CDK 2 phosphoryliert, was zum vermehrten proteasomalen Abbau von Δ Np63 führt [204]. Auch TAp63 unterliegt vermehrtem proteasomalen Abbau infolge Cisplatin-induzierter DNA-Schäden [205]. Die Bedeutung von p63-Isoformen für die Entwicklung von Cisplatinresistenz ist noch weitgehend ungeklärt. Δ Np63 kann Cisplatinresistenz durch Aktivierung der Transkription von FANCD2, einer Komponente des Fanconi-Anämie-Signalwegs (siehe 1.4.3) vermitteln [206]. Δ Np63 initiiert außerdem die Transkription von Hsp70 und kann auf diese Weise ebenfalls Cisplatinresistenz begünstigen (siehe 1.6.3 b) [207]. Durch Interaktion mit p73, einem weiteren Transkriptionsfaktor aus der p53-Familie, der überwiegend proapoptische Funktionen vermittelt (siehe 1.3.3.3), kann Δ Np63 Cisplatin-induzierte Apoptose verhindern [208]. Zudem kann Δ Np63 die Expression von Akt hochregulieren und so Cisplatinresistenz fördern [209] (siehe 1.6.3 a). TP63 nimmt somit eine duale Rolle in Bezug auf Cisplatinresistenz ein, da es über die beiden unterschiedlichen Transkriptionsprodukte sowohl die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöhen kann (TAp63), als auch Cisplatinresistenz vermitteln kann (Δ Np63) [190].

1.3.3.3 Bedeutung des c-Abl-/p73-Signalwegs für die DNA-Schadensantwort

P73 gehört zur Familie der p53-Transkriptionsfaktoren und weist strukturelle Ähnlichkeit mit p53 und p63 auf [210]. Wie bei TP63 wird auch das für p73 kodierende Gen von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert und durch alternatives Spleißen jeweils in mehreren Isoformen exprimiert [211]. Korrespondierend zu p63 gibt es TAp73-Isoformen, die Tumorsuppressor-Proteine sind und Δ Np73-Isoformen, die überwiegend onkogene Funktionen ausführen. Im Folgenden werden die TAp73-Isoformen zusammengefasst als p73 bezeichnet. TAp73 übernimmt im Rahmen der DNA-Schadensantwort ähnliche Funktionen wie p53 [174]. Dies ist vor allem in Tumorzellen, die eine p53-Mutation aufweisen, für die Chemosensitivität von Bedeutung [212]. Die Transkription der proapoptischen Proteine Bax, Noxa und Puma sowie des Todesrezeptors Fas wird durch p73 gefördert [210, 212]. Zudem kann p73 auch die Expression von p21 induzieren und so einen Zellzyklusarrest vermitteln [211]. Infolge von DNA-Schäden phosphoryliert und aktiviert die Tyrosinkinase c-Abl p73 und dessen Kofaktor YAP1, wodurch die Affinität von YAP1 zu p73 erhöht und die Transkription abhängiger Gene induziert wird [213]. C-Abl ist eine Tyrosinkinase, die nicht membranständig bzw. mit Rezeptoren assoziiert ist [214], sondern in ruhenden Zellen im Zytoplasma an ein regulatorisches Protein der 14-3-3-Familie gebunden und inaktiv gehalten wird [215]. In Reaktion auf DNA-schädigende Substanzen wird der JNK-

Signalweg (siehe 1.3.5.1) aktiviert; die aktivierte JNK phosphoryliert dann das regulatorische Protein, sodass c-Abl freigesetzt wird und in den Zellkern translozieren kann [215]. Dort wird c-Abl im Zuge der DNA-Schadensantwort durch ATM phosphoryliert und so aktiviert [174]. Dieser Signalweg ist auch für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden relevant [216].

1.3.3.4 Bedeutung von NF- κ B für die DNA-Schadensantwort

Neben der p53-Familie sind auch andere Transkriptionsfaktoren Ziele von ATM und vermitteln die weitere Signaltransduktion [174]. Dazu gehört NF- κ B, ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulation von Immunantwort, Zellproliferation und Überleben große Bedeutung hat und über verschiedene Signalwege von intra- oder extrazellulär aktiviert werden kann [85]. NF- κ B wird im Zytoplasma durch seinen Inhibitor I κ B inaktiv gehalten [217]. Die I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert I κ B und markiert es so für den nachfolgenden proteasomalen Abbau [217]. Die regulatorische Untereinheit der IKK ist *NF- κ B Essential Modulator* (NEMO) [218]. Phosphorylierung von NEMO durch ATM im Zellkern bewirkt den Export des gebildeten ATM/NEMO-Komplexes ins Zytoplasma und nachfolgend die Aktivierung der zytoplasmatischen IKK, was dann wiederum zur Aktivierung von NF- κ B führt [218]. NF- κ B induziert die Transkription von antiapoptotischen Genen der Bcl-2-Familie und von c-IAP (siehe 1.5.1.1), sowie der TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren TRAF1 und TRAF2, die ebenfalls antiapoptotische Funktion haben [219]. Dadurch nimmt NF- κ B Einfluss auf den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg der Apoptose [219]. Zudem wird NF- κ B-vermittelt die Expression von MKP1 hochreguliert, einer Phosphatase, die die lang andauernde Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinasen (siehe 1.3.5.1) durch Dephosphorylierung verhindert und so der Einleitung der Apoptose entgegenwirkt [85]. Abhängig vom Kontext kann NF- κ B jedoch auch proapoptotische Signale in Reaktion auf DNA-Schäden vermitteln [220].

1.3.3.5 Bedeutung von p21 für die DNA-Schadensantwort

P21 kann infolge von DNA-Schäden durch Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen deren Interaktion mit ihren Substraten verhindern und so einen Zellzyklusarrest in der G₁/S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus vermitteln [221] (siehe 1.3.4). Die Expression von p21 wird im Rahmen der DNA-Schadensantwort durch p53 induziert (siehe 1.3.3.1) [222]. Darüber hinaus kann die Transkription von p21 auch durch andere Faktoren der DNA-Schadensantwort gefördert werden, darunter BRCA1 und NF- κ B [222]. Neben seiner Funktion als Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen trägt p21 auch durch Bindung an den Prozessivitätsfaktor PCNA zur Einleitung eines Zellzyklusarrests bei, da durch die Interaktion mit PCNA die Replikation blockiert wird [223]. Darüber hinaus übernimmt v.a. zytosolisch lokalisiertes p21 antiapoptotische Aufgaben durch direkte Bindung und Inhibierung der Procaspase 3, der Caspase 8 sowie der MAP-3-Kinase ASK1 [221], die den JNK- und p38-Signalweg einleitet (siehe 1.3.5). Posttranslationale Modifikationen

steuern die Stabilität bzw. den Abbau von p21, kontrollieren die Affinität von p21 zu seinen Bindungspartnern und beeinflussen, ob p21 nukleär oder zytosolisch lokalisiert ist [224]. P21 ist Ziel zahlreicher Kinasen, unter anderem von p38 und der JNK1 sowie der Proteinkinase Akt (siehe 1.6.3 a), die überwiegend Proliferations- und Überlebenssignale vermittelt [225]. Phosphorylierung von p21 durch Akt hemmt die Interaktion von p21 mit Cyclin-abhängigen Kinasen und PCNA und fördert die zytosolische Akkumulation von p21; somit dominiert infolge einer Phosphorylierung durch Akt die antiapoptotische Funktion von p21 gegenüber der Vermittlung eines Zellzyklusarrests [225].

1.3.4 Zellzyklusregulation im Rahmen der DNA-Schadensantwort

Sowohl ATM als auch ATR können Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Bei Auftreten eines DNA-Schadens phosphorylieren ATR bzw. ATM die Checkpointkinasen CHK1 bzw. CHK2 [121, 226]. Die Checkpointkinasen können abhängig von der Zellzyklusphase auf mehreren Wegen einen Zellzyklusarrest einleiten, sowohl schnell und kurzfristig durch Phosphorylierung von für den Zellzyklus relevanten Proteinen, als auch langsam und lang andauernd durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [227]. Insbesondere die Stabilisierung von p53 durch Checkpointkinase-vermittelte Phosphorylierungen (siehe 1.3.3.1) mit nachfolgender Induktion der Transkription von p21 (siehe 1.3.3.5) ist bedeutsam für die Einleitung eines länger andauernden Zellzyklusarrests [228]. Dies gibt der Zelle Zeit für DNA-Reparatur oder die Induktion der Apoptose bei irreparablen DNA-Schäden [164]. Darüber hinaus aktivieren ATM und ATR den p38-Signalweg, über den ebenfalls ein Zellzyklusarrest vermittelt werden kann [229]. Die p38-vermittelte Zellzyklusregulation wird in Kapitel 1.3.5.2 thematisiert.

In Reaktion auf DNA-Schäden kann der Zellzyklus am Übergang von der G₁- in die S-Phase bzw. am Übergang von der G₂- in die M-Phase angehalten werden oder innerhalb der S-Phase stark verlangsamt werden [230]. Der Übergang in die jeweils nachfolgende Zellzyklusphase wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) vermittelt [231]. Cyclin-abhängige Kinasen bilden mit Cyclinen ein Heterodimer, in dem die CDK als katalytische Untereinheit und das Cyclin als regulatorische Untereinheit fungieren [232]. Abhängig von der Kombination aus Cyclin und CDK sowie von posttranslationalen Modifikationen werden unterschiedliche Substrate phosphoryliert, die zelluläre Funktionen der jeweiligen Zellzyklusphase ausführen [231]. Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen wie p21 verhindern somit den Eintritt der Zelle in die nachfolgende Zellzyklusphase, was letztlich zu einem Zellzyklusarrest führt. Die Zellzyklusregulation im Rahmen der DNA-Schadensantwort im Vergleich der Zellzyklusphasen ist in Abb. 4 (siehe Seite 23) dargestellt.

1.3.4.1 G₁/S-Checkpoint

In der G₁-Phase des Zellzyklus können Zellen auf extrazelluläre Signale reagieren, die sie z.B. zur Proliferation oder Differenzierung anregen [233]. Alternativ zum Wiedereintritt in den Zellzyklus können die Zellen in der G₁-Phase aus dem Zellzyklus austreten und in einen Ruhezustand übergehen, in dem sie zwar transkriptionell aktiv sind und spezifische zelluläre Funktionen ausführen können, sich aber nicht teilen (G₀-Phase) [234]. Nach Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus muss die Zelle den Zellzyklus komplett durchlaufen, um wieder empfänglich für extrazelluläre Signale zu werden [233]. Der Übergang von der G₁- in die S-Phase wird durch die vermehrte Transkription von Proteinen vermittelt, die für die DNA-Synthese unerlässlich sind, z.B. die DNA-Polymerase, PCNA, die Thymidylat-Synthase und die Ribonukleotid-Reduktase [235] (siehe auch Abb. 4). Die Transkription dieser Faktoren wird durch Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie reguliert [235]. In der frühen G₁-Phase sind die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie an das Retinoblastom-Protein (Rb) gebunden und werden dadurch inaktiv gehalten [236]. Durch Bindung von Wachstumsfaktoren an extrazelluläre Rezeptoren wird die Transkription von Cyclin D in der G₁-Phase induziert und der Abbau von Cyclin D behindert; Cyclin D akkumuliert langsam in der Zelle [233]. Cyclin D bindet an CDK4 und CDK6 und bildet mit ihnen den Cyclin D-CDK4/6-Komplex [237]. Dieser Komplex kann das Retinoblastom-Protein und weitere Inhibitoren der E2F-Familie phosphorylieren und so inaktivieren [238, 239]. Die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie können nun an die DNA binden und die Transkription der oben genannten Proteine der DNA-Synthese und von Cyclin E initiieren [232]. Cyclin E bildet einen Komplex mit CDK2, der das Retinoblastom-Protein an zahlreichen Stellen phosphoryliert („hyperphosphoryliert“), sodass es vollständig inaktiviert wird [238]. Vermehrte Bildung von CDK2/Cyclin E-Komplexen führt außerdem zu einem positiven Feedback-Mechanismus, indem die Komplexe mehrere weitere Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen phosphorylieren, was zu deren proteasomalem Abbau führt [239, 240].

Infolge von DNA-Schäden wird vermehrt p21 exprimiert (siehe 1.3.3.5). P21 inhibiert in der G₁-Phase unter anderem die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6, sodass der Zellzyklus angehalten wird und die Zelle in der G₁-Phase verbleibt [241]. Außerdem phosphoryliert die durch ATM aktivierte Checkpointkinase 2 die Phosphatase Cdc25A, was zu deren Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau führt [242]. Cdc25A aktiviert u.a. CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 durch Entfernung inhibitorischer Phosphate [243]. In Abwesenheit von Cdc25A kann in der G₁-Phase insbesondere CDK2 nicht ausreichend aktiviert werden, was einen Zellzyklusarrest bedingt [244]. Außerdem kommt es in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden rasch zu einem ATM-vermittelten vermehrten proteasomalen Abbau von Cyclin D1, der unabhängig von der Induktion von p53 und p21 ist [245, 246].

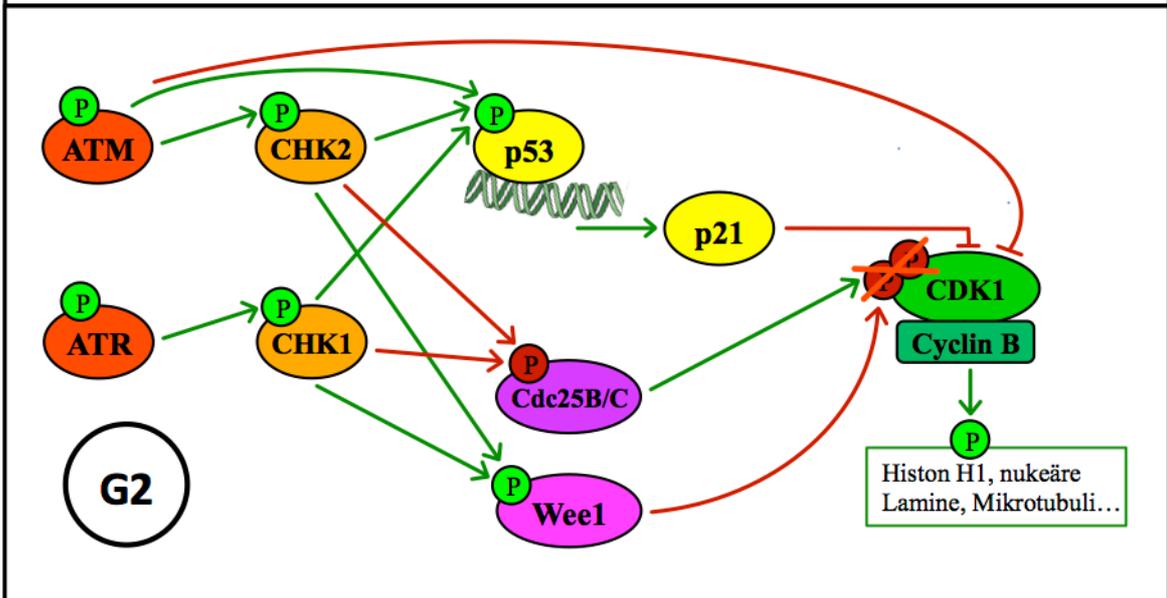
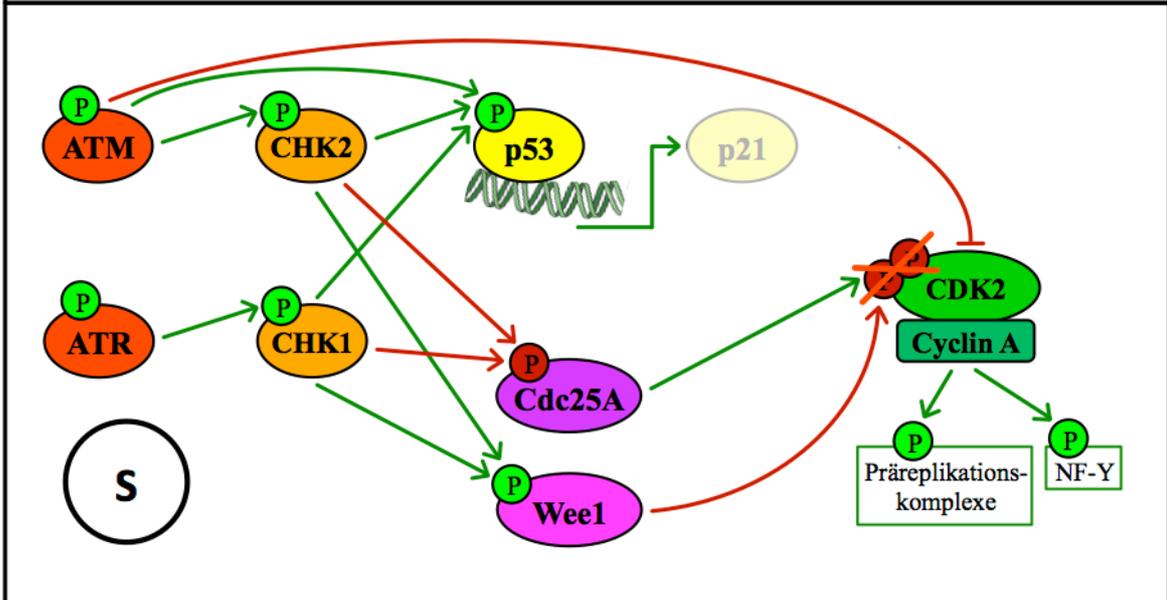
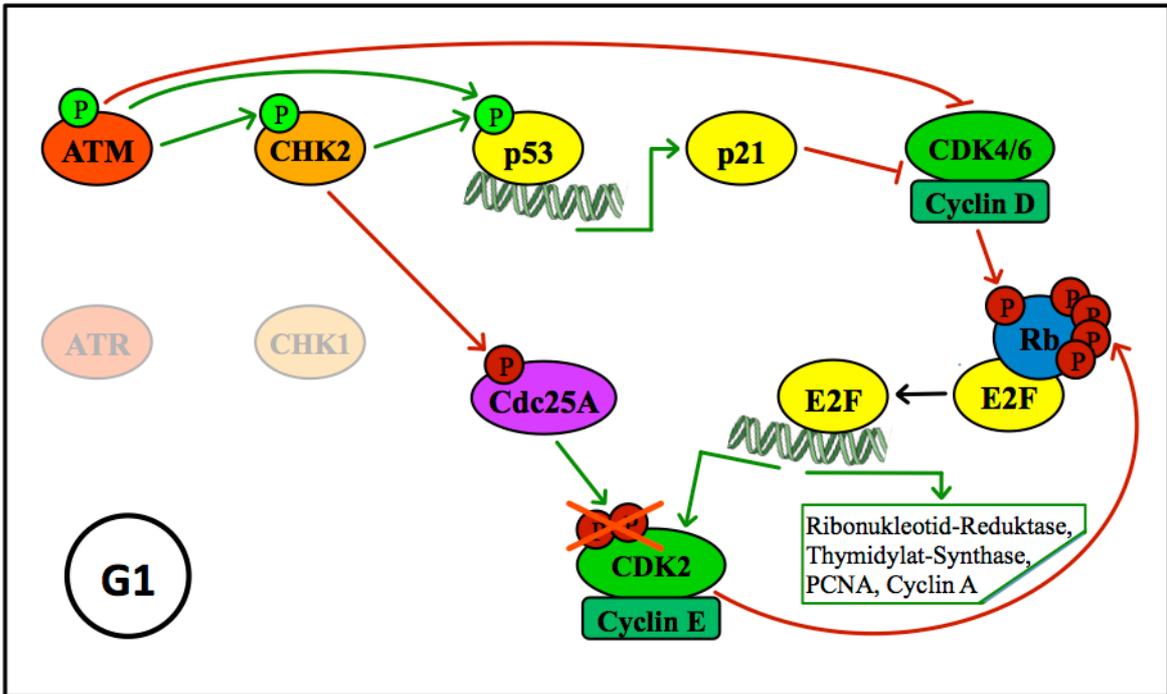


Abb. 4: Zellzyklusregulation im Rahmen der DNA-Schadensantwort

Vergleich der Zellzyklusregulation zwischen G₁-, G₂- und S-Phase nach Aktivierung von ATM bzw. ATR.

Abkürzungen: ATM = Ataxia Telangiectasia Mutated, ATR = Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3 related, Cdc25 (A/B/C) = Cell division cycle 25 (A/B/C) phosphatase, CDK = Cyclin-abhängige Kinase, CHK1/2 = Checkpointkinase1/2, E2F = E2 Transcription Factor, G_{1/2} = Gap-Phase 1/2, NF-Y = Nuclear Transcription Factor Y, p21 = Protein 21, p53 = Tumorprotein 53, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, Rb = Retinoblastom-Protein, S = Synthese-Phase. (Beim Erstellen dieser Abbildung wurden die Nukleinsäure-Designs von *Servier Medical Art* genutzt, lizenziert unter der Creative-Commons-Lizenz Attribution 3.0.)

1.3.4.2 Intra-S-Checkpoint

In der S-Phase wird durch Bildung eines Präreplikationskomplexes mit Lizenzierungsfaktoren an den Replikationsursprüngen sichergestellt, dass jeder DNA-Abschnitt genau einmal repliziert wird [233]. Entscheidend für das Fortschreiten der S-Phase ist ein Komplex aus Cyclin A und CDK2 [233]. Die Transkription von Cyclin A wird durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie stimuliert, nachdem deren Inhibitoren in der G₁-Phase inaktiviert worden sind [247] (siehe 1.3.4.1). Dadurch akkumuliert Cyclin A während der S-Phase [247]. Cyclin E hingegen wird, sobald es im Komplex mit CDK2 vorliegt, rasch phosphoryliert, in der Folge ubiquitiniert und proteasomal abgebaut [248]. Der nun gebildete CDK2/Cyclin A-Komplex phosphoryliert Komponenten des Präreplikationskomplexes, sodass die Replikation an den Replikationsursprüngen beginnen kann [233]. Im Gegensatz zum G₁/S- und G₂/M-Checkpoint wird in Reaktion auf DNA-Schäden in der S-Phase daher kein vollständiger Zellzyklusarrest eingeleitet, sondern das Fortschreiten der S-Phase nur stark verlangsamt, indem neue Präreplikationskomplexe daran gehindert werden mit der Replikation zu beginnen, während die bereits an anderen Replikationsursprüngen eingeleitete Replikation fortgesetzt wird [230].

CDK2 phosphoryliert beim Übergang von der G₁- in die S-Phase sowohl CtIP und EXO1, um den Reparaturmechanismus der *Homologous Recombination* in der S- und G₂-Phase zu ermöglichen [249, 250] (siehe auch 1.4.2), als auch ATRIP und die Checkpointkinase 1, sodass deren vollständige Aktivierung nur in der S- und G₂-Phase möglich ist [251, 252]. Nach Eintritt der Zelle in die S-Phase kann neben ATM daher auch ATR einen Zellzyklusarrest einleiten [253]. P21 wird in der S-Phase durch mit der Replikationsgabel assoziierte Ubiquitinligasen für den proteasomalen Abbau markiert, sodass es seine Rolle in der Zellzykluskontrolle in der S-Phase nicht vollständig ausführen kann [254]. Stattdessen ist der S-Phase-Checkpoint wesentlich von der Kinase Wee1 abhängig, die während der S-Phase vermehrt exprimiert wird und die Aktivität von CDK2 durch Phosphorylierung inhibiert [255]. CHK1 und CHK2 können Wee1 durch Phosphorylierung aktivieren [255]. Cdc25A entfernt inhibitorische Phosphate von Cyclin-abhängigen Kinasen und antagonisiert somit direkt Wee1 [256]. In der S-Phase kann neben CHK2 auch CHK1 Cdc25A phosphorylieren und so für den proteasomalen Abbau markieren [229].

1.3.4.3 G₂/M-Checkpoint

In der G₂-Phase des Zellzyklus wird überprüft, ob die DNA und wichtige zelluläre Strukturen wie die Zentrosomen korrekt dupliziert wurden, bevor die Mitose beginnen kann [233]. Es werden vermehrt Proteine synthetisiert, die für die Zellteilung erforderlich sind [91]. Der Eintritt in die Mitose wird durch einen Komplex aus Cyclin B und CDK1 vermittelt, der auch *Mitose Promoting Factor* oder *Maturation Promoting Factor* (MPF) genannt wird [257]. CDK1 liegt während des gesamten Zellzyklus im Zytoplasma vor und wird durch Bindung von Cyclin B aktiviert [258]. Cyclin B hingegen wird in der späten S-Phase und G₂-Phase vermehrt exprimiert, akkumuliert kontinuierlich während der G₂-Phase und wird erst kurz vor Beginn der Anaphase der Mitose rasch proteasomal abgebaut [257]. Die Induktion von Cyclin B in der späten S- und G₂-Phase des Zellzyklus wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt, der durch Cyclin A/CDK2 phosphoryliert und so aktiviert wird [259]. Der Komplex aus Cyclin B und CDK1 (MPF) phosphoryliert über 100 Zielproteine – unter anderem das Histon H1, nukleäre Lamine, mit Mikrotubuli und mit Zentrosomen assoziierte Proteine – und koordiniert so die Mitose [257]. Um den Eintritt in die M-Phase zu erwirken, muss MPF in den Zellkern translozieren, wo sich die Zielproteine befinden [260]. Während der G₂-Phase überwiegt die Aktivität des nukleären Exportproteins CRM1 gegenüber dem Importprotein Importin β , die beide an Cyclin B binden [261]. Der aktivierte MPF phosphoryliert Serinreste von Cyclin B an der Bindungsstelle für CRM1, sodass CRM1 nicht mehr an MPF binden kann [260]. Dadurch kommt es zur Translokation von MPF in den Zellkern, wo MPF den Eintritt in die Mitose vermittelt [261].

Die Kinase Wee1 ist auch in der G₂-Phase aktiv und phosphoryliert CDK1, sodass CDK1 inaktiviert wird [262]. Die Funktion von Wee1 wird in der G₂-Phase durch die Phosphatasen Cdc25B und Cdc25C antagonisiert [263]. Der G₂/M-Checkpoint kann wie der G₁-Checkpoint durch ATM oder ATR aktiviert werden, wobei ATR die wesentliche Rolle für das Aufrechterhalten eines Zellzyklusarrests in der G₂-Phase spielt [264]. Nachdem Wee1 durch die Checkpointkinasen phosphoryliert und so aktiviert worden ist, kommt es zum raschen Zellzyklusarrest durch inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 [256]. Parallel phosphorylieren CHK1 und CHK2 die Phosphatasen Cdc25B und Cdc25C, sodass diese inaktiviert werden [239]. In der G₂-Phase ist auch p21 wieder aktiv, welches über die Checkpointkinasen und p53 aktiviert wird und einen prolongierten Zellzyklusarrest vermittelt [265].

1.3.5 Bedeutung von MAP-Kinase-Signalwegen für die Cisplatin-induzierte DNA-Schadensantwort und Cisplatinresistenz

MAP-Kinasen sind eine Familie von Serin-/Threonin-Kinasen, die durch Wachstumsfaktoren, Mitogene, Zytokine und verschiedene Arten von zellulärem Stress in einer Kinase-Kaskade konsekutiv durch Phosphorylierung aktiviert werden [266]. Die Stimulation der primär aktivierten MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K) erfolgt häufig durch Signaltransduktion über membranständige Rezeptoren, z.B. G-Protein-gekoppelte

Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinase oder Ionenkanäle [267]. Infolge der weiteren rezeptorinduzierten Signaltransduktion aktivieren Proteinkinase oder kleine GTPasen wie Ras und Rac die MAP-3K [268]. Diese phosphoryliert zunächst die MAPK-Kinase-Kinase (MAP-2K), welche schließlich die jeweilige MAP-Kinase (MAPK) durch Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrests aktiviert, die durch genau eine Aminosäure voneinander getrennt sind [268]. MAP-2K sind Kinasen dualer Spezifität; dies gewährleistet eine hohe Sicherheit und beugt Fehlern bei der Aktivierung von MAPK vor [269]. Die am Ende der MAPK-Kaskade aktivierte Effektor kinase phosphoryliert Transkriptionsfaktoren und Proteinkinase sowie zahlreiche weitere nukleäre und zytosolische Substrate, die Proliferation, Zelldifferenzierung, Inflammation und Apoptose regulieren [270]. Die Unterfamilien der MAP-Kinasen werden anhand der Aminosäuresequenz in ihrem Aktivierungssegment in Familien unterteilt: Es werden die Jun-N-terminalen Kinasen (JNKs), die p38-Familie und die *Extracellular Signal Regulated Kinases* (ERKs) unterschieden [267].

1.3.5.1 Jun-N-terminale Kinasen (JNKs)

Der JNK-Signalweg wird in Reaktion auf Umgebungsstress wie osmotischen oder oxidativen Stress, Hitze und DNA-Schäden, Inflammation und Veränderungen des Zytoskeletts aktiviert [271]. Die Aktivierung des JNK-Signalwegs ist auch Teil der ER-Stress-Antwort (siehe 1.5.1.1) [272]. Im JNK-Signalweg fungieren MKK4 und MKK7 als MAP-2K mit dualer Spezifität [273]. Diese können durch zahlreiche verschiedene MAP-3K aktiviert werden [271]. Einige der MAP-3K, z.B. ASK1, die durch Anfall reaktiver Sauerstoffspezies aktiviert wird (siehe 1.2.3.2), sowie die MAP-2K MKK4 aktivieren sowohl den JNK- als auch den p38-Signalweg [266, 267].

Infolge von DNA-Schäden wird nach Aktivierung von ATM und Transport des ATM/NEMO-Komplexes ins Zytoplasma die Kinase TAK1 durch NEMO aktiviert, die neben dem NF- κ B Signalweg auch den JNK- und p38-Signalweg einleiten kann und in diesem Zusammenhang als MAP-3K fungiert [274]. Darüber hinaus können JNKs auch infolge der Bindung von Cisplatin an zytoplasmatische Proteine aktiviert werden [270]. Die Aktivierung von JNKs geschieht infolge Cisplatin-induzierter DNA-Schäden rasch innerhalb der ersten Stunde [275]. Dennoch sind auch langsamere Aktivierungswege beschrieben, die eine verzögerte und länger anhaltende JNK-Aktivierung zur Folge haben [270]. Die Aktivierung von NF- κ B durch ATM (siehe 1.3.3.4) fördert die Transkription von TNF α , welches von der Zelle sezerniert wird und autokrin über den TNF-Rezeptor 1 zur Aktivierung des JNK Signalwegs führt [276]. Außerdem wird angenommen, dass Veränderungen der Lipidzusammensetzung in der Zellmembran zur Aktivierung des JNK-Signalwegs infolge von DNA-Schäden führen können [270, 277].

Nach ihrer Aktivierung translozieren die JNKs in den Zellkern und regulieren zahlreiche Transkriptionsfaktoren [278]. Eines der hauptsächlichen Zielproteine des JNK-Signalwegs ist der Transkriptionsfaktor c-Jun, der durch JNK-vermittelte Phosphorylierung aktiviert wird [279]. c-Jun dimerisiert mit anderen Proteinen der Jun-, der Fos- oder der ATF2-

Familie und bildet das Heterodimer *Activator Protein 1* (AP-1) [280]. Durch Phosphorylierung von c-Jun wird AP-1 aktiviert und weist eine höhere Affinität zu abhängigen Promotoren auf [281]. Neben c-Jun sind auch ATF2 und Jun D JNK-Substrate [281]. AP-1 initiiert als Transkriptionsfaktor in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden die Expression mehrerer Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, darunter MSH2, MLH1, XPA und ERCC1 [282]. Andererseits fördert AP-1 auch die Expression von zahlreichen proapoptotischen Genen, wie Bak, Fas-Ligand oder TNF α [283]. Dadurch können über die JNK/AP-1 Achse abhängig vom Kontext sowohl Cisplatinsensitivität als auch -resistenz begünstigt werden.

Die Aktivierung von AP-1 durch JNKs ist nur eins von vielen Beispielen für deren duale Rolle in Bezug auf Apoptose und DNA-Reparatur bzw. Zellproliferation sowie Cisplatinsensitivität und -resistenz. Die Auswirkung der Aktivierung von JNKs ist abhängig vom Stimulus, vom Zelltyp, von der Dauer ihrer Aktivierung und von der simultanen Aktivierung anderer Signalwege [278]. Außerdem können die unterschiedlichen Isoformen der JNKs in einigen Konstellationen gegensätzliche Effekte hervorrufen [281]. JNKs greifen sowohl durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression pro- und antiapoptotischer Gene beeinflussen, als auch durch Phosphorylierung von Proteinen der Bcl-2-Familie in die Regulation der Apoptose ein [283]. Unter anderem wird p53 durch JNKs reguliert, wobei die Isoform JNK1 die p53-Expression supprimiert, während JNK2 durch Bindung an p53 dessen Abbau verhindert und p53 so stabilisiert [278]. Somit kann die Aktivierung der JNK1 durch Herunterregulierung von p53 Cisplatinresistenz begünstigen [284]. Weitere Transkriptionsfaktoren, die durch JNKs aktiviert werden, sind FOXO3a, welcher vor allem die Expression proapoptotischer Proteine wie Fas-Ligand, Bim und Puma stimuliert, sowie STAT3, der überwiegend Überlebenssignale vermittelt [271]. Zudem sind mehrere Proteine der Bcl-2-Familie direkte Substrate von JNKs. Während die antiapoptotischen Faktoren Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 durch JNK-vermittelte Phosphorylierung inhibiert werden [273], hat die Phosphorylierung durch JNKs aktivierende Wirkung auf die proapoptotischen Proteine Bax, Bim und Bad [273, 283]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass JNKs, die infolge einer Stimulation der Zelle durch TNF α aktiviert werden, unabhängig von Caspase 8 die Spaltung von Bid vermitteln, sodass das Fragment jBid entsteht [285]. Das Fragment jBid vermittelt die selektive Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem mitochondrialen Intermembranraum [285].

Während lang andauernde Aktivierung von JNKs Apoptose begünstigt, fördert die kurzfristige Aktivierung Zellwachstum und Überleben [286, 287]. Über die molekularen Mechanismen, die die Dauer der JNK-Aktivierung determinieren, kann bislang nur spekuliert werden. Die Phosphatase MKP1 inaktiviert JNKs durch Dephosphorylierung [288]. Es wird angenommen, dass unreparierte DNA-Schäden zur verminderten Transkription von MKP1 führen, was eine verlängerte Aktivierung der JNKs bedingt [289]. Eine Hypothese ist auch, dass die anhaltende Aktivierung von JNKs über autokrine Stimulation der Zelle durch NF- κ B-induziertes TNF α zustande kommt [277].

In Reaktion auf DNA-Schäden können neben ATM auch JNKs H2AX an Serin 139 phosphorylieren [290]. Es ist möglich, dass JNKs an der pannukleären Phosphorylierung von H2AX-Molekülen infolge irreparabler DNA-Schäden beteiligt ist, wodurch ein Switch von DNA-Reparatur (bei lokalisierter Phosphorylierung von H2AX in der Umgebung eines Doppelstrangbruchs) zur Einleitung der Apoptose (bei pannukleärer H2AX-Phosphorylierung) herbeigeführt wird [291]. Behandlung mit Cisplatin für eine Stunde mit einer Dosierung deutlich unterhalb der IC₅₀ führt in Cisplatin-sensitiven Zervixkarzinomzellen *in vitro* zur mehrere Tage andauernden Aktivierung von JNKs [173, 275]. In Cisplatin-resistenten Zervix- [275] und Ovarialkarzinomzellen [292] konnte gezeigt werden, dass die lang andauernde Aktivierung von p38 und JNKs in Reaktion auf Cisplatin abgeschwächt ist. Es wird angenommen, dass die verminderte Aktivierung von p38 und JNKs zu reduzierter Apoptose führt und dadurch Cisplatinresistenz begünstigt. In Cisplatin-resistenten Lungen- und Ovarialkarzinomzellen ist die Expression der MKP1 erhöht, was zu einer schnelleren Inaktivierung der JNK führt und so die Cisplatin-induzierte, anhaltende Aktivierung der JNK mit konsekutiver Apoptose verhindert [293]. Andererseits können JNKs Autophagie begünstigen und geschädigte Zellen auf diese Weise vor Cisplatin-induzierter Apoptose bewahren [294]. Des Weiteren vermitteln JNKs in der Umgebung apoptotischer Zellen kompensatorische Zellproliferation, was ebenfalls Cisplatinresistenz begünstigen kann [294]. JNKs reduzieren außerdem die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, was die Zytotoxizität von Cisplatin beeinträchtigt [292]. Somit nehmen JNKs bezüglich Cisplatinresistenz eine duale Rolle ein, da sie einerseits auf verschiedenen Wegen Cisplatinresistenz fördern, andererseits aber an der Cisplatin-induzierten Apoptose wesentlich beteiligt sind. Darüber hinaus hat die Aktivierung verschiedener JNK-Isoformen mitunter gegensätzliche Effekte (s.o.). Isoform-spezifische Inhibitoren sind bislang nicht verfügbar [295]. Dies erschwert zielgerichtete Therapien zur Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit mit JNKs als Ansatzpunkt.

1.3.5.2 p38

Die p38-MAPK-Familie wird in Reaktion auf Stress (z.B. Hitze, osmotischen, oxidativen oder genotoxischen Stress) und Stimulation der Zelle durch inflammatorische Zytokine aktiviert [270, 296]. Der p38-Signalweg kann durch zahlreiche verschiedene MAP-3K eingeleitet werden, einige davon können sowohl den JNK-Signalweg als auch den p38-Signalweg aktivieren [297]. Die MAP-3K können ihrerseits auf verschiedene Arten aktiviert werden, u.a. durch Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierung oder durch Interaktion mit kleinen G-Proteinen der Rho-Familie [298]. Die vielfältigen Aktivierungsmöglichkeiten der Kaskade ermöglichen die Beteiligung des p38-Signalwegs in Reaktion auf verschiedene Stimuli und eine Mitaktivierung im Zuge anderer Signalwege [266]. Als MAP-2K fungieren MKK3 und MKK6, die wie die anderen MAP-2K duale Spezifität aufweisen [298].

Der p38-Signalweg wird im Zuge der DNA-Schadensantwort mitaktiviert und begünstigt einen Zellzyklusarrest [229]. An der Aktivierung von p38 im Zuge der DNA-

Schadensantwort sind sowohl ATM als auch ATR beteiligt [299]. ATM phosphoryliert direkt die MAP-3K TAO des p38-Signalwegs, die dadurch aktiviert wird [299]. P38 kann einen Zellzyklusarrest sowohl am G₁/S- Checkpoint als auch in der S-Phase und am G₂/M-Checkpoint vermitteln [229, 300]. Cyclin D1 und die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie werden p38-abhängig herunterreguliert, während die Expression von CDK-Inhibitoren gesteigert wird [301]. Zudem phosphoryliert p38 das Retinoblastom-Protein, sodass es nicht mehr durch den CDK4/6-Cyclin D-Komplex inaktiviert werden kann [302]. Infolge Cisplatin-induzierter DNA-Schäden wird der p38-Signalweg ATR-abhängig aktiviert und vermittelt einen S-Phase-Arrest [300]. P38 aktiviert durch Phosphorylierung die *MAP Kinase Activated Proteinkinase 2* (MK2) [267]. Diese markiert die Phosphatase Cdc25A, die inhibitorische Phosphate von CDKs entfernt, durch Phosphorylierung für die Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradierung [300].

P38 vermittelt auch proapoptotische Funktionen, z.B. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a [303], was zur Transkription von proapoptotischen Genen wie Bim [304], Puma [305] und Fas-Ligand [306] führt. Zudem aktiviert p38 durch Phosphorylierung p53 [307]. Aktiviertes p38 fördert die Einleitung der Apoptose bei Akkumulation von ROS [308]. Aufgrund seiner Funktionen bei der Zellzyklusregulation, der Einleitung der Apoptose sowie der Vermittlung von Differenzierung und Seneszenz wird p38 häufig als Tumorsuppressor bezeichnet [309]. In Frühstadien der Tumorentstehung übernimmt p38 in der Tat tumorsuppressive Funktionen [301]. In Spätstadien begünstigt p38 jedoch Invasion, Migration, Angiogenese und Inflammation maligner Tumoren [301]. Dies ist u.a. durch Aktivierung des p38-Signalwegs in Krebs-assoziierten Fibroblasten (*Cancer associated fibroblasts*, CAF) bedingt, in denen p38 die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen begünstigt, die dann das Wachstum der Tumorzellen stimulieren [310]. NF-κB wird durch p38 aktiviert [298]. Zudem erhöht p38 die Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) und des *Hypoxia Inducible factor 1a* (HIF1α) und fördert so die Angiogenese [279]. Des Weiteren reguliert p38 in Blasenkarzinomzellen die Expression von Matrix-Metalloproteinasen, die die extrazelluläre Matrix in der Umgebung von Tumorgewebe degradieren und so Invasion und Metastasierung erleichtern [311].

P38 vermittelt *in vitro* Cisplatinresistenz in Tumorzellen, während p38-Inhibitoren die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin erhöhen können [312, 313]. Durch Akkumulation von ROS in Zellen, die mit p38-Inhibitoren behandelt wurden, wird die Aktivität des JNK-Signalwegs hochreguliert, was Cisplatin-induzierte Apoptose begünstigt [312]. Andererseits weisen Zervixkarzinomzellen mit erworbener Cisplatinresistenz *in vitro* eine deutlich geringere und kürzere Aktivierung von p38 auf als Cisplatin-sensitive Zervixkarzinomzellen [275]. Wahrscheinlich ist die p38-vermittelte DNA-Schadensantwort von der Stärke und Dauer der Aktivierung von p38 abhängig [275, 314]. Transiente und geringere Aktivierung führen eher zu Anpassungsvorgängen und Überleben der Zelle, während lang andauernde und starke Aktivierung die Apoptose einleiten [298].

1.3.5.3 Extracellular Signal Regulated Kinases (ERKs)

Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 werden infolge extrazellulärer Signale vor allem durch Wachstumsfaktoren und mitogene Stimuli aktiviert [270]. Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, der zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt, hat besondere Bedeutung für die Entstehung und Invasion maligner Tumore [269]. Hier fungiert Ras als übergeordnetes Aktivierungsprotein, Raf als MAP-3K, die MAPK/ERK Kinase (MEK) als MAP-2K und ERK als MAPK [315]. Mutationen in Ras-Genen, die eine dysfunktionale, von extrazellulären Signalen entkoppelte Aktivierung dieses Signalwegs bedingen, gehören zu den häufigsten Mutationen in malignen Tumoren [269]. Hier ist insbesondere das Onkogen K-Ras zu nennen, welches in etwa 30% der malignen Tumoren mutiert ist [316]. Ras ist ein monomeres G-Protein, dessen Aktivität vom gebundenen Guaninnukleotid abhängig ist [317]. In seiner inaktiven Form, Ras-GDP, ist es über einen Lipidanker an der Innenseite der Zellmembran verankert. Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, z.B. durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren, führt zur Rekrutierung des Adapterproteins GRB2 und des Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS an die phosphorylierten Tyrosinreste an der Innenseite des Rezeptors [318]. SOS überführt dann das benachbarte inaktive Ras-GDP in das aktive Ras-GTP [318]. Durch Bindung an Ras und Rekrutierung an die Zellmembran wird Raf aktiviert und phosphoryliert in der Folge MEK, welche daraufhin ERK an einem Threonin- und einem Tyrosinrest phosphoryliert, die durch genau eine Aminosäure getrennt sind (duale Spezifität, siehe oben) [269]. ERK vermittelt in erster Linie Zellproliferation und -überleben durch Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, darunter onkogene Proteine der Fos-, Jun- und Myc-Familie [318] sowie STAT3 [267], was die Rolle des Ras/Raf/MEK/ERK Signalwegs in der Entstehung maligner Tumoren verdeutlicht. Zudem markiert ERK FOXO3a durch Phosphorylierung für den Export aus dem Zellkern und den nachfolgenden proteasomalen Abbau, wodurch die Apoptose inhibiert wird [319]. Auch die Progression maligner Tumoren wird ERK-abhängig stimuliert; ERK beeinflusst die Transkription von Zielgenen, die Invasion, Migration, Metastasierung und Angiogenese vermitteln [269].

Andererseits ist ERK auch an der DNA-Schadensantwort beteiligt, wobei ERK die Checkpoint-Aktivierung mit nachfolgendem Zellzyklusarrest begünstigt [320]. Die Phosphorylierung von γ H2AX, CHK1, CHK2 und p53 in Reaktion auf DNA-Schäden werden durch ERK-Aktivität gefördert [320]. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ERK die Aktivierung von ATM und ATR erleichtert [320]; der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar [321]. ERK interagiert direkt mit der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase PARP1, die DNA-Reparaturprozesse koordiniert (siehe 1.4.4), und trägt dadurch zu deren Aktivierung bei [322, 323]. Auch an der Cisplatin-induzierten Apoptose ist ERK beteiligt [323]. In Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden wird ERK aktiviert und fördert die Akkumulation und Phosphorylierung von p53 [324]. Außerdem wird die Expression der proapoptischen Proteine Bax [325] und Noxa [326] infolge einer Cisplatinexposition ERK-abhängig hochreguliert. Zudem wird das antiapoptische Protein Mcl-1 (siehe 1.5.1.1) durch ERK-vermittelte

Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markiert [318]. In Urothelkarzinomzellen scheint die Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs jedoch eher Cisplatinresistenz zu vermitteln [327, 328].

1.4 DNA-Reparaturmechanismen und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz

1.4.1 Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Läsionen

1.4.1.1 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Die Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Intrastrang-Crosslinks erfolgt hauptsächlich über die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) [329]. Beim Menschen werden zwei Wege der NER voneinander abgegrenzt, die sich vor allem durch den Mechanismus der Erkennung der DNA-Läsion unterscheiden [330]. Die globale Genomreparatur (GGR) kann alle Bereiche der DNA reparieren, während die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) Defekte im Bereich der transkribierten DNA schneller und effizienter erkennt [331]. Bei der transkriptionsgekoppelten Reparatur bedingen sperrige DNA-Läsionen wie Cisplatin-Addukte durch die einhergehende Konformationsänderung der DNA-Doppelhelix ein Hindernis, das die RNA-Polymerase nicht überwinden kann [332]. Dieser Transkriptionsstop initiiert die TCR und führt zur Bindung von ERCC6/CSB und ERCC8/CSA an die blockierte RNA-Polymerase [333]. ERCC8/CSA rekrutiert den TCR-Faktor UVSSA und konsekutiv den Transkriptionsfaktor TFIIH an die RNA-Polymerase, der die RNA-Polymerase von der DNA-Läsion verdrängt, sodass die NER beginnen kann [334]. Die GGR hingegen basiert darauf, dass Sensorproteine Konformationsänderungen in der DNA unabhängig von der Transkription detektieren können. Der XPC-Rad23B-Komplex erkennt direkt sperrige DNA-Läsionen, die zu erheblicher Distorsion der DNA geführt haben, und rekrutiert den Transkriptionsfaktor TFIIH [335].

Die nachfolgenden Schritte der NER laufen unabhängig davon, ob der DNA-Schaden über TCR oder GGR erkannt wurde, folgendermaßen ab: Durch Assoziation mit dem Sensor- und Gerüstprotein XPA und der Endonuklease ERCC5/XPG werden die Kinase-Untereinheiten von TFIIH, die für dessen Transkriptionsaktivität entscheidend sind, von den Untereinheiten ERCC2/XPD und ERCC3/XPB freigesetzt, sodass diese ATPase- und Helikaseaktivität erlangen [336]. TFIIH wird dadurch von einem Transkriptionsfaktor zu einem Reparaturprotein [334]. ERCC2/XPD und ERCC3/XPB entwinden dann ATP-abhängig einen Bereich von ca. 20-30 Basenpaaren [331]. Das Sensor- und Gerüstprotein XPA erkennt vor allem Distorsionen der DNA-Doppelhelix und Übergänge von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA [337], RPA hingegen bindet an den unbeschädigten Einzelstrang und schützt ihn vor dem Abbau [331]. Der eröffnete DNA-Bereich wird durch XPA und RPA stabilisiert [333]. Es wird angenommen, dass die Assoziation von XPA und RPA an einem DNA-Schaden das Vorliegen einer für die NER

geeigneten DNA-Läsion verifiziert [338]. In der Folge werden die ausführenden Endonukleasen der NER rekrutiert [337]. Zwei Endonukleasen setzen in der detektierten DNA-Läsion eine Inzision, sodass der beschädigte Bereich herausgeschnitten wird [339]. Dabei schneidet zuerst ein Heterodimer aus ERCC1 und ERCC4/XPF am 5'-Ende, die Inzision am 3'-Ende wird danach durch ERCC5/XPG ausgeführt [340]. Die fehlenden Basen werden durch die DNA-Polymerase δ - bzw. die DNA-Polymerase ϵ bei DNA-Schäden während der Replikation - resynthetisiert; dabei wird der unbeschädigte Komplementärstrang als Matrize genutzt [331]. Eine Ligase verschließt anschließend die Inzisionen, indem sie die beiden Enden des reparierten Oligonukleotids mit dem übrigen DNA-Strang verbindet [341].

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur kann Cisplatin-Addukte reparieren, bevor Apoptose induziert wird, sodass eine geringere Expression der Gene, die für die beteiligten Proteine kodieren, die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöht [342]. Im Umkehrschluss kann verstärkte NER Cisplatinresistenz bedingen [343]. Da die Nukleotid-Exzisionsreparatur einen intakten Matrizenstrang voraussetzt, kann sie für sich genommen jedoch nur die Cisplatin-induzierten Intrastrang-Crosslinks reparieren. Für die Interstrang-Crosslinks und die dadurch entstehenden Doppelstrangbrüche sind zusätzliche Reparaturmechanismen erforderlich [344].

1.4.1.1 a) Bedeutung von ERCC1 für Cisplatinresistenz

In dieser Arbeit wird die mRNA-Expression von ERCC1 untersucht, das bei der gemeinsamen Endstrecke von GGR und TCR relevant ist (siehe oben). ERCC1 spielt außerdem eine Rolle bei der Reparatur von Interstrang-Crosslinks durch den Fanconi-Anämie-Signalweg und von DNA-Doppelstrangbrüchen durch *Homologous Recombination* (siehe 1.4.3 bzw. 1.4.2.1). Erhöhte Expression von ERCC1 ist in verschiedenen Tumorentitäten mit Cisplatinresistenz assoziiert, insbesondere in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC), Ovarialkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereichs (HNSCC) [345–347]. Auch in Mammakarzinomzellen [348], hepatozellulären Karzinomzellen (HCC-Zellen) [349], malignen Melanomzellen [350], Zervixkarzinomzellen [351] und Ösophaguskarzinomzellen [352] gehen hohe ERCC1-Level *in vitro* mit Cisplatinresistenz einher. Hodentumoren zeichnen sich durch eine herausragende Cisplatinempfindlichkeit aus, sodass sogar metastasierte Erkrankungen durch Cisplatin-basierte Chemotherapien kurativ behandelt werden können [57]. Dies wird auf eine geringe Reparaturkapazität für Interstrang-Crosslinks im Hoden aufgrund sehr niedriger ERCC1-Level zurückgeführt [353]. In mehreren Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass ERCC1 infolge von Cisplatinexposition hochreguliert wird und erworbene Cisplatinresistenz vermitteln kann, z.B. in NSCLC-Zellen *in vitro* [354] und Ovarialkarzinomzellen *ex vivo* [355]. In präklinischen Modellen werden zielgerichtete Therapien erprobt, die darauf abzielen, die Expression von ERCC1 zu supprimieren und dadurch Cisplatinresistenz zu überwinden [348, 356–358].

Retrospektive Analysen [359, 360] und erste prospektive Studien [361] in fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen haben gezeigt, dass niedrige ERCC1-Level mit einem besseren Ansprechen auf Cisplatin-basierte Chemotherapien einhergehen. Bei Patienten, die nicht mit einer Platin-basierten Chemotherapie behandelt werden, ist hohe ERCC1-Expression hingegen mit einer günstigeren Prognose assoziiert [362]. Insofern ist ERCC1 ein interessanter Biomarker, um vorherzusagen, welche Patienten am meisten von einer Cisplatin-basierten Chemotherapie profitieren [362]. Die Bedeutung von ERCC1 für *erworbene* Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen ist jedoch noch weitgehend unklar [363].

1.4.1.2 Mismatch-Reparatur (MMR)

Die Mismatch-Reparatur (MMR) ist ein DNA-Reparaturmechanismus, der an der Erkennung von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden beteiligt ist [364]. Bei der MMR bilden verschiedene MMR-Proteine Heterodimere, die fehlerhafte Basenpaarungen nach der Replikation erkennen und die Mismatch-Reparatur induzieren [365]. Die MutS-Homologe 2 und 6 (MSH2 und MSH6) bilden das Heterodimer MutS α , MSH2 und MSH3 bilden MutS β [366]. Neben MutS-Homologen sind auch die MutL-Homologe MLH1 und PMS2, die das Heterodimer MutL α bilden, an der Mismatch-Reparatur beteiligt [366]. MutS-Heterodimere werden durch gebundene Adenosinnukleotide reguliert [367]. Sie erkennen Konformationsänderungen in der DNA, die durch fehlerhafte Basenpaarung verursacht werden, was zum Austausch von ADP gegen ATP führt [367]. Dadurch ändert sich die Konformation von MutS, sodass es sich von der fehlerhaften Basenpaarung löst, um an der DNA Einzelstrangbereiche in Replikationsarealen zu detektieren und so zwischen Matrizen- und Tochterstrang zu differenzieren [368]. Nach Erkennung der fehlerhaften Basenpaarung durch MutS wird MutL α rekrutiert [369]. MutL α kann durch seine Endonukleaseaktivität den fehlerhaften DNA-Tochterstrang spalten, nachdem es durch den Prozessivitätsfaktor PCNA aktiviert worden ist [369]. Die 5'-3'-Exonuklease EXO1 wird durch MutS aktiviert und ist ebenfalls am Schneiden fehlerhafter DNA-Abschnitte beteiligt [365]. Der herausgeschnittene DNA-Bereich wird anschließend durch die DNA-Polymerasen δ oder ϵ aufgefüllt [370]. Die DNA Ligase I verbindet den korrigierten Bereich wieder mit dem übrigen Teil des DNA-Strangs [365].

Durch MMR-Mechanismen können allerdings nur fehlerhafte Basenpaarungen bei intaktem Matrizenstrang repariert werden. Cisplatin-induzierte Schädigungen sind überwiegend basenübergreifende Addukte, die eine Distorsion der DNA bedingen und durch MMR-Mechanismen nicht entfernt werden können [371]. Wenn eine DNA-Läsion nicht durch MMR repariert werden kann, können MMR-Proteine die Einleitung der Apoptose vermitteln [370]. MSH2 rekrutiert und aktiviert infolge von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden ATR, was über Aktivierung der Checkpointkinasen und von p53 zur Apoptose führt [372, 373]. Die MMR-Proteine können aber auch unabhängig von ATM, ATR und p53 den intrinsischen Signalweg der Apoptose einleiten [374]. Außerdem geht der Versuch, Cisplatin-Addukte, Intra- oder Interstrang-Crosslinks durch MMR zu

reparieren, mit einer Blockade anderer Reparaturmechanismen einher, sodass die Addukte nicht repariert werden können [368, 375].

1.4.1.2 a) Bedeutung von MSH2 und MLH1 für Cisplatinresistenz

In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression von MSH2 bzw. MLH1 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen. Verminderte Expression von Komponenten der Mismatch-Reparatur, insbesondere von MSH2 und MLH1, geht mit Cisplatinresistenz einher [376, 377]. Im Xenograft-Modell zeigt sich eine verminderte Cisplatinempfindlichkeit in MSH2-Knockout-Tumoren [378]. Bei Ovarialkarzinom- und NSCLC-Patienten konnte gezeigt werden, dass es nach initialer Cisplatin-Behandlung zur Hypermethylierung und somit Inaktivierung von Promotorregionen der MMR-Gene MSH2 und MLH1 kommt, sodass deren Transkription inhibiert wird, was mit einem schlechterem Ansprechen auf eine nachfolgende Cisplatintherapie einhergeht [379, 380]. In einer retrospektiven Analyse von Ösophaguskarzinomen ist die MLH1-Expression nach Behandlung mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie häufig herunterreguliert, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht [381]. Reduzierte Expression von MSH2 und MLH1 kann auch in einem erheblichen Anteil von Urothelkarzinomen der Harnblase nachgewiesen werden [382, 383]. In einem genomweiten CRISPR-Cas9-Knockout-Screen in Harnblasenkarzinomzellen wurde MSH2 als das beste Kandidatengen identifiziert, um Chemoresistenz gegenüber Cisplatin vorherzusagen [384]. Das schlechtere Ansprechen auf Cisplatin-basierte Chemotherapien bei niedriger MSH2-Expression konnte durch retrospektive Analyse von Harnblasenkarzinomproben verifiziert werden [384]. Niedrige MLH1- und MSH2-Level korrelieren auch in einer ersten prospektiven klinischen Studie mit Chemoresistenz gegenüber Cisplatin [361]. Zur Bedeutung von MSH2 und MLH1 für *erworbene* Cisplatinresistenz in Blasen Tumoren gibt es bis dato kaum Erkenntnisse.

1.4.1.3 Transläsionssynthese

Bei der Transläsionssynthese wird durch spezielle DNA-Polymerasen (DNA-Polymerasen η , ι , κ , ζ und Rev1), die eine geringere Replikationsgenauigkeit aufweisen als die replikativen DNA-Polymerasen δ und ϵ , die Replikation über eine DNA-Läsion hinweg ermöglicht [385]. Möglich sind sowohl eine Transläsionssynthese mit korrektem Baseneinbau, bei dem die DNA-Polymerase die spezielle DNA-Läsion (z.B. 8-Oxo-Guanin [386] oder UV-induzierte Pyrimidin-Dimere [387]) erkennen und in den Tochterstrang die korrekte Base einbauen kann, als auch eine mutagene Transläsionssynthese, bei der die Basen im Bereich der DNA-Läsion nicht korrekt abgelesen werden können und zufällige Basen in den Tochterstrang eingebaut werden [385]. Die Rekrutierung der entsprechenden Polymerasen an die DNA erfolgt infolge posttranslationaler Modifikation des Prozessivitätsfaktors PCNA durch Monoubiquitinierung [388]. Aufgrund ihrer geringeren Prozessivität diffundieren die DNA-Polymerasen der Transläsionssynthese bereits nach Synthese einiger weniger Nukleotide wieder von der DNA ab; die

replikativen DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ setzen dann die Replikation fort [389]. In der S-Phase behindern Cisplatin-induzierte Intrastrang-Crosslinks die replikativen DNA-Polymerasen, was zur Blockade der Replikationsgabel führt. Die DNA-Polymerase η (POLH) ist in der Lage, in Kooperation mit der DNA-Polymerase ζ trotz eines bestehenden Cisplatin-induzierten 1,2-Intrastrang-Crosslinks zwischen Guaninen die Replikation korrekt fortzusetzen [390–392] und ist daher für die DNA-Schadensantwort auf Cisplatin von besonderem Interesse. Alternativ kann auch eine fehleranfälliger Transläsionssynthese durch Kooperation der DNA-Polymerasen κ und ζ die 1,2-Intrastrang-Crosslinks umgehen [392].

1.4.1.3 a) Bedeutung der DNA-Polymerase η (POLH) für Cisplatinresistenz

In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression der DNA-Polymerase η in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen. In Ovarialkarzinom-Stammzellen [393] und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs [394] konnte *in vitro* sowie in retrospektiven Analysen operativ entnommener Gewebeproben von Patienten gezeigt werden, dass hohe Expression der Polymerase η intrinsische Cisplatinresistenz mitbedingt. Urothelkarzinom-Zelllinien mit höherer intrinsischer Sensitivität gegenüber Cisplatin zeigen eine geringere Expression der DNA-Polymerase η als Cisplatin-resistente Zelllinien [395]. In NSCLC-Zellen wird die DNA-Polymerase η *in vitro* infolge einer Cisplatinexposition hochreguliert, woraus sich Hinweise ergeben, dass dieser Mechanismus auch bei erworbener Cisplatinresistenz von Bedeutung sein kann [396]. Außerdem konnte in NSCLC-Zellen *in vitro* gezeigt werden, dass durch die DNA-Polymerase η vermittelte Cisplatinresistenz wesentlich durch alternative Polyadenylierung des POLH-Transkripts beeinflusst wird [395]. Sowohl die DNA-Polymerase η selbst als auch die Mechanismen der alternativen Polyadenylierung kommen somit für zielgerichtete Therapien zur Sensitivierung Cisplatin-resistenter Zellen in Betracht [393, 395, 397, 398].

1.4.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Cisplatin-induzierten Interstrang-Crosslinks führen häufig zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die als besonders relevant für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin gelten [85]. Des Weiteren können an blockierten Replikationsgabeln in der S-Phase DNA-Doppelstrangbrüche entstehen [399]. Als Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche stehen *Non Homologous End Joining* (NHEJ) oder *Homologous Recombination* (HR) zu Verfügung [330]. Die HR erfordert das homologe Chromosom als Matrize, um den genetischen Informationsverlust des Doppelstrangbruchs zu kompensieren [400]. Daher kann dieser Reparaturmechanismus nur in der S-Phase oder in der nachfolgenden G₂-Phase des Zellzyklus ausgeführt werden; in der G₁-Phase wird die HR inhibiert [401]. Das NHEJ hingegen ist während des gesamten Zellzyklus möglich [401]. Da kein Matrizenstrang verwendet wird, ist das NHEJ jedoch fehlerbehafteter als

die HR und geht in der Regel mit einem limitierten Verlust genetischer Information einher [402]. Die Zellzyklus-abhängige Auswahl des geeigneten Reparaturmechanismus' für einen DNA-Doppelstrangbruch wird durch Cyclin-abhängige Kinasen reguliert [402] (siehe 1.3.4).

1.4.2.1 Homologous Recombination (HR)

Für die *Homologous Recombination* (HR) werden lange Überhänge einzelsträngiger 3'OH-Enden benötigt [403]. Die Prozessierung der Enden des DNA-Doppelstrangbruchs ist daher der entscheidende Schritt für die Einleitung der HR und gleichzeitige Unterdrückung des NHEJ [404]. Die Detektion des Doppelstrangbruchs erfolgt durch den MRN-Komplex (siehe 1.3.1.1). MRE11 besitzt Endo- und Exonukleaseaktivität [85]. Die Endonukleaseaktivität ist für die Prozessierung der 5'-Enden der DNA-Doppelstrangbrüche erforderlich (siehe unten). Als Kofaktor bei der Prozessierung fungiert das Protein CtIP, das mit seiner C-terminalen Domäne an NBS1 bindet und so die Endonukleaseaktivität des MRN-Komplexes stimuliert [405]. CtIP kann durch CDK, ATR und ATM phosphoryliert und so in seiner Aktivität reguliert werden [249, 406]. Das durch ATM phosphorylierte multifunktionale Protein BRCA1 (siehe 1.3.2.4) lagert sich an DNA-Doppelstrangbrüchen mit dem MRN-Komplex zusammen und ist an der Prozessierung der Enden durch direkte Interaktion mit CtIP beteiligt [407]. BRCA1 verdrängt außerdem 53BP1, das die Resektion der Doppelstrangbrüchenden verhindert und somit als Antagonist der HR fungiert [408]. Des Weiteren ist BRCA1 für die Rekrutierung von BRCA2 an die Doppelstrangbrüche mithilfe des Bindungsproteins PALB2 von Bedeutung [409] und vermittelt die Invasion des homologen Chromosoms durch direkte Interaktion mit RAD51 [410] (siehe unten). Somit ist BRCA1 an der Einleitung der HR wesentlich beteiligt.

Nach Rekrutierung an den Doppelstrangbruch und Interaktion mit CtIP nutzt die MRE11-Untereinheit des MRN-Komplexes zunächst ihre Endonukleaseaktivität, um in der Nähe der 5'-Enden des Doppelstrangbruchs eine Inzision zu setzen [411]. Anschließend wird die Exonukleaseaktivität aktiviert, um das entstandene Fragment von der Inzision ausgehend in 3'-5'-Richtung (zum Doppelstrangbruch hin) abzubauen [412]. Danach bauen die Exonukleasen EXO1 oder DNA2 den Strang in 5'-3'-Richtung (vom Doppelstrangbruch weg) ab, sodass ein langstreckig überhängendes, einzelsträngiges 3'OH-Ende am Komplementärstrang entsteht [403, 412]. Das phosphorylierte RPA bindet an den Einzelstrang, wodurch dieser stabilisiert und vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt wird [413]. Außerdem verhindert RPA, dass der Einzelstrang eine Sekundärstruktur ausbildet [119] (siehe auch 1.3.1.2). Im nächsten Schritt wird RPA von der einzelsträngigen DNA verdrängt und durch das Schlüsselprotein der *Homologous Recombination* RAD51 ersetzt [414]. Für die Rekrutierung von RPA und RAD51 an den Einzelstrang ist deren Aktivierung durch CDK1 erforderlich [415]. RAD51 bildet mit der einzelsträngigen DNA ein Nukleoproteinfilament, führt die Suche nach dem homologen

Bereich in der Schwesterchromatide aus und vermittelt die Anlagerung der einzelsträngigen DNA an die Matrize [416].

Für die Verdrängung von RPA, das eine höhere Affinität zur einzelsträngigen DNA hat als nicht-aktiviertes RAD51, ist BRCA2 der entscheidende Mediator [417]. BRCA2 wird durch ATM- bzw. ATR-abhängige Phosphorylierung aktiviert und über das Bindungsprotein PALB2 an BRCA1 gebunden [409] (siehe oben). PALB2 wird in der G₁-Phase des Zellzyklus vermehrt ubiquitiniert, was seine Interaktion mit BRCA1 beeinträchtigt und so die Rekrutierung von BRCA2 verhindert [418]. Nach Rekrutierung von RAD51 an die DNA blockiert BRCA2 die ATP-Hydrolyse-Aktivität von RAD51 und stabilisiert so dessen Bindung an die einzelsträngige DNA [419]. Nachfolgend steuert RAD51 die Suche nach dem homologen DNA-Bereich sowie die Invasion der Schwesterchromatide [420]. Die Suche nach dem homologen Bereich erfolgt durch kurzzeitigen Kontakt des Nukleoproteinfilaments mit DNA-Bereichen in unmittelbarer räumlicher Nähe [421]. Wenn sich an mehr als sieben aufeinanderfolgenden Basen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, bleiben die Bindungen stabil und es wird überprüft, ob auch in der weiteren Umgebung eine Homologie besteht [402, 421]. Durch Verdrängung des Komplementärstrangs entsteht dann ein sogenannter *Displacement Loop* (D-Loop) [400]. Dieser Schritt wird maßgeblich durch BRCA1 und das assoziierte Protein BARD1 stimuliert [410]. RPA bindet an den einzelsträngigen Komplementärstrang, um den D-Loop zu stabilisieren [402]. Nach Invasion der Schwesterchromatide und Bindung des Nukleoproteinfilaments an den homologen Bereich der DNA dissoziiert RAD51 ATP-abhängig mithilfe von RAD54 von dem überhängenden 3'OH-Ende ab [402]. RPA stabilisiert nun die einzelsträngigen, RAD54 die doppelsträngigen Bereiche des D-Loops [400]. Die DNA-Polymerasen δ oder ϵ verlängern das 3'OH-Ende des prozessierten DNA-Strangs anhand der Matrize aus dem Schwesterchromatid mithilfe des Prozessivitätsfaktors PCNA [402, 422]. Abhängig davon, ob nur eins der beiden Bruchenden des Doppelstrangbruchs oder beide an der Neusynthese aus dem Schwesterchromatid teilnehmen, finden unterschiedliche Endstrecken der HR statt [423].

1.4.2.1.1 Break-Induced Replication (BIR)

Bei Vorliegen nur eines Endes des Doppelstrangbruchs, z.B. bei Doppelstrangbrüchen infolge blockierter Replikationsgabeln, wird mittels *Break Induced Replication (BIR)* der gesamte DNA-Strang ab der Läsion in 5'-3'-Richtung neu synthetisiert [424]. Anschließend fungiert der so reparierte DNA-Strang als Matrize für den Komplementärstrang [424].

1.4.2.1.2 Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA)

Alternativ können sich das im D-Loop verlängerte 3'OH-Ende und das andere überhängende 3'OH-Ende des Doppelstrangbruchs, das bislang nicht verlängert wurde, mittels Basenpaarung aneinanderlagern [423]. Dieser Pfad der *Homologous Recombination* wird *Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA)* genannt [423]. Noch fehlende DNA-

Bereiche werden nun anhand des Komplementärstrangs synthetisiert und anschließend ligiert [400].

1.4.2.1.3 Double Holliday Junction (dHJ)

Wenn das zweite überhängende 3'OH-Ende des DNA-Doppelstrangbruchs ebenfalls die Schwesterchromatide als Matrize verwendet, können beide Enden gleichzeitig verlängert werden [423]. Es bilden sich zwei *Holliday Junctions* aus (*double Holliday Junction, dHJ*) [425]. Eine Holliday Junction ist eine kreuzförmige DNA-Struktur, die sich bei der HR ausbildet, wenn die vier Einzelstränge von zwei homologen Chromosomen jeweils sowohl mit dem gegenläufigen Einzelstrang des eigenen Chromosoms als auch mit dem homologen Einzelstrangbereich des anderen Chromosoms interagieren [425]. Je nachdem, wie sich die überkreuzten DNA-Stränge wieder voneinander trennen, kann es zu einem DNA-Austausch (Crossover) zwischen den Schwesterchromatiden kommen [423]. Anschließend werden die neusynthetisierten Einzelstrangenden durch die DNA-Ligase I verbunden [426].

1.4.2.1 a) Bedeutung von BRCA1 und BRCA2 für Cisplatinresistenz

BRCA1 und BRCA2 sind an der *Homologous Recombination* und der Reparatur von Interstrang-Crosslinks (siehe 1.4.3) wesentlich beteiligt. In Mamma- und Ovarialkarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression von BRCA1 in Cisplatin-resistenten Varianten dieser Zelllinien erhöht ist [427] bzw. dass Hochregulierung von BRCA1 *in vitro* und *in vivo* mit Cisplatinresistenz einhergeht [428]. In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zeigen retrospektive Analysen, dass niedrige BRCA1-Expression mit gutem Ansprechen auf Cisplatin-basierte Chemotherapie einhergeht, während hohe BRCA1-Expression mit Cisplatinresistenz assoziiert ist [429]. Auch in Blasenkarzinomen deuten retrospektive Daten darauf hin, dass niedrige BRCA1-Expression mit einem besseren Ansprechen auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie und längerem Gesamtüberleben assoziiert ist [430]. In Mammakarzinom- bzw. Ovarialkarzinom-Zellen kann durch RNA-Interferenz die Expression von BRCA1 herunterreguliert und so die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöht werden [431, 432]. In NSCLC-Zellen kann RNA-Interferenz mit BRCA1- und BRCA2-mRNA *in vitro* erworbene Cisplatinresistenz überwinden [433].

Keimbahnmutationen im BRCA1-oder BRCA2-Gen verstärken das Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinome erheblich und werden autosomal-dominant vererbt [434]. BRCA-Mutationen führen zum Verlust der *Homologous Recombination*, die den akkuratesten Reparaturmechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche darstellt, und begünstigen so genomische Instabilität und Krebsentstehung [435]. BRCA-Mutationen bedingen zunächst eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin, da die Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche und Interstrang-Crosslinks erheblich beeinträchtigt ist [436]. Sekundärmutationen im BRCA1- oder BRCA2-Gen können jedoch dazu führen, dass das verschobene Leseraster korrigiert wird, sodass das Gen wieder korrekt abgelesen werden

kann und die Funktion des Proteins weitgehend wieder hergestellt wird [437, 438]. Dadurch kommt es zur erworbenen Cisplatinresistenz der Tumorzellen [438, 439]. Auch alternatives Spleißen kann zur teilweisen Wiederherstellung der Funktion von BRCA1 und somit Cisplatinresistenz führen, was einen Ansatzpunkt für Spleißosom-Inhibitoren in BRCA1-mutierten Tumoren impliziert [440].

Über die Bedeutung von BRCA1- oder BRCA2-Mutationen in Urothelkarzinomen ist wenig bekannt. BRCA1- und BRCA2-Mutationsträger haben ein deutlich erhöhtes Risiko Blasenkrebs zu entwickeln [441]. Ein nachgewiesener BRCA-Mutationsstatus geht bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen wie in anderen Tumorentitäten mit einem besseren Gesamtüberleben einher [441]. Dies wird teilweise auf ausgeprägtere Chemosensitivität gegenüber Cisplatin zurückgeführt (siehe auch [430]). In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression von BRCA1 und BRCA2 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der jeweiligen mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen.

1.4.2.1 b) Funktion von XRCC3 und dessen Bedeutung für Cisplatinresistenz

Die Funktion von RAD51, dem Schlüsselprotein der *Homologous Recombination*, wird von RAD51-Paralogen mitbeeinflusst [442]. Diese weisen ca. 20-30% homologe Gensequenzen mit RAD51 auf [402]. Die Gruppe umfasst sechs Proteine - RAD51B, RAD51C, RAD51D, SWSAP1, XRCC2 und XRCC3 [442]. Ihre genaue Funktion ist weitgehend unklar, sie sind jedoch an der Stabilisierung des Nukleoproteinfilaments beteiligt und erleichtern so die Suche nach homologen DNA-Bereichen [442]. Außerdem wird ihnen eine Rolle bei der Protektion des entstehenden DNA-Strangs blockierter Replikationsgabeln zugeschrieben [443]. XRCC3 ist an der Verzögerung des Fortschreitens von Replikationsgabeln in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden wesentlich beteiligt [444]. Der Komplex aus RAD51C und XRCC3 - genannt CX3 - ist zudem essentiell für die Wiederaufnahme der Replikation nach erfolgter DNA-Reparatur mittels *Homologous Recombination*; er löst RAD51 ATP-abhängig von der blockierten Replikationsgabel ab [443].

Zellen mit Mutationen im XRCC3-Gen sind deutlich sensitiver gegenüber Cisplatin als XRCC3 Wild Typ-Zellen [445, 446]. Versuche mit XRCC3-Wild Typ- und XRCC3-mutierten Zellen *in vitro* implizieren, dass XRCC3 an der Adaptation von Zellen an eine Cisplatin-Behandlung beteiligt ist und erworbene Cisplatinresistenz vermitteln kann [445]. In Mammakarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass XRCC3-Überexpression zu Cisplatinresistenz führt [447]. Ein synthetisches Peptid mit einer ähnlichen Aminosäuresequenz wie an der Stelle von RAD51C, die mit XRCC3 interagiert, konnte in XRCC3-Wild Typ-Zellen durch Blockade der Interaktion von XRCC3 mit RAD51C die Cisplatinresistenz deutlich erhöhen [448].

Für Harnblasenkarzinome haben Metaanalysen ergeben, dass ein Polymorphismus im XRCC3-Gen mit einem erhöhten Risiko für Blasenkarzinome einhergeht [449, 450]. Die Bedeutung von XRCC3 für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomen ist jedoch noch

unklar. Die mRNA-Expression von XRCC3 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen wird in der hier vorliegenden Arbeit mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen.

1.4.2.2 Non-Homologous End Joining (NHEJ)

Im Gegensatz zur HR sind für das NHEJ keine längeren komplementären Basenabschnitte erforderlich und die Enden des Doppelstrangbruchs werden nur minimal prozessiert [451]. Die Einleitung des NHEJ erfolgt durch Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers an den DNA-Doppelstrangbruch [452]. Dieses rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs, siehe 1.3.1.3). Wenn die Enden des Doppelstrangbruchs nicht direkt ligiert werden können, was z.B. durch überhängende Einzelstränge oder den Enden anhängende chemische Gruppen bedingt sein kann, ist eine vorherige Prozessierung erforderlich [451]. Diese wird im Wesentlichen durch die Endonuklease Artemis ausgeführt, die durch die DNA-PKcs aktiviert wird [453]. Artemis hat, wenn sie an die DNA-PKcs bindet, sowohl an den 3'-Enden als auch den 5' Enden des Doppelstrangbruchs Endonukleaseaktivität [451]. Alternativ können durch die DNA-Polymerasen μ und λ zusätzliche Nukleotide an Einzelstränge angehängt werden, um die Enden ligierbar zu machen [454]. Die Polynukleotidkinase (PNK) kann, falls erforderlich, vor der Ligatur Hydroxyl- oder Phosphatgruppen entfernen [455]. Die Hauptakteure des NHEJ - XRCC4, XLF und DNA-Ligase IV - werden rekrutiert, Ku vermittelt dabei deren Bindung an den Doppelstrangbruch [456]. XRCC4 bildet Dimere auf beiden Seiten des DNA-Doppelstrangbruchs und formiert sich mit XLF zu einem stabilen Komplex, der den Doppelstrangbruch überbrückt [457]. Daneben ist auch PAXX, ein Paralog von XRCC4 und XLF, an der Bildung des Komplexes beteiligt [458]. Nach Bindung der DNA-Ligase IV wird diese durch den Komplex stimuliert und verknüpft die Strangenden durch eine Phosphodiesterbindung [459]. Beim NHEJ geht somit im Gegensatz zur HR häufig genetische Information verloren; es kann zu fehlerhafter Reparatur kommen, was ein höheres mutagenes Potential mit sich bringt.

Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ)

Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ) ist eine alternative Form des NHEJ [460]. Dieser Reparaturmechanismus basiert auf dem Vorliegen von Mikrohomologien auf einer Länge von 3-20 Basenpaaren zwischen den beiden überhängenden einzelsträngigen 3'-Enden eines DNA-Doppelstrangbruchs [461]. Daher ist wie bei der HR eine Prozessierung der 5'-Enden durch den MRN-Komplex mit CtIP als Kofaktor erforderlich [461]. Für die Rekrutierung von RAD51 und die nachfolgende HR ist jedoch eine ausgedehntere Prozessierung notwendig als für das MMEJ [462]. Die mikrohomologen DNA-Bereiche der beiden 3'-Enden lagern sich aneinander - der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang weitgehend ungeklärt [462]. Der Komplex aus ERCC1 und ERCC4/XPF (siehe 1.4.1.1) entfernt nicht-homologe Bereiche jenseits des 3'-Endes der Mikrohomologie [460]. Die DNA-Polymerase θ , die eine geringe Replikationsgenauigkeit aufweist als konventionelle DNA-Polymerasen, synthetisiert die fehlenden DNA-Bereiche [463].

Anschließend werden die Enden durch die DNA-Ligase III verbunden [464]. MMEJ geht immer mit Deletionen einher, die in der Regel ausgeprägter sind als beim konventionellen NHEJ; der Mechanismus ist daher mutagen und begünstigt genomische Instabilität [461]. Es wird angenommen, dass MMEJ vor allem in Zellen von Bedeutung ist, die Defekte der HR oder des konventionellen NHEJ aufweisen [460, 465]. Gleichwohl erfüllt MMEJ auch bislang unzureichend charakterisierte Funktionen in Zellen mit vollständig intakter DNA-Reparatur [461, 466].

1.4.3 Reparatur von DNA-Interstrang-Crosslinks: Der Fanconi-Anämie-Signalweg

Der Fanconi-Anämie-Signalweg (FA-Signalweg) ist ein Signalweg zur Reparatur von Interstrang-Crosslinks; dabei werden Mechanismen der Nukleotid-Exzisionsreparatur, der *Homologous Recombination* und der Translasionssynthese kombiniert [127]. Angeborene Defekte in diesem Signalweg führen zur hereditären Fanconi-Anämie, die mit Knochenmarksdepression und stark erhöhtem Risiko für Leukämien und solide Tumoren einhergeht [467]. Die involvierten Gene bzw. deren Produkte werden mit lateinischen Buchstaben nummeriert (*Fanconi Anaemia Complementation Group A-T*, FANC A-T) [127]. Wie sich inzwischen gezeigt hat, ist FANCD1 identisch mit BRCA2, FANCS mit BRCA1, FANCN mit PALB2, FANCR mit RAD51 und FANCO mit ERCC4/XPF [127], was die Beteiligung verschiedener konventioneller DNA-Reparaturmechanismen am Fanconi-Anämie-Signalweg verdeutlicht.

Interstrang-Crosslinks führen während der Replikation zur Blockade von Replikationsgabeln, da die beiden komplementären DNA-Stränge nicht getrennt werden können [127]. Der Fanconi-Anämie-Signalweg findet somit vorwiegend in der S-Phase des Zellzyklus statt [127]. Für die Einleitung des Fanconi-Anämie-Signalwegs ist das Aufeinandertreffen gegenläufiger Replikationsgabeln am Interstrang-Crosslink erforderlich [468]. Der Replikationsstopp erfolgt aus sterischen Gründen schon, wenn die Replikationsgabel noch 20-40 Basenpaare vom Interstrang-Crosslink entfernt ist, da die vorangehende Helikase ein weiteres Fortschreiten der Replikationsgabel verhindert [469]. BRCA1 und BARD vermitteln die Entfernung der Helikase, sodass eine Replikationsgabel den Interstrang-Crosslink erreichen kann [469]. Die blockierte Replikationsgabel wird durch RPA erkannt; konsekutiv wird ATR rekrutiert (siehe 1.3.1.2). ATR phosphoryliert zahlreiche FANC-Proteine, u. a. FANCM, das nach seiner Rekrutierung und Aktivierung als Plattform für die Bindung weiterer FA-Proteine an den Interstrang-Crosslink fungiert [470]. In der Folge werden zahlreiche weitere FANC-Proteine rekrutiert, die den Kernkomplex des Fanconi-Anämie-Signalwegs bilden [471]. An der Phosphorylierung und Aktivierung von FANC-Proteinen sind neben ATR auch CHK1 und ATM beteiligt [471, 472].

Der Kernkomplex fungiert als Ubiquitinligase, mit FANCL als E3-Ligase [473]. Die Schlüsselfaktoren des FA-Signalwegs FANCD2 und FANCI werden durch den Kernkomplex monoubiquitiniert, was zu deren Aktivierung führt [474, 475].

Ubiquitiniertes FANCD2 und FANCI bilden einen Komplex, der die nachfolgenden Inzisionen an der Replikationsgabel koordiniert [476]. Phosphorylierung von FANCI durch ATR trägt entscheidend zur Stabilisierung des Komplexes und somit zur Aktivierung der nachfolgenden Reparaturschritte bei [477]. Das Protein SLX4/FANCP erkennt das ubiquitinierte FANCD2 und bildet ein Gerüst für die nun rekrutierten Endonuklease-Komplexe; dies sind unter anderem Heterodimere bestehend aus ERCC1 und ERCC4/XPF bzw. MUS81 und EME1 [127]. MUS81-EME1 setzt die Inzision am 3'-Ende des Interstrang-Crosslinks; ERCC1-ERCC4/XPF fungiert wie bei der NER (siehe 1.4.1.1) als Endonuklease mit ERCC1 als regulatorischer und ERCC4/XPF als katalytischer Untereinheit und schneidet am 5'-Ende der Läsion [344]. So wird einer der beiden Stränge vom Interstrang-Crosslink befreit [478]. Dabei entsteht ein Doppelstrangbruch am befreiten Strang [344].

Der Komplementärstrang, an dem nun das Monoaddukt hängt, wird durch die DNA-Polymerasen ζ und Rev1 mittels Transläsionssynthese repariert [479]. Die Polymerasen werden mithilfe des FA-Kernkomplexes an die Läsion rekrutiert [479]. Der mittels Transläsionssynthese reparierte Strang fungiert anschließend als Matrize für die Reparatur des Doppelstrangbruchs mittels *Homologous Recombination* [480]. Nach Abschluss der Reparatur wird der FANCD2/FANCI-Komplex wieder desubiquitiniert und so inaktiviert [477]. Aufgrund der Transläsionssynthese am Matrizenstrang ist der Fanconi-Anämie-Signalweg fehleranfällig und somit potentiell mutagen [479].

1.4.4 Rolle der Poly-ADP-Ribosylierung für die DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur

Einer der frühesten Schritte der DNA-Schadensantwort ist die Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase PARP1 [481]. PARP1 katalysiert die posttranslationale Modifikation von Proteinen mittels Polymerisierung von ADP-Ribose-Einheiten an Glutamat-, Aspartat- oder Lysinresten; dabei nutzt sie NAD⁺ als ADP-Donor [481]. PARP1 ist auf verschiedenen Ebenen an der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden beteiligt [482, 483]. Durch Histonmodifikationen bewirkt PARP1 eine Chromatindekondensation [484]. Die Histonmodifikationen werden teilweise durch PARP1 selbst ausgeführt, PARP1 ist jedoch auch wesentlich an der Rekrutierung und Aktivierung zahlreicher Chromatin-remodellierender Faktoren beteiligt [485]. Durch die Chromatin-Remodellierung wird die DNA für Proteine der frühen DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur zugänglich gemacht [481]. Außerdem interagieren diese Proteine durch nicht-kovalente Bindungen mit Poly-ADP-Riboseresten und werden so an den DNA-Schaden rekrutiert [486]. PARP1 erleichtert auf diese Weise die Rekrutierung von ATM und des MRN-Komplexes an DNA-Doppelstrangbrüche und die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX [487, 488]. Bei der NER (siehe 1.4.1.1) ist PARP1 an der Rekrutierung von XPC und XPA beteiligt [489]. Zur *Homologous Recombination* (siehe 1.4.2.1) trägt PARP1 durch die rasche Rekrutierung von BRCA1 bei [490]. Beim NHEJ (siehe 1.4.2.2) stimuliert die Poly-ADP-Ribosylierung der DNA-PKcs

deren Aktivität [491]; außerdem ist PARP1 an der Rekrutierung von XRCC4 beteiligt [492]. MMEJ (siehe 1.4.2.2) wird durch PARP1 gefördert, indem PARP1 mit dem Ku-Heterodimer um die Bindungsstellen an den Enden der DNA-Doppelstrangbrüche konkurriert und die DNA-Polymerase θ rekrutiert [481]. Auch an der Stabilisierung von Replikationsgabeln bei Replikationsstress infolge von DNA-Läsionen, der nachfolgenden Verlangsamung der Replikation und deren Wiederaufnahme nach Reparatur der DNA-Läsionen ist PARP1 entscheidend beteiligt [493].

Bemerkenswerterweise sind PARP1-Inhibitoren in Tumorzellen mit BRCA1- oder BRCA2-Defizienz synthetisch letal [494, 495]. Dies wird bislang am ehesten auf die erschwerte Reparatur von Einzelstrangbrüchen und -läsionen wegen des Funktionsverlusts von PARP1 und vermehrten Kollaps von Replikationsgabeln im Bereich von DNA-Schäden zurückgeführt; es werden jedoch zahlreiche weitere Modelle zur Erklärung der synthetischen Letalität diskutiert [496, 497]. Die unreparierten DNA-Läsionen führen während der S-Phase zur Blockade von Replikationsgabeln und zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die aufgrund der BRCA-Defizienz nicht durch *Homologous Recombination* behoben werden können [495]. Die DNA-Schäden können durch vermehrtes NHEJ nur unzureichend und fehlerbehaftet repariert werden, was letztendlich zur Einleitung der Apoptose führt [495]. Durch PARP1-Inhibitoren wie z. B. Olaparib, das seit 2014 in klinischem Gebrauch ist, können daher Tumorzellen mit Verlust beider BRCA1- bzw. BRCA2-Allele zielgerichtet zerstört werden [498]. Normalgewebe, die noch ein Wild-Typ-BRCA1- bzw. BRCA2-Allel aufweisen, werden von den PARP-Inhibitoren hingegen kaum beeinträchtigt [499]. Inzwischen sind vier verschiedene PARP-Inhibitoren zugelassen; sie werden in der Therapie von fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, HER2-negativen Mammakarzinomen mit BRCA-Keimbahnmutation, metastasierten Pankreas- und kastrationsresistenten Prostatakarzinomen mit Defizienz der *Homologous Recombination* eingesetzt [497]. PARP-Inhibitoren zeigen in klinischen Studien synergistische Effekte mit Platin-basierten Chemotherapien und bieten sich somit auch für eine Kombinationstherapie an [497, 500].

1.5 Die Apoptose und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz

1.5.1 Ablauf der Apoptose

Irreparable DNA-Schäden führen zur Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose [85]. Durch die Apoptose können Zellen aus einem Gewebe entfernt werden, ohne dass ihr Inhalt ins Interstitium gelangt und die umliegenden Zellen schädigt [501]. Die Einleitung und Ausführung der Apoptose wird durch darauf spezialisierte Cysteinproteasen, die Caspasen, koordiniert [502]. Caspasen liegen in vitalen Zellen als inaktive Proenzyme vor und werden durch Spaltung in ihre aktive Form überführt [91]. Dabei bilden das große und das kleinere Spaltprodukt mit den beiden Spaltprodukten einer weiteren Procaspase ein Heterotetramer – die aktive Caspase [91]. Diese kann wiederum andere Procaspasen spalten und so aktivieren, wodurch eine Caspase-Kaskade

ausgelöst wird; dadurch wird ein schneller und effektiver programmierter Zelltod gewährleistet [501]. Die Apoptose einer Zelle kann sowohl durch Interaktion mit einer Immunzelle von extern eingeleitet werden (extrinsischer Signalweg) als auch infolge irreparabler Schäden oder fehlender Wachstumsstimuli durch die Zelle selbst (intrinsischer Signalweg) [501]. Beide Signalwege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, die durch die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 ausgeführt wird [502]. P53, das in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden aktiviert wird, induziert sowohl Gene, die für Proteine des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalwegs kodieren [503] (siehe 1.3.3.1).

1.5.1.1 Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol eingeleitet [504]. Die Undurchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran für Cytochrom c wird in vitalen Zellen durch antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie gewährleistet [504]. Die Bcl-2-Familie umfasst strukturell verwandte, sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirksame Proteine, deren Gleichgewicht und Interaktionen entscheidend sind für die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran [505]. Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (u. a. Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1) verhindern unter physiologischen Bedingungen, dass sich proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie in der äußeren Mitochondrienmembran zusammenlagern und - ggf. unter Beteiligung weiterer Proteine, z.B. Membrantransportern wie VDAC (siehe 1.5.2 d) - Poren bilden [506]. Zu den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie gehören sowohl porenbildende Proteine wie Bax und Bak als auch deren direkte Aktivatoren, z.B. Bid und Puma, sowie Inhibitoren antiapoptotischer Proteine, z. B. Bad und Noxa [507]. Einige proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie wie Bax, Noxa und Puma werden p53-abhängig transkribiert (siehe 1.3.3.1) [503]. Über die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran entscheidet jedoch nicht nur das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen, sondern auch deren Affinität zueinander, die wiederum durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst wird [508]. Außerdem kommen Proteine der Bcl-2-Familie in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten vor, sodass auch deren Lokalisation innerhalb der Zelle bzw. deren Transfer in die äußere Mitochondrienmembran die Permeabilität beeinflussen [507].

Werden die porenbildenden Proteine aktiviert, oligomerisieren sie und machen die Membran permeabel für Proteine des mitochondrialen Intermembranraums wie Cytochrom c, Smac/DIABLO und HtrA2/Omi [506]. Im Zytosol lagert sich Cytochrom c an Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) an [504]. Es kommt zu einer Konformationsänderung von Apaf-1, sodass Apaf-1 dATP binden und dadurch oligomerisieren kann [509]. Die auf diese Weise gebildeten Apaf-1-Heptamere bilden das so genannte Apoptosom, in dessen Mitte die Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARDs) nun zugänglich sind und Procaspase 9 binden können [501]. Die Procaspase 9-Moleküle

werden dadurch im Apoptosom konzentriert und können leichter dimerisieren [510]. Durch Dimerisierung und autokatalytische Spaltung wird in der Folge die Caspase 9 aktiviert [510]. Diese überführt dann die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (siehe 1.5.1.3) durch Proteolyse in ihre aktive Form [91]. Neben Cytochrom c werden auch Smac/DIABLO und HtrA2/Omi durch erhöhte Permeabilität der äußeren Membran aus den Mitochondrien freigesetzt (siehe oben). Smac/DIABLO und HtrA2/Omi inaktivieren IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) [511, 512]. Die IAP-Familie ist eine Gruppe strukturell verwandter Proteine, die durch Inaktivierung von Caspasen antiapoptotische Funktion haben [513]. Ihr wichtigster Vertreter, XIAP (*X-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), inhibiert durch direkte Bindung die Effektorcaspasen 3 und 7 und verhindert die Dimerisierung der Procaspase 9 [514, 515]. Neben der Apoptose inhibiert XIAP auch eine TNF-vermittelte Form des programmierten inflammatorischen Zelltods und ist an einem proinflammatorischen Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B beteiligt [515]. Sogenannte *Smac-Mimetics*, die durch strukturelle Ähnlichkeit mit Smac/DIABLO an der IAP-Bindungsdomäne IAPs inaktivieren können, um Apoptose zu induzieren und die Sensitivität von Tumoren gegenüber Zytostatika zu erhöhen, werden in klinischen Studien als Tumorthapeutika erprobt [516].

Einleitung des intrinsischen Signalwegs über das endoplasmatische Retikulum

Darüber hinaus kann der intrinsische Signalweg der Apoptose auch über das endoplasmatische Retikulum (ER) eingeleitet werden [517]. Reaktive Sauerstoffspezies, Hypoxie, Mangel an Calcium im ER oder ATP-Mangel führen zur Akkumulation ungefalteter Proteine und verursachen dort ER-Stress [518]. Cisplatin ist auch in enukleierten Zellen zytotoxisch durch Einleitung der Apoptose; dies wird unter anderem auf Cisplatin-induzierten ER-Stress zurückgeführt [519]. Transmembranäre Rezeptoren nehmen die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen wahr und führen auf der zytoplasmatischen Seite zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die nach Translokation in den Nukleus die Genexpression so beeinflussen, dass das Gleichgewicht im ER wieder hergestellt wird [520]. Prolongierter bzw. nicht auflösbarer ER-Stress führt jedoch zur Einleitung der Apoptose [521]. Wesentliche zugrunde liegende Mechanismen sind dabei eine transkriptionelle Herunterregulierung von Bcl-2 und die Induktion proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie durch den Transkriptionsfaktor CHOP, sowie die andauernde Aktivierung des JNK-Signalwegs (siehe 1.3.5.1) durch Phosphorylierungskaskaden an der zytoplasmatischen Seite der Transmembranrezeptoren [517].

Außerdem ist das ER der hauptsächliche intrazelluläre Speicher von Calciumionen, die bei der Einleitung der Apoptose über das ER als Signalmoleküle fungieren können [522]. Ins Zytoplasma freigesetzte Calciumionen aktivieren Calcium-abhängige Cysteinproteasen, die Calpaine (siehe 1.5.2 e). Auf der zytosolischen Seite des ER ist die Procaspase 12 lokalisiert, die durch Calpain proteolytisch aktiviert wird [523]. Caspase 12 kann dann direkt die Procaspase 9 spalten, die wiederum die Effektorcaspase 3 aktiviert

[524]. Darüber hinaus begünstigen Calcine durch Spaltung zahlreicher weiterer Substrate die Einleitung der Apoptose (siehe 1.5.2 e) und agieren synergistisch mit Caspasen [525]. Calcium kann vom ER aus zunächst ins Zytoplasma freigesetzt werden und von dort in die Mitochondrien aufgenommen werden; es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Calcium direkt aus dem ER in die Mitochondrien überführt wird [526]. Dies geschieht in speziellen Kontaktbereichen zwischen dem ER und Mitochondrien, den sogenannten *Mitochondria-associated Membranes* (MAMs) [527]. Im Bereich der MAMs kolokalisiert der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (IP₃-Rezeptor), der die Freisetzung von Calcium aus dem ER sowohl ins Zytosol als auch direkt ins Mitochondrium vermittelt, mit dem *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) (siehe 1.5.2 d), der die Aufnahme von Calcium ins Mitochondrium ausführt [527]. Der VDAC und der IP₃-Rezeptor werden im Bereich der MAMs über Adaptermoleküle aneinander gebunden [526]. Ein geringer Calciumtransfer über die MAMs ist physiologisch und wird von den Mitochondrien zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionen benötigt [527]. Calciumüberladung der Mitochondrien führt hingegen zur Einleitung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose durch Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und einer weiten Öffnung der Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (MPTP) [526]. Die MPTP ist ein strukturell bisher wenig charakterisierter Multiproteinkomplex, der entscheidend für die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran ist [528] und unter physiologischen Bedingungen intermittierend durchlässig für kleine Ionen wie Kalium oder Calcium ist [529]. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei mitochondrialer Calciumüberladung oder Akkumulation von ROS, ändert sich die Konformation der MPTP; sie wird durchlässig für Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 1500 Dalton [530]. Dies führt zu einem osmotisch bedingten Wassereinstrom in die mitochondriale Matrix, da die Proteine im Mitochondrium zurück gehalten werden [529]. Es kommt dadurch zur Schwellung der Mitochondrien und letztlich zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran [530]. In der Folge gelangen Cytochrom c, Smac/DIABLO und Htr2/Omi ins Zytosol und der intrinsische Signalweg der Apoptose wird eingeleitet [526]. Auch bei der Cisplatin-induzierten Apoptose ist der Calcium-Transfer aus dem ER in die Mitochondrien über die MAMs von Bedeutung [531]. Bcl-2 bindet sowohl an den IP₃-Rezeptor und verhindert dessen Öffnung [532] als auch an VDAC und führt zu einem partiellen Verschluss des VDAC [533]. Somit entfaltet Bcl-2 seine antiapoptotische Wirkung sowohl in den Mitochondrien durch Interaktion mit Bax und Bak, als auch im endoplasmatischen Retikulum und an den MAMs [534]. Die IP₃-Rezeptoren sind Ziel zahlreicher zellulärer Signalwege [535]; sie werden unter anderem durch Akt/PKB (1.6.3 a) phosphoryliert, wodurch der Transfer von Calcium aus dem ER in die Mitochondrien und somit die Einleitung der Apoptose verhindert wird [536]. Die genauen Mechanismen, durch die die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöht wird, um proapoptotische Proteine aus dem Intermembranraum freizusetzen, sind nicht abschließend geklärt – ebenso wenig wie die Morphologie der MPTP [537] (siehe oben). Ob Bax und Bak unabhängig von der MPTP agieren oder in Kooperation mit

Proteinen der MPTP die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöhen, ist ebenfalls unklar [538].

1.5.1.2 Der extrinsische Signalweg

Auch der extrinsische Signalweg der Apoptose ist von Bedeutung für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden. Dieser Signalweg wird durch transmembranäre Rezeptoren vermittelt, die zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehören [539]. Binden entsprechende Liganden an die Rezeptoren auf der Oberfläche einer Zelle, oligomerisieren die Rezeptoren und ändern so ihre Konformation, sodass sie an ihrer zytosolischen Domäne, der sogenannten Todesdomäne, Adaptermoleküle binden können [540]. Die oligomerisierten Adaptermoleküle bilden den *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) [541]. An die Adaptermoleküle binden Procaspase 8-Moleküle, die dadurch in räumliche Nähe zueinander gelangen [539]. Es kommt zur Dimerisierung und autokatalytischen Spaltung der Procaspase 8, die so in ihre aktive Form überführt wird [540]. Ein Beispiel für den extrinsischen Signalweg ist die Einleitung der Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche den Fas-Liganden exprimieren [91]. Bindung des Fas-Liganden an Fas, einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle, führt zur Trimerisierung der Fas-Moleküle und zur Bindung des Adapterproteins FADD an die zytosolische Domäne der Fas-Moleküle [541]. Durch Aktivierung der Caspase 8 wird die Apoptose eingeleitet. Cisplatin-induzierte DNA-Schäden induzieren die Expression von Fas durch p53-vermittelte Transkription [542] (siehe 1.3.3.1). Ein weiteres Beispiel für den extrinsischen Signalweg ist die selektive Einleitung der Apoptose in Tumorzellen durch spezialisierte Immunzellen, die *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) exprimieren [543]. Die Bindung von TRAIL an einen membranständigen Rezeptor führt ebenfalls zur Oligomerisierung und Bildung eines DISC sowie zur konsekutiven Aktivierung der Caspase 8 [544].

Caspase 8 fungiert als Initiatorcaspase des extrinsischen Signalwegs und aktiviert in der Folge die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 [540]. Außerdem spaltet Caspase 8 das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid, dessen Spaltprodukt durch Bindung an Bcl-xL und Mcl-1 oder direkte Aktivierung von Bax und Bak zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran führt und somit den intrinsischen Signalweg der Apoptose einleitet [545, 546]. In Zellen mit hohem Gehalt an XIAP ist die zusätzliche Aktivierung dieses Signalwegs obligat für die Einleitung der Apoptose, da die Effektorcaspasen nur dann ausreichend aktiv sind, wenn XIAP durch Smac/DIABLO inaktiviert wird [547].

1.5.1.3 Die gemeinsame Endstrecke der Apoptose

Die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 spalten zelluläre Proteine, u.a. Proteine des Zytoskeletts, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren [91]. Auch Proteine der DNA-Schadensantwort, z.B. PARP, das Retinoblastom-Protein, p53 und Mdm2 werden gespalten [540]. Durch Verlust der proteinvermittelten zellulären Funktionen ist die Zelle nicht mehr überlebensfähig. Außerdem spaltet die Caspase 3 das Protein ICAD [548].

ICAD bindet in vitalen Zellen an die *Caspase-aktivierte DNase* (CAD) und verhindert dadurch deren Aktivierung [548]. Nach Spaltung von ICAD wird CAD freigesetzt und kann somit zusammen mit anderen Endonukleasen die DNA fragmentieren [91]. Neben Cytochrom c, Smac/DIABLO und HtrA2/Omi werden zahlreiche weitere Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, u.a. *Apoptosis-Inducing Factor* (AIF) und die Endonuklease G [502]. AIF und die Endonuklease G translozieren in den Nukleus [549]. Die Endonuklease G ist dort selbst am DNA-Abbau beteiligt, während AIF die Rekrutierung und Aktivität weiterer Endonukleasen koordiniert [549]. Durch Spaltung von nukleären Laminen kondensiert das Chromatin und der Zellkern schrumpft. Außerdem spalten die Caspasen auch Proteine des Zytoskeletts, wie z.B. Aktin, Plektin und Gelsolin [550]. Dadurch ändert die Zelle ihre Form und bildet Blasen; schließlich wird sie fragmentiert und in apoptotische Körper aufgeteilt [550]. Durch einhergehende Veränderungen in der Zellmembran werden Phosphatidylserinreste, die sich in vitalen Zellen an der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran befinden, an die Außenseite befördert [502]. Diese werden von phagozytierenden Zellen erkannt, sodass die apoptotische Zelle aus dem Gewebe entfernt wird, ohne dass die umgebenden Zellen Schaden nehmen [551].

1.5.2 Cisplatinresistenz-vermittelnde Proteine mit Bezug zur Apoptose

Bei Fehlregulation der Apoptose können Zellen mit Cisplatin-induzierten DNA-Schäden keinen programmierten Zelltod eingehen. Somit wird Cisplatinresistenz einerseits begünstigt durch eine Überexpression antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2 und Survivin, andererseits durch eine verminderte Expression proapoptotischer Proteine wie p53, VDAC, XAF1, Caspasen und Calpain. Die Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten Komponenten der Apoptose für Cisplatinresistenz wird im Folgenden beleuchtet.

1.5.2 a) Bcl-2

Bcl-2 wurde zunächst in folliculären Lymphomen entdeckt, in denen es aufgrund der Translokation t(14;18) überexprimiert ist und als Protoonkogen fungiert [552]. Seine antiapoptotischen Funktionen wurden erst später entdeckt [552]. Die Expression von Bcl-2 wird durch p53 herunterreguliert [553]. In zahlreichen Tumorentitäten begünstigt Bcl-2 Chemoresistenz gegenüber Cisplatin [554]. In HNSCC-Zellen [555], Ovarialkarzinom- [556] und Neuroblastomzellen [557] konnte *in vitro* gezeigt werden, dass hohe Expression von Bcl-2 mit Cisplatinresistenz einhergeht. Ovarialkarzinom-Patientinnen mit hoher Bcl-2-Expression vor Start der Chemotherapie sprechen deutlich schlechter auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie an, als Patientinnen mit niedriger Bcl-2-Expression [558]. Eine Korrelation zwischen hoher Bcl-2-Expression vor Therapiebeginn und Cisplatinresistenz konnte auch bei Patienten mit HNSCC [559] und NSCLC [560] klinisch gezeigt werden. *Small molecule*-Inhibitoren von Bcl-2 können in NSCLC-Zellen [561], Ovarialkarzinomzellen [562, 563], Mammakarzinomzellen [564], Endometriumkarzinomzellen [565], Prostatakarzinomzellen [566] und cholangiozellulären Karzinomzellen [567] *in vitro*

die Sensitivität gegenüber Cisplatin erhöhen. Inhibition von Bcl-2 auf mRNA-Ebene resensitiviert Cisplatin-resistente NSCLC-Zellen [568, 569], Mammakarzinomzellen [570], Magenkarzinomzellen [571, 572], Nierenkarzinomzellen [573] und Nasopharynxkarzinomzellen [574] *in vitro* gegenüber Cisplatin.

In Blasenkarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass durch Gentransfektion erzeugte Überexpression von Bcl-2 Cisplatinresistenz bedingt [575, 576] und dass Urothelkarzinomzellen mit erworbener Cisplatinresistenz eine erhöhte Bcl-2-Expression aufweisen [577]. Antisense-Oligonukleotide können Urothelkarzinom-Zelllinien *in vitro* durch Herunterregulierung der Bcl-2-Expression gegenüber Cisplatin und anderen Chemotherapeutika sensitivieren [578]. Klinische Studien bezüglich der Frage, ob die Bcl-2-Expression von Urothelkarzinomen ein geeigneter Parameter ist, um das Ansprechen auf eine Cisplatin-basierte neoadjuvante Chemotherapie vorherzusagen, kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen [579, 580].

Bcl-2-Inhibitoren sind als Tumorthapeutika in klinischem Gebrauch. Venetoclax ist ein oral bioverfügbarer Bcl-2-Antagonist, der in der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie als Monotherapie oder in Kombination mit den Anti-CD20-Antikörpern Rituximab oder Obinutuzumab sowie bei der akuten myeloischen Leukämie in Kombination mit hypomethylierenden Substanzen oder niedrig dosiertem Cytarabin eingesetzt wird [581]. In soliden Tumoren ist der Nutzen von Venetoclax Gegenstand laufender klinischer Studien [581]; in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen haben sich in Kombination mit Tamoxifen in einer Phase-Ib-Studie vielversprechende Ergebnisse gezeigt [582]. Klinische Studien zur Kombination von Cisplatin und Venetoclax wurden bis dato nicht durchgeführt.

1.5.2 b) XAF1

XIAP-Associated Factor 1 (XAF1) ist ein direkter Antagonist von XIAP und vermittelt zudem eine Umverteilung von XIAP in den Nukleus, wo XIAP seine antiapoptotische Wirkung nicht entfalten kann [583] (siehe auch 4.5.2.2). Bemerkenswerterweise wird XAF1 in Tumorzellen viel weniger exprimiert als in Normalgeweben [583, 584]; dies bietet einen interessanten Ansatz für die Entwicklung zielgerichteter Tumorthérapien. Zahlreiche Tumorentitäten regulieren die Expression von XAF1 durch Promotor-Hypermethylierung herunter [585]; dies wurde auch für Urothelkarzinomzellen *in vitro* und sowie in retrospektiven Analysen operativ entnommener Gewebeproben von Patienten gezeigt [586].

XAF1 ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors p53, welcher die Expression von XAF1 herunterreguliert [587]. Überexpression von XAF1 führt hingegen zur Aktivierung von p53 [588]. XAF1 konkurriert mit Mdm2 um die Bindungsstelle an p53 und verhindert so dessen proteasomalen Abbau [589]. Außerdem verhindert XAF1 auch die Interaktion von HIPK2 mit SIAH1 und somit den proteasomalen Abbau von HIPK2, wodurch HIPK2 stabilisiert und die transkriptionelle Aktivität von p53 in Richtung proapoptotischer Gene

dirigiert wird [589] (siehe 1.3.3.1). Parallel dazu aktiviert XAF1 die Ubiquitinierung von p21, welches in der Folge vermehrt abgebaut wird [589]. Somit unterstützt XAF1 die proapoptotischen Funktionen von p53 und wirkt den Zellzyklus-regulierenden Funktionen sowie der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen entgegen [174]. Die Expression von XAF1 wird zudem durch *Heat Shock Factor 1* (HSF1), den Haupt-Transkriptionsfaktor für die Hitzeschockproteine, herunterreguliert [590]. Interferone, insbesondere Interferon β , hingegen stimulieren die Expression von XAF1 [591]. Auch TNF α kann NF- κ B-vermittelt die Transkription von XAF1 aktivieren [592]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von XAF1 durch den MAPK/ERK-Signalweg (siehe 1.3.5.3) beeinflusst wird, denn MEK-Inhibition führt in Kolonkarzinomzellen *in vitro* zur Hochregulierung von XAF1 [593].

Es wird angenommen, dass Herunterregulierung von XAF1 zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Apoptose an sich sowie Apoptose-induzierender Zytostatika beiträgt [583]. Durch unterschiedliche Mediatoren vermittelte Überexpression von XAF1 hingegen hat in Xenograft-Modellen zu einer erheblichen Abnahme des Tumolvolumens bei Kolonkarzinomen und malignen Melanomen geführt [585]. Transfektion von XAF1 in Kolonkarzinomzellen mittels eines Adenovirus als Vektor hat in präklinischen Modellen *in vitro* und *in vivo* ebenfalls vielversprechende Antitumoreffekte gezeigt [594]. XAF1-Überexpression sensitiviert Kolonkarzinomzellen *in vitro* gegenüber Cisplatin, während Herunterregulieren der XAF1-Expression Cisplatinresistenz bedingen kann [595]. In HCC-Zellen führte die Kombination von Cisplatin mit einem XAF1-tragenden Adenovirus zur verbesserten Sensitivität gegenüber Cisplatin *in vitro* und *in vivo* [596]. Auch in Ovarialkarzinomzellen geht Überexpression von XAF1 mit erhöhter Sensitivität gegenüber Cisplatin *in vitro* [597, 598] und *in vivo* [598] einher.

In Harnblasenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass verminderte XAF1-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Grading einhergeht [586, 599] und zu einem schlechteren Ansprechen auf eine neoadjuvante Kombinationschemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin führt [600]. Die Transfektion mit einem XAF1-tragenden Virus erhöht die Sensitivität der Blasenkarzinomzellen gegenüber Etoposid und 5-Fluoruracil [586], der Effekt auf die Cisplatin-sensitivität wurde jedoch nicht untersucht.

1.5.2 c) Survivin

Survivin (auch *Baculoviral IAP Repeat-Containing protein 5*, BIRC5 genannt) ist das kleinste Protein der IAP-Familie [601]. Neben seiner Rolle als Inhibitor der Apoptose ist Survivin an der Koordination der mitotischen Zellteilung entscheidend beteiligt [602]. Während der Mitose ist Survivin Teil des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC), der die Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen koordiniert [603]. Survivin wird Zellzyklus-abhängig transkribiert; während der Mitose erreicht die Expression ihr Maximum, in der G₁-Phase ist sie minimal [604].

Im Gegensatz zu anderen IAPs wird Survivin bei Erwachsenen nahezu ausschließlich in Stammzellen und proliferierenden Zellen exprimiert [605]. In Tumorzellen ist Survivin fast immer hochreguliert, weshalb es als besonders vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Tumortherapien gilt [605]. Hohe Survivinexpression geht bei zahlreichen malignen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose einher [603]. Survivin ist neben seiner antiapoptotischen Funktion auch an der Persistenz von Tumorstammzellen und an der Epithelial-Mesenchymalen Transition beteiligt [606]. Diverse Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Survivin-Expression; sie wird u. a. durch p53 und das Retinoblastom-Protein herunterreguliert und durch die Transkriptionsfaktoren STAT3, HIF1 und NF- κ B gefördert [607]. Survivin kann die Apoptose sowohl inhibieren, wenn sie über den extrinsischen, als auch wenn sie über den intrinsischen Weg eingeleitet wird [608]. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass Survivin wie andere IAPs direkt Caspasen inhibiert [602]. Inzwischen hat sich jedoch gezeigt, dass Survivin die Caspaseaktivität indirekt beeinflusst, indem es mit anderen IAPs interagiert und so deren Wirkung verstärkt [603]. Außerdem fängt Survivin Smac/DIABLO ab, sodass dieses die anderen IAPs weniger inhibieren kann [603].

Direkte Survivin-Inhibitoren sind pharmakologisch schwierig zu entwickeln [603]. Der Survivin-Inhibitor YM155 inhibiert Survivin nicht direkt, reguliert jedoch dessen Transkription herunter, wobei der genaue Mechanismus unklar ist [601]. Klinische Studien in fortgeschrittenen soliden Tumoren zeigten jedoch keine hinreichende Effektivität [609]; in einer dieser Studien wurde YM155 auch als Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel bei NSCLC-Patienten verabreicht [610]. Weitere therapeutische Ansätze, basierend auf RNA-Interferenz, auf der Verhinderung der Interaktion von Survivin mit seinen Interaktionspartnern und auf der Inhibition der Homodimerisierung von Survivin sind in Erprobung [609]. Zudem werden auch Impfungen mit Survivin-Peptiden als Antigen entwickelt, die eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber Survivin-Peptiden hervorrufen [608].

Infolge einer Cisplatinbehandlung wird Survivin hochreguliert, was im Verlauf Cisplatinresistenz bedingen kann, da die Cisplatin-induzierte Apoptose beeinträchtigt ist [611]. Bei Ovarialkarzinom-Patientinnen ist Survivin-Expression mit einer schlechteren Prognose und Cisplatinresistenz assoziiert [612]. In Cisplatin-resistenten Prostatakarzinomzellen korreliert die Cisplatinempfindlichkeit *in vitro* invers mit der Survivin-Expression [613]. Erworbene Cisplatinresistenz von Magenkarzinomzellen geht *in vitro* mit Zunahme der Survivin-Expression einher [611, 614]. Präklinisch haben sich vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Sensitivierung gegenüber Cisplatin durch Survivin-Inhibition ergeben. Durch RNA-Interferenz können HNSCC-Zellen *in vitro* [615, 616] und *in vivo* [615], sowie NSCLC-Zellen [617, 618], HCC-Zellen [619], Schilddrüsenkarzinomzellen [620], Zervixkarzinomzellen [621], Ovarialkarzinomzellen [622], Ösophaguskarzinomzellen [623] und Osteosarkomzellen [624] *in vitro* gegenüber Cisplatin sensitiviert werden. Survivin-Suppression mittels YM155 kann die Effektivität einer Cisplatinbehandlung in Osteosarkomzellen [625], Ovarialkarzinomzellen [626],

Hepatoblastomzellen [627] und HNSCC-Zellen [628] *in vitro* und *in vivo* erhöhen sowie Cisplatin-resistente HNSCC-Zellen resensitivieren [628]. Pharmakologische Blockade des Transkriptionsfaktors STAT3 führt zur Herunterregulierung der Survivin-Expression und kann so HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo* gegenüber Cisplatin sensitivieren [629]. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem Gene mit proliferativer und antiapoptotischer Funktion hochreguliert sowie an der Angiogenese und der Epithelial-Mesenchymalen Transition beteiligt ist [630]. Das atypische Antipsychotikum Olanzapin, das zur Bekämpfung von Chemotherapie-induzierter Übelkeit, wie sie unter Cisplatintherapie häufig auftritt, verwendet wird, reguliert Survivin herunter und sensitiviert dadurch Tumorzellen *in vitro* gegenüber Cisplatin [631]. Das pflanzliche Mittel Resveratrol resensitiviert Cisplatin-resistente NSCLC-Zellen *in vitro* durch Suppression der Survivin-Expression [632].

Survivin ist in Blasenkarzinomzellen häufig überexprimiert [633]. Die Evidenz verdichtet sich, dass Nachweis von Survivin bzw. Survivin-mRNA im Urin ein nützlicher Parameter zur Früherkennung von Blasenkarzinomen ist [634, 635]. Erhöhte Survivin-Expression ist bei Patienten mit Blasentumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert [636]. Positive Survivin-Immunhistochemie konnte zudem als geeigneter Biomarker identifiziert werden, Cisplatinresistenz bei Blasen tumorpatienten vorherzusagen [637]. RNA-Interferenz mit Survivin-mRNA zeigt in Blasenkarzinomzellen antiproliferative Aktivität *in vitro* [638–640] und *in vivo* [639]. Außerdem kann Überexpression der miRNA miR-203, die mit Survivin-mRNA interagiert und deren Translation verhindert, die Sensitivität von Blasenkarzinomzellen gegenüber Cisplatin *in vitro* erhöhen [641]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass simultane Blockade der Translation von Bcl-xL und Survivin die Effektivität einer Cisplatintherapie in Blasenkarzinomzellen *in vitro* deutlich erhöht [642]. Ebenso kann Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen durch Survivin-Suppression mittels YM155 *in vitro* überwunden werden [643]. Es gibt somit Hinweise darauf, dass Survivin ein geeignetes Ziel therapeutischer Strategien sein könnte, um Cisplatin-resistente Blasen tumorzellen gegenüber Cisplatin zu resensitivieren.

1.5.2 d) Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs)

Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs) sind Membrantransporter der äußeren Mitochondrienmembran, die den Austausch von Substraten (ADP, Phosphat) und Produkten (ATP) der oxidativen Phosphorylierung sowie weiterer Metabolite und Ionen zwischen Zytosol und mitochondrialem Intermembranraum ermöglichen [644]. So werden auch reaktive Sauerstoffspezies, die in der Elektronentransportkette anfallen, über VDACs ins Zytosol transportiert, unter anderem das Superoxid-Anion [645]. Die Leitfähigkeit von VDACs hängt vom mitochondrialen Membranpotential ab; bei stark positivem oder negativem Membranpotential nimmt die Leitfähigkeit ab, sodass keine organischen Anionen mehr über den VDAC transportiert werden [537]. Darüber hinaus wird die Leitfähigkeit durch posttranslationale Modifikationen und Komponenten des Zytoskeletts, die an VDACs binden, beeinflusst [644]. Auch bei einer Konfiguration mit

geringer Leitfähigkeit können über VDACs kleine Ionen wie Kalium, Natrium, Calcium und Chlorid über die äußere Mitochondrienmembran transportiert werden [644]. An der Einleitung der Apoptose durch Calciumaufnahme aus dem ER sind VDACs entscheidend beteiligt (siehe 1.5.1.1). Bcl-2 kann einen partiellen Verschluss von VDACs bedingen [533] (siehe 1.5.1.1). Ein wichtiger Bindungs- und Interaktionspartner von VDACs ist die Hexokinase, die ATP-abhängig den ersten Schritt der Glykolyse katalysiert [646]. Die Bindung an die zytosolische Seite der VDACs ermöglicht der Hexokinase den schnellen Zugriff auf ATP [647]. Außerdem wird durch Bindung an VDAC die Affinität der Hexokinase gegenüber ihrem Produkt Glukose-6-Phosphat verringert, sodass der negative Feedback-Mechanismus unterbrochen wird [648]. In vielen Krebszellen findet, anders als in Normalgeweben, die Glykolyse auch statt, wenn eigentlich genügend Sauerstoff für die oxidative Phosphorylierung vorhanden wäre; dies wird als Warburg-Effekt bezeichnet [649]. Die Hexokinase wird in Krebszellen häufig transkriptionell hochreguliert bzw. überexprimiert [646]. Bindung der Hexokinase an VDAC inhibiert dessen proapoptotische Funktionen [648]. Die Blockade der Interaktion zwischen VDAC und der Hexokinase in Krebszellen stellt daher ein vielversprechendes Ziel für zukünftige Krebstherapien dar [537]. Ein Hexokinase-Inhibitor, der als Monotherapie nur einen geringen therapeutischen Effekt aufweist, konnte Cisplatin-resistente Ovarialkarzinomzellen *in vitro* resensitivieren [650]. In einer anderen Studie konnte 3-Bromopyruvat, welches die Interaktion der Hexokinase mit den VDACs behindert, die Sensitivität Cisplatin-resistenter Ovarialkarzinomzellen, die Veränderungen im Sinne der EMT aufwiesen, *in vitro* erhöhen [651].

Cisplatin bindet direkt an nukleophile Aminosäurereste von VDACs und kann unabhängig von nukleären DNA-Schäden den intrinsischen Signalweg der Apoptose einleiten - möglicherweise durch erleichterte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum infolge der Interaktion von Cisplatin mit VDACs [652]. Hochregulierung der Isoform VDAC1 sensitiviert Kolon- und Zervixkarzinomzellen *in vitro* gegenüber Cisplatin [653]. Umgekehrt vermittelt Herunterregulierung von VDAC in NSCLC-Zellen *in vitro* Cisplatinresistenz [538]. In Cisplatin-resistenten Zervixkarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass VDAC1 nach Cisplatinexposition im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen deutlich herunterreguliert ist [654]. In Cisplatin-resistenten Blasenkarzinomzellen wurde eine deutlich erhöhte Expression des Proteins Adseverin detektiert [655]. Im Bereich der Mitochondrien ist Adseverin an VDACs gebunden und inhibiert durch diese Interaktion den intrinsischen Signalweg der Apoptose [655]. Es gibt somit zahlreiche Hinweise darauf, dass Herunterregulierung von VDACs oder Beeinflussung der Interaktionspartner von VDACs Cisplatinresistenz vermitteln können. Die Evidenz für Urothelkarzinome ist jedoch bislang gering.

1.5.2 e) Calpaine

Calpaine sind überwiegend zytosolisch lokalisierte Calcium-abhängige Cysteinproteasen, die zahlreiche Proteinsubstrate spalten. Dazu gehören u.a. Proteine des Zytoskeletts, Membranrezeptoren und Transkriptionsfaktoren [656]. Calpaine können ihre Substrate entweder abbauen oder durch Proteolyse modifizieren, sodass die Produkte neue Funktionen übernehmen [657]. Calpaine werden durch Bindung von Calcium aktiviert; dies bedingt eine Konformationsänderung der Enzyme, wodurch sich das aktive Zentrum bildet [658]. Bei Freisetzung großer Mengen Calcium aus dem ER infolge von ER-Stress werden die Calpaine somit aktiviert [659] (siehe 1.5.1.1). Die Aktivierbarkeit von Calpainen kann durch Phosphorylierungen beeinflusst werden, die die Verteilung der Calpaine innerhalb der Zelle regulieren [660]. Wenn Calpaine z. B. an der Innenseite der Zellmembran in der Nähe von Calcium-Transportern lokalisiert sind, sind sie leichter aktivierbar [657]. Auf diese Weise trägt ERK-vermittelte Phosphorylierung zur Aktivierung von Calpainen bei [660]. Calpaine sind an der Einleitung der Apoptose infolge von ER-Stress beteiligt [661]. Neben der Aktivierung der Procaspase 12 und nachfolgender Einleitung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose (siehe 1.5.1.1) können Calpaine auch direkt die Effektorcaspase 7 durch proteolytische Spaltung aktivieren [662]. Außerdem wird XIAP durch Calpaine abgebaut und verliert so seine inhibitorische Funktion auf die Caspasen [663]. Die aktivierte Caspase 3 kann den endogenen Calpain-Inhibitor Calpastatin spalten und so inaktivieren [664]. Somit aktivieren sich Caspasen und Calpaine gegenseitig und bilden einen positiven Feedback-Loop [657]. Calpaine können außerdem Bax spalten [665], wodurch dessen Interaktion mit Bcl-2 und Bcl-xL verhindert wird, was zur Aktivierung von Bax führt. Auch Bid [519], Bak [666] und Bcl-xL [523] sind Calpain-Substrate. Mitochondriales Calpain spaltet unabhängig von Caspasen infolge einer Cisplatinexposition AIF (siehe 1.5.1.3), welcher daraufhin aus den Mitochondrien freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert [667]. Zudem sind Calpaine an der Aktivierung der MAP-3K ASK1 und somit der prolongierten Aktivierung des JNK-Signalwegs (siehe 1.3.5.1) infolge von ER-Stress beteiligt [661].

Calpaine spalten sowohl Wild-Typ-p53 als auch mutiertes p53, wobei unklar ist, ob es sich um eine Prozessierung oder einen proteolytischen Abbau handelt bzw. inwiefern dies die Funktion von p53 beeinflusst [657]. In Cisplatin-sensitiven Ovarialkarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass PARC, ein Protein, das die Verteilung von p53 innerhalb der Zelle reguliert und p53 im Zytoplasma bindet, ebenfalls ein Calpain-Substrat ist [668]. Infolge einer Cisplatinexposition spalten Calpaine PARC, sodass p53 vorwiegend nukleär und mitochondrial lokalisiert ist und die Apoptose eingeleitet werden kann [668]. In Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzellen wird PARC hingegen nicht durch Cisplatinexposition herunterreguliert [668]. Als Substrat von Calpain wurde auch die 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1 (OGG1), das wichtigste Reparaturenzym für 8-Oxoguanin, identifiziert [669]. Infolge einer Cisplatinexposition von Zervixkarzinomzellen wird Calpain aktiviert und OGG1 gespalten, was die Reparaturkapazität für ROS-induzierte DNA-Schäden erheblich beeinträchtigt und so

Apoptose begünstigen kann [669]. In Mammakarzinomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Calpain-Inhibition die Apoptose infolge einer Cisplatinbehandlung abschwächt [670]. In Cisplatin-resistenten Magenkarzinomzellen sind miRNAs hochreguliert, die die Expression einer regulatorischen Untereinheit von Calpain inhibieren [671]. Durch Blockade der miRNAs konnten die Cisplatin-resistenten Zellen *in vitro* resensitiviert werden [671]. Die Bedeutung von Calpain für Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen ist noch unklar.

Trotz der proapoptotischen Funktionen ist hohe Expression von Calpainen in malignen Tumoren häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert [657]. Calpain-Aktivierung fördert Proliferation, Migration und Invasion [657]. Durch Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts und von Bestandteilen der Zell-Zell-Kontakte fördern Calpaine die Epithelial-Mesenchymale Transition [657]. So wird beispielsweise E-Cadherin durch Calpaine gespalten, welches nach der Spaltung nicht mehr an β -Catenin binden kann, sodass sich die Zellkontakte in den Zonulae adhaerentes auflösen, was Invasion und lymphogene Metastasierung begünstigt [672]. Calpaine können zudem I κ B spalten und so zur Aktivierung von NF- κ B (1.3.3.4) beitragen. [673]. In Myc-exprimierenden Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Spaltung von Myc durch Calpain zu erhöhter Chemosensitivität gegenüber Cisplatin führt, die durch das Spaltprodukt Myc-nick vermittelt wird [674]. Somit nehmen Calpaine im Hinblick auf Cisplatinresistenz eine duale Rolle ein, wodurch es erschwert wird, sie als therapeutische Ziele zur Überwindung von Cisplatinresistenz zu nutzen.

1.5.2 f) Caspasen

Es gibt Hinweise darauf, dass Veränderungen der Caspase-Kaskade mit Cisplatinresistenz assoziiert sind. In Cisplatin-resistenten Pleuramesotheliomzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass erworbene Cisplatinresistenz mit einer erhöhten Fragmentierung der Caspase 9 ohne Anstieg von deren proteolytischer Aktivität einhergeht; zudem wurde nach Cisplatin-Behandlung eine zeitliche Verzögerung der Caspase 9-Aktivierung beobachtet, die erst nach der Aktivierung von Caspase 3 und 7 stattfand [675]. Ob diese Veränderungen in den Cisplatin-resistenten Zellen auf Modifikationen der Caspase-Kaskade selbst oder auf inhibitorische Proteine, z.B. XIAP zurückzuführen sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden [675]. Fehllokalisiertes zytoplasmatisches p53 interagiert direkt mit dem p35-Fragment der Caspase 9, was zur Inhibition der Caspase 9 führt und Cisplatinresistenz bedingen kann [676]. Cisplatin-resistente HNSCC-Zellen [677] bzw. Keimzelltumoren [678] weisen *in vitro* eine verminderte bzw. fehlende Caspase-9-Aktivität auf. Auch Beeinträchtigungen des extrinsischen Signalwegs bzw. der Caspase 8-Aktivität können zu Cisplatinresistenz beitragen. In Cisplatin-resistenten HNSCC-Zellen wurde eine Nonsense-Mutation im Caspase-8-Gen detektiert [679]. Ebenso geht ein Funktionsverlust der Caspase 8 in Zervixkarzinomzellen *in vitro* mit Cisplatinresistenz einher [680]. Infolge einer Cisplatin-Behandlung werden die Effektorcaspasen 6 und 7, nicht jedoch die Caspase 3 *in vitro* und

in vivo p53-abhängig induziert [681]. In NSCLC-Zellen ist erworbene Cisplatinresistenz *in vitro* mit Herunterregulierung der Caspase 6 assoziiert [682]. In Ovarialkarzinomzellen mit erworbener Cisplatinresistenz ist hingegen die Proteinexpression und Aktivität der Effektorcaspase 3 *in vitro* vermindert [683]. Die Rolle von Veränderungen der Expression und Aktivität von Caspasen für die erworbene Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen ist bislang unklar. In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression der Initiatorcaspase 9 sowie der Effektorcaspase 6 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen.

1.6 Cisplatin-Resistenzmechanismen ohne Bezug zur DNA-Schadensantwort, DNA-Reparatur oder Apoptose

Neben Resistenzmechanismen, die mit der DNA-Schadensantwort und der Apoptose assoziiert sind, sind zahlreiche weitere Faktoren beschrieben, die für die Entwicklung von Cisplatinresistenz von Bedeutung sind [69]. Dazu gehören Membrantransporter, die die Konzentration von Cisplatin im Zytoplasma bzw. Karyoplasma beeinflussen, sowie intrazytoplasmatische nukleophile Radikalfänger, die Cisplatin bereits vor seiner Interaktion mit der DNA inaktivieren [69]. Beide Mechanismen entfalten ihre Wirkung vor Bindung von Cisplatin an die DNA [554]. Außerdem gibt es Resistenzmechanismen, die nicht direkt in die Signaltransduktion von Cisplatin eingreifen, sondern auf andere Signalwege Einfluss nehmen und so Cisplatinresistenz begünstigen [554].

1.6.1 Membrantransporter

Für die Entwicklung von Cisplatinresistenz sind insbesondere der Influx-Transporter CTR1, sowie die Efflux-Transporter ATP7A, ATP7B und MRP2 von Bedeutung [69]. In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression von CTR1, ATP7A und MRP2 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen. Die Funktion der genannten Transporter und ihre Bedeutung für Cisplatinresistenz werden im Folgenden kurz erläutert.

1.6.1 a) Der Influx-Transporter CTR1

Eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle spielt neben passiver Diffusion der Kupfertransporter *Copper Transporter 1* (CTR1) [684]. Kupfer konkurriert mit Cisplatin um die Bindungsstellen an CTR1, sodass hohe Kupferspiegel zu geringerer Cisplatin Aufnahme in die Zelle führen [685]. Fehlende CTR1-Expression ist mit verminderter Aufnahme von Cisplatin ins Zytoplasma und in der Folge abgeschwächter Zytotoxizität assoziiert [684]. Nach Cisplatinexposition wird CTR1 in Ovarialkarzinomzellen *in vitro* herunterreguliert [686]. In letzter Zeit wird die Rolle von CTR1 für die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle jedoch kontrovers diskutiert. Neuere Daten aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien implizieren, dass die Cisplatinempfindlichkeit durch

Fehlen von CTR1 nicht wesentlich beeinträchtigt wird [687, 688]. Im klinischen Setting wurde dagegen eine Korrelation zwischen Cisplatinempfindlichkeit und der Expression von CTR1 bei NSCLC [689] und muskulinvasiven Harnblasenkarzinomen [690] nachgewiesen.

1.6.1 b) Die Efflux-Transporter ATP7A und ATP7B

Weitere Transporter mit Relevanz sowohl für die Kupferhomöostase als auch die intrazytoplasmatische Cisplatinkonzentration sind die P-Typ ATPasen ATP7A und ATP7B [691]. Die Expression von ATP7A korreliert invers mit der Cisplatinempfindlichkeit von Tumorzellen *in vitro* [692] und *in vivo* [693]. Herunterregulierung von ATP7A kann Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* gegenüber Cisplatin empfindlicher machen [694]. In Cisplatin-resistenten Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus hat sich eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression von ATP7A im Vergleich zu den Cisplatin-empfindlichen Ursprungszellen gezeigt; durch siRNA-vermittelte Herunterregulierung von ATP7A konnte die Cisplatinempfindlichkeit teilweise wieder hergestellt werden [695].

ATP7B wird in oralen Plattenepithelkarzinomzellen im Zuge der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin hochreguliert; durch Transfektion von ATP7B-siRNA können die Zellen gegenüber Cisplatin empfindlicher gemacht werden [696]. Bei Endometriumkarzinom-Patientinnen [697] und Ovarialkarzinom-Patientinnen [698], die eine Cisplatin-basierte Chemotherapie erhalten, ist eine hohe Expression von ATP7B mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

1.6.1 c) Der Efflux-Transporter MRP2

Multidrug Resistance Proteins (MRPs) sind ebenfalls ATP-abhängige Efflux-Transporter, die unselektiv zytotoxische Substanzen nach extrazellulär transportieren [699]. Besonders relevant für den Transport von Cisplatin scheint MRP2 zu sein [700], dessen Überexpression in Melanomzellen *in vitro* Cisplatinresistenz zur Folge hat [701]. In Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzellen führt Herunterregulierung von MRP2 *in vitro* zur Resensibilisierung gegenüber Cisplatin [702]. Auf histopathologischer Ebene konnte gezeigt werden, dass Überexpression von MRP2 bei Patienten mit HCC mit verminderter Tumornekrose einhergeht [703]. Bei neoadjuvant behandelten Patienten mit Ösophaguskarzinom ist die Expression von MRP2 mit einer schlechten Prognose und Chemoresistenz assoziiert [704].

1.6.2 Intrazytoplasmatische Nukleophile und Antioxidative Enzyme

In Tumorzellen fallen aufgrund ihrer raschen Proliferation mit hohem Energiebedarf, ihrem veränderten Metabolismus und ihrer genetischen Instabilität vermehrt reaktive Sauerstoffspezies an [705]. Cisplatin verstärkt indirekt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, was einen relevanten Anteil der Cisplatin-induzierter Zytotoxizität ausmacht [87] (siehe 1.2.3.2). Durch nukleophile Radikalfänger und antioxidative Enzyme können reaktive Sauerstoffspezies entgiftet werden, was die ROS-induzierte Zytotoxizität von Cisplatin beeinträchtigen kann [182]. Darüber hinaus werden einige Radikalfänger,

wie Glutathion und Metallothioneine, direkt an Cisplatin gebunden und verhindern so dessen Interaktion mit der DNA [691]. Wenn infolge einer Cisplatinexposition reaktive Sauerstoffspezies akkumulieren, werden antioxidative Enzyme in den Tumorzellen hochreguliert, um das Redox-Gleichgewicht der Zelle zu erhalten [706]. Als Sensor dient dabei unter anderem der Transkriptionsfaktor NRF2, der im Zytoplasma ruhender Zellen innerhalb kurzer Zeit ubiquitiniert und nachfolgend proteasomal abgebaut wird [706]. Durch Interaktion mit dem Protein KEAP1 wird die Ubiquitinierung von NRF2 durch das Enzym Cullin-3 erleichtert [182]. Oxidativer Stress führt zum Verbrauch von Thiolgruppen des Cystein-reichen KEAP1 [707]. Dies bewirkt eine Konformationsänderung von KEAP1, sodass dessen Interaktion mit NRF2 gestört und NRF2 weniger ubiquitiniert und abgebaut wird [707]. NRF2 gelangt in den Zellkern, wo er an das *Antioxidant Response Element* (ARE) in der Promotorregion zahlreicher antioxidativer Gene bindet und deren Transkription initiiert, darunter die der Glutathion-S-Transferase μ 1 (GSTM1), der Glutathionperoxidase GPX1 und der Hämoxxygenase 1 (HO-1, HMOX1) [182], deren mRNA-Expression in der hier vorliegenden Arbeit analysiert wird. Überexpression von NRF2 sowie Mutationen, die die Funktion von KEAP1 oder der mit KEAP1 interagierenden Domäne von NRF2 beeinträchtigen, können Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen vermitteln [708, 709]. *Knockdown* von NRF2 kann *in vitro* Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen resensitivieren [708, 709]. Neben spezifischen Inhibitoren einzelner antioxidativer Enzyme wird in präklinischen Modellen auch der Ansatz verfolgt, durch zielgerichtete Hemmung von NRF2 die Expression vieler antioxidativer Enzyme zu inhibieren und so Cisplatinresistenz zu bekämpfen, wobei die angewendeten NRF2-Inhibitoren in verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* Wirksamkeit gezeigt haben [710–713]. Auch in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen haben sich *in vitro* Hinweise auf die Wirksamkeit von NRF2-Inhibitoren ergeben [709].

In dieser Arbeit wird die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase 1 (GPX1) und Glutathion-S-Transferase μ 1 (GSTM1), sowie der nukleophile Radikalfänger Metallothionein 1A (MT1A) in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen. Zudem wird auch die mRNA Expression der Hämoxxygenase 1 (HO-1, HMOX1) sowie der Kinase DYRK1B/MIRK analysiert, welche neben antioxidativen auch weitere antiapoptotische Funktionen haben und Cisplatinresistenz somit auf mehreren Ebenen begünstigen. Die Funktion sowie die Bedeutung der genannten Faktoren für Cisplatinresistenz werden im Folgenden erläutert.

1.6.2 a) Glutathionperoxidase GPX1

Die Glutathionperoxidase GPX1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Entgiftung von Wasserstoffperoxid, indem sie die Glutathion-abhängige Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysiert; dabei entsteht Glutathiondisulfid [714]. Die Reaktion wird mithilfe von Selenocystein im katalytischen Zentrum des Enzyms ausgeführt [715]. GPX1 kann außerdem Lipidperoxide reduzieren [716]. In zahlreichen

Tumorentitäten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Überexpression von GPX1 mit Cisplatinresistenz einhergeht, darunter NSCLC- [717] und Ösophaguskarzinomzellen [718], sowie adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinome [719] und Non-Hodgkin-Lymphome [720]. Dies wird in erster Linie auf geringere Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt. Außerdem sind Lipidperoxide, die durch Glutathionperoxidasen reduziert werden können [721], an der Induktion einer alternativen Form des programmierten Zelltods, der Ferroptose beteiligt [722]. Die Ferroptose wird in Tumorzellen durch Cisplatin-induzierte ROS-Produktion begünstigt und somit bei GPX1-Überexpression inhibiert [722].

Da NF- κ B an den Promotor der GPX1 binden und so deren Expression in Reaktion auf oxidativen Stress regulieren kann, könnten NF- κ B-Inhibitoren eine Möglichkeit sein, GPX1-induzierte Cisplatinresistenz aufzuheben [718]. Vitamin D kann die Expression von NF- κ B herunterregulieren [723] und kommt somit als leicht verfügbares und sicheres Therapeutikum zur Bekämpfung GPX1-induzierter Cisplatinresistenz in Betracht. In adenoid-zystischen Speicheldrüsenkarzinomen [719] und Ösophaguskarzinomen [718] kann Vitamin D *in vitro* GPX1-überexprimierende Zellen gegenüber Cisplatin resensitivieren.

1.6.2 b) Glutathion-S-Transferase μ 1 (GSTM1)

Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin mit antioxidativen Eigenschaften durch die Thiolgruppe des Cysteins [91]. Es wird - häufig mithilfe von Glutathion-S-Transferasen - an Cisplatin und andere elektrophile Xenobiotika konjugiert, sodass diese reduziert werden [724]. Höhere Expression von Glutathion, seinem Synthesenzym sowie der Glutathion-S-Transferase sind mit Cisplatinresistenz assoziiert [90, 724]. Dies wurde auch in Harnblasenkarzinomzellen *in vitro* detektiert [725]. In dieser Arbeit wird die mRNA-Expression des Konjugationsenzym GSTM1 analysiert. Eine genomweite Metaanalyse konnte eine Assoziation von GSTM1 mit Cisplatinresistenz nachweisen [726]. Inhibitoren von Glutathion-S-Transferasen haben sich *in vitro* [727, 728] und *in vivo* [728] als effektiv zur Sensitivierung Cisplatin-resistenter Zellen erwiesen.

1.6.2 c) Metallothionein MT1A

Neben Glutathion sind Metallothioneine, z.B. MT1A, an der Detoxifikation von Cisplatin und somit an der Resistenzentwicklung beteiligt [691]. Metallothioneine sind Proteine mit hohem Cysteingehalt und somit hoher Affinität zu Schwermetallionen, deren physiologische Funktion darin besteht, Zink und Kupfer zu binden und zu transportieren sowie Schwermetallionen zu entgiften [729]. Durch ihren hohen Cysteingehalt tragen Metallothioneine außerdem durch Abfangen elektrophiler Radikale zur Reduktion von oxidativem Stress bei [730]. Dadurch nehmen sie auch Einfluss auf die Effektivität der Apoptose [731]. Erhöhte Metallothioneinspiegel im Zytosol führen zur Inaktivierung von Cisplatin vor Erreichen des Nukleus und bedingen so Cisplatin-Resistenz [732, 733]. Überexpression von Metallothioneinen geht mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit

bei Blasenkarzinom-Patienten, die mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie behandelt wurden, einher [734]. *In vitro* konnte die Sensitivität gegenüber Cisplatin durch Suppression von Metallothioneinen mittels RNA-Interferenz in malignen Melanomzellen deutlich verbessert werden [735].

1.6.2 d) Hämoxigenase 1 (HO-1, HMOX1)

Das Enzym Hämoxigenase katalysiert die oxidative Spaltung von Häm zu Biliverdin, Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO) [91]. Die durch zellulären Stress induzierbare Form des Enzyms ist die Hämoxigenase 1 (HO-1, HMOX1) [736]. Neben NRF2 können auch AP-1 (siehe 1.3.5.1) und NF-κB (siehe 1.3.3.4) die Transkription der HO-1 aktivieren [737]. Die Hämoxigenase ist durch ihre Abbauprodukte an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter Reduktion von oxidativem Stress, Aktivierung antiapoptotischer Signalwege, Stimulation der Angiogenese und Entzündungshemmung [738]. Biliverdin und sein Abbauprodukt Bilirubin sind starke Antioxidantien und vermindern so intrazellulären oxidativen Stress [739]. Auch Kohlenstoffmonoxid scheint große Bedeutung für die biologischen Effekte der Hämoxigenase zu haben, unter anderem indem es über Beeinflussung der p38- und ERK-Signalwege antiapoptotisch wirkt [737]. Überexpression der Hämoxigenase 1 wurde *in vitro* [577] und *in vivo* [740] in Cisplatin-resistenten Blasenkarzinomzellen beobachtet. Auch in Ovarialkarzinomzellen [741], pulmonalen Adenokarzinomzellen [711] und Larynxkarzinomzellen [742] ist Überexpression der Hämoxigenase 1 *in vitro* mit Cisplatinresistenz assoziiert. Inhibitoren der Hämoxigenase 1 können *in vitro* Cisplatin-resistente NSCLC-Zellen resensitivieren [743, 744].

1.6.2 e) Kinase DYRK1B/MIRK

DYRK1B/MIRK ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die Überlebenssignale vermittelt und in zahlreichen soliden Tumoren, z. B. NSCLC, Kolon- und Pankreaskarzinomen überexprimiert ist [745]. Als Koaktivator von Transkriptionsfaktoren begünstigt sie die Expression antioxidativer Proteine wie der Superoxiddismutasen 2 und 3, die die Reaktion von zwei Superoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$) mit zwei Protonen zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff katalysieren [746]. Außerdem phosphoryliert DYRK1B/MIRK das Cyclin D1, sodass dieses destabilisiert und ein Zellzyklusarrest begünstigt wird [747]. Der Zellzyklusarrest kann der Zelle Zeit für DNA-Reparaturprozesse verschaffen (siehe 1.3.4). In Ovarialkarzinomzellen [748, 749] und NSCLC-Zellen [750] führt Suppression von DYRK1B/MIRK durch RNA-Interferenz *in vitro* zur Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber Cisplatin. Ein Inhibitor von DYRK1B/MIRK hat sich in Pankreaskarzinomzellen zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin *in vitro* als effektiv erwiesen [751]. DYRK1B/MIRK-Inhibitoren werden erforscht, um den Wiedereintritt ruhender Tumorzellen aus der G_0 -Phase in den Zellzyklus zu ermöglichen und sie so zugänglich für Chemotherapien zu machen [751, 752]. Die Bedeutung von DYRK1B/MIRK für Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen ist noch unklar.

1.6.3 Resistenzmechanismen ohne direkten Bezug zur Cisplatin-induzierten Signaltransduktion

1.6.3 a) ERBB2/HER2 und der PI3-Kinase/Akt-Signalweg

ERBB2, auch *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) genannt, ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase aus der Familie der EGF-Rezeptoren [753]. Diese Rezeptor-Tyrosinkinasen bilden nach extrazellulärer Bindung von Liganden Heterodimere, wodurch die intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomänen in unmittelbare Nähe zueinander gelangen und sich gegenseitig phosphorylieren [91]. ERBB2 ist ein nicht-autonomer Vertreter der ERBB-Familie, da ERBB2 keine extrazellulären Liganden binden kann [754]. Es ist jedoch an der Bildung von Heterodimeren mit anderen Vertretern der ERBB-Familie beteiligt und verstärkt bzw. erleichtert dadurch deren Signaltransduktion [754]. Die phosphorylierten Tyrosinreste der Heterodimere bilden Bindungsstellen für Signaltransduktionsmoleküle, welche durch Phosphorylierung, Konformationsänderung oder Interaktion mit membranständigen Zielmolekülen aktiviert werden und dann die weitere Signaltransduktion ausführen [91].

Beim PI3-Kinase/Akt-Signalweg wird die PI3-Kinase über Adapterproteine in den Bereich der phosphorylierten Tyrosinreste an der Innenseite der Zellmembran rekrutiert und durch Konformationsänderung aktiviert [755]. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das Bestandteil der Zellmembran ist, sodass Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) entsteht [755]. Die *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1* (PDK1) und der *Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) können PIP₃-abhängig Akt (auch Proteinkinase B genannt) an jeweils einer Schlüsselstelle phosphorylieren und so aktivieren [756]. In der Folge entfaltet Akt seine maximale Aktivität und phosphoryliert wiederum zahlreiche Substrate, u.a. Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Regulatoren kleiner G-Proteine, metabolische Enzyme und Regulatoren des Zellzyklus [756]. Dadurch wird in erster Linie eine wachstums- und proliferationsfördernde Wirkung erreicht; die Apoptose wird inhibiert, der Eintritt der Zelle in den Zellzyklus erleichtert [757].

Zu den wichtigsten Substraten von Akt gehören die *Glykogensynthase-Kinase 3* (GSK3), die proapoptotischen FOXO-Transkriptionsfaktoren und der *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2) [756]. Die Serin-/Threonin-Kinase GSK3 wirkt proapoptotisch, indem sie antiapoptotische Proteine so phosphoryliert, dass sie von Ubiquitinligasen erkannt und für den proteasomalen Abbau markiert werden, darunter Mcl-1, ein Mitglied der Bcl-2-Familie [758]. Außerdem markiert die GSK3 aber auch Cyclin D1 für den proteasomalen Abbau, wodurch ein Zellzyklusarrest begünstigt werden kann [759]. Durch Akt-vermittelte Phosphorylierung wird die GSK3 inaktiviert [756]. Akt kann in den Nukleus translozieren [760] und phosphoryliert dort unter anderem Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie, die so für den Export aus dem Zellkern markiert werden [761]. Somit werden deren proapoptotischen Zielgene (u.a. Bim, Puma, Fas-Ligand, TRAIL) weniger transkribiert [762]. Auch p21 ist ein Zielgen von FOXO-Transkriptionsfaktoren, wodurch

Akt wiederum den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus begünstigen kann [762]. Des Weiteren führt Akt-vermittelte Phosphorylierung von TSC2 zu dessen Inaktivierung [763]. TSC2 ist ein GTPase-aktivierendes Protein, das spezifisch für das kleine G-Protein Rheb ist [764]. Durch TSC2-vermittelten Austausch von GTP gegen GDP wird Rheb inaktiviert [765]. Rheb bindet direkt an den Proteinkomplex mTORC1 und ist für dessen Aktivierung essentiell [764]. Dieser Proteinkomplex aktiviert die Proteinbiosynthese durch Regulation der Translation und hat dadurch entscheidende Bedeutung für Zellwachstum und Anabolismus [766]. Darüber hinaus unterdrückt Akt die Apoptose durch inaktivierende Phosphorylierung des proapoptotischen Bcl-2-Proteins Bad, der Caspase 9, sowie der MAP-3K ASK1 [85]. Akt begünstigt den Abbau von I κ B, wodurch NF- κ B aktiviert wird, und stimuliert durch Phosphorylierung die Ubiquitinligase Mdm2, was zur Inaktivierung von p53 führt [85]. Über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg werden somit durch vielfältige Mechanismen Zellwachstum, -proliferation und -überleben gefördert; die Apoptose wird inhibiert.

ERBB2-Überexpression begünstigt über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg das Ausschleusen von p21 aus dem Zellkern [767] und verlängert die Lebensdauer von Cyclin D1 (siehe oben), wodurch es zu einem Wiedereintritt von Cisplatin-behandelten Tumorzellen in den Zellzyklus kommt, die dann erneut proliferieren [554]. So kann ERBB2-Überexpression Cisplatinresistenz begünstigen, ohne direkt an der Signaltransduktion von Cisplatin beteiligt zu sein [554]. Neben dem PI3-Kinase/Akt Signalweg aktiviert ERBB2 auch den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg durch Rekrutierung von GRB2 und SOS an die phosphorylierten Tyrosinreste an der Innenseite des Rezeptors [768], wodurch Ras aktiviert wird (siehe 1.3.5.3). Auch über diesen Signalweg kann ERBB2 somit Überlebenssignale und Cisplatinresistenz vermitteln.

ERBB2 hat große Bedeutung für die Entstehung, Diagnostik und Therapie von Mammakarzinomen [769]. In ca. 20% der Mammakarzinome ist ERBB2 überexprimiert [769]. Daneben kommt ERBB2-Überexpression auch in Magenkarzinomen, Ovarial- und Endometriumkarzinomen, NSCLC, Pankreas- und Harnblasenkarzinomen vor [770]. Inhibitoren von ERBB2/HER2 (z.B. Trastuzumab) sind eine seit vielen Jahren etablierte Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms; daneben werden sie auch in der Therapie des HER2-positiven Magenkarzinoms erfolgreich eingesetzt [771]. Es ist somit denkbar, Cisplatin-resistente Tumorzellen durch diese bereits gut erprobten Medikamente zu resensitivieren, wenn sich ERBB2-Überexpression als biologisch und klinisch relevanter Faktor für erworbene Cisplatinresistenz erweist. Bei NSCLC-Patienten ist hohe ERBB2-Expression mit schlechterem Ansprechen auf Cisplatin-basierte Chemotherapien assoziiert [772]. In Mamma- und Ovarialkarzinomzellen [773] sowie Magenkarzinomzellen [774] konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ERBB2-Überexpression Cisplatinresistenz begünstigt. In Zellkulturen ergaben sich Hinweise, dass ERBB2-Rezeptor-Antikörper eine Resensitivierung Cisplatin-resistenter Zellen bewirken können [773]. Bemerkenswerterweise geht ERBB2-Überexpression in Magenkarzinomzellen mit Epithelial-Mesenchymaler Transition einher, die durch zielgerichtete Therapien gegen

ERBB2 rückgängig gemacht werden kann [774]. Für Harnblasenkarzinome konnte klinisch gezeigt werden, dass ERBB2-Überexpression mit Resistenz gegenüber einer Cisplatin-basierten kombinierten Radiochemotherapie einhergeht [775], wobei unklar bleibt, ob dies eher auf Resistenz gegenüber der Strahlentherapie oder der Cisplatin-basierten Chemotherapie zurückzuführen ist. In einer klinischen Phase-II-Studie konnte kein Vorteil einer Kombinationstherapie von Cisplatin/Gemcitabin mit einem ERBB2-Antikörper nachgewiesen werden [776].

1.6.3 b) Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind Chaperone, die in Normalgeweben die Faltung und Stabilisierung, den Transport und den Abbau von Proteinen koordinieren [777]. Sie werden nach ihrem Molekulargewicht in Familien eingeteilt [778]. Hitzeschockproteine werden bei diversen Arten von zellulärem Stress erheblich hochreguliert; neben Hitze führen auch oxidativer Stress, Hypoxie, Inflammation, Malnutrition, mechanische Schädigung oder toxische Substanzen wie Chemotherapeutika zum vermehrten Auftreten falsch gefalteter oder degenerierter Proteinstrukturen in der Zelle [779]. In Reaktion auf zellulären Stress geben die Hitzeschockproteine ihre in ruhenden Zellen bestehende Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor HSF1 auf [780]. HSF1 transloziert in den Zellkern, bildet Trimere und fungiert in der Folge als Transkriptionsfaktor, was zur vermehrten Expression von Hitzeschockproteinen als Reaktion auf die zelluläre Stresssituation führt [781]. Darüber hinaus wird die Transkription zahlreicher weiterer Gene durch HSF1 reguliert [780].

Proteine der HSP90- und HSP70-Familie haben sich als besonders relevant für das Überleben und das Wachstum von Tumorzellen erwiesen [782]. Sie lagern sie sich an ungefaltete Proteine an, verhindern unerwünschte Interaktionen von ungefalteten Proteinen untereinander und helfen den ungefalteten Proteinen mithilfe von Co-Chaperonen, ihre korrekte Faltung anzunehmen [783]. Für ihre Funktion als Chaperone nutzen HSP90 und HSP70 die Hydrolyse von ATP als Energiequelle [783]. Außerdem sind sie am Transport von Steroidhormonrezeptoren in den Zellkern nach Bindung von deren Liganden entscheidend beteiligt [784].

Proteine der HSP90-Familie stabilisieren in Tumorzellen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie Proteine, die Überlebenssignale vermitteln, darunter ERBB2 und Akt (siehe 1.6.3 a) sowie ERK (siehe 1.3.5.3) [785]. Überexpression von HSP90 kann anfällige, instabile Proteine stabilisieren, darunter die Proteinprodukte mutierter Tumorsuppressorgene und Protoonkogene, sodass diese in den Tumorzellen trotz ihrer eigentlich reduzierten Stabilität vor dem Abbau geschützt werden [785]. Ein Beispiel hierfür ist mutiertes p53 [785]. Gleichzeitig kann HSP90 durch Aufrechterhalten der Tertiärstruktur von Proteasomen aber auch zum Abbau von Proteinen beitragen und so dysfunktionale Proteine beseitigen [786]. Proteine der HSP90-Familie sind an Autophagie-Prozessen beteiligt, bei denen dysfunktionale Proteine in Lysosomen abgebaut und

recycelt werden, wodurch die intrazelluläre Anhäufung von geschädigten Proteinen und so letztendlich auch die Apoptose verhindert wird [787].

Proteine der HSP70-Familie werden infolge von zellulärem Stress in den Zellkern transportiert [788]. Dort erleichtern sie die Reparatur von DNA-Schäden, indem sie DNA-Reparaturfaktoren stabilisieren, darunter ATM und ATR, DNA-PKcs, CHK1, BRCA1, BRCA2, RAD51 und FANCA [789]. Zudem konnte gezeigt werden, dass HSP70 im Zellkern mit PARP1 kolokalisiert ist [790]. Außerdem übt HSP70 antiapoptotische Funktion aus, indem es die Translokation von Bax in die Mitochondrienmembran verhindert [791]. Die Interaktion von HSP70 mit Apaf-1 und Procaspase 9 unterbindet außerdem deren Zusammenlagerung zum Apoptosom [792]. Somit können Hitzeschockproteine Cisplatinresistenz durch Inhibierung der Apoptose, Unterstützung von DNA-Reparaturmechanismen und verstärkte Autophagie begünstigen.

Sowohl HSP70- [793] als auch HSP90-Proteine [794] sind in Harnblasenkarzinomzellen häufig überexprimiert. Klinische Studien haben bislang keine oder nur eine geringe Wirksamkeit von HSP90-Inhibitoren als Monotherapie ergeben. HSP90-Inhibitoren führen *in vitro* jedoch zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin, u.a. in Kolon- [795], Magen- [796], Ösophagus- [797], und Ovarialkarzinomzellen [798] sowie Neuroblastom- und Osteosarkomzellen [799]; dies konnte in den Magenkarzinomzellen auch *in vivo* bestätigt werden. [800]. Die Therapie mit HSP90-Inhibitoren wird potentiell dadurch erschwert, dass über die HSF1-induzierte Stressantwort die Expression von HSP70 hochreguliert wird, was die Wirksamkeit von HSP90-Inhibitoren beeinträchtigen kann [801]. In Harnblasenkarzinomzellen verstärkt eine Kombination aus HSP70- und HSP90-Inhibition die Wirksamkeit von Cisplatin [802]. Für Harnblasenkarzinome haben sich sowohl *in vitro* [802-804] als auch *in vivo* [803, 804] Hinweise darauf ergeben, dass Kombination einer Cisplatintherapie [802, 803] bzw. Cisplatin-basierten Radiochemotherapie [804] mit Hitzeschockprotein-Inhibitoren den Therapieeffekt verbessern kann. Dies wird u. a. auf die Herunterregulierung des Akt- und des ERK-Signalwegs zurückgeführt [803]. Herunterregulierung von HSP70 durch RNA-Interferenz kann die Cisplatinempfindlichkeit von NSCLC-, Ovarialkarzinom-, Zervixkarzinom- und Osteosarkomzellen erhöhen [801]. Zudem können synthetische Inhibitoren von HSP70 Zervixkarzinomzellen *in vitro und in vivo* [805] sowie Melanom- und Kolonkarzinomzellen *in vitro* [806] gegenüber Cisplatin sensitivieren. Das antiinflammatorische Medikament Ibuprofen reguliert die Expression von HSF1 und konsekutiv von HSP70 herunter und kann so die Wirkung von Cisplatin in NSCLC-Zellen *in vitro* verstärken [807].

In der hier vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression von HSP90AA1 aus der HSP90-Familie und von HSPA1B aus der HSP70-Familie in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen mit der jeweiligen mRNA-Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen verglichen. Für HSPA1B konnte immunhistochemisch eine Überexpression bei Patienten mit Urothelkarzinomen nachgewiesen werden, die mit dem Grading und der Muskelinvasivität korreliert [86].

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, verschiedene Mechanismen erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen zu beleuchten. Dabei werden zwei Zelllinien verglichen, die sich morphologisch sowie in wesentlichen Gewebsmerkmalen unterscheiden. Die humane Zelllinie RT-112 wird stellvertretend für den epithelialen Phänotyp, J-82 stellvertretend für den mesenchymalen Phänotyp untersucht. Es wird evaluiert, wie sich die Resistenzmechanismen zwischen diesen beiden Zelllinien unterscheiden und welche Rolle die Epithelial-Mesenchymale Transition bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin spielt. Ein besonderer Fokus soll dabei auf den Resistenzmechanismen liegen, die in die DNA-Schadensantwort bzw. die nachfolgende Einleitung der Apoptose eingreifen. Deren Identifizierung ist von großer Relevanz für die Behandlung von muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen, bei denen Cisplatinresistenz ein entscheidendes Problem in der klinischen Behandlung darstellt. Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung von Inhibitoren der DNA-Schadensantwort könnten auf dieser Grundlage gezielte Therapieansätze entwickelt werden, um Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen zu überwinden.

2 Publierte Originalarbeit

Research Paper

Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin resistance of urothelial carcinoma cells

Annika Höhn¹, Katharina Krüger¹, Margaretha A. Skowron², Stefanie Bormann¹, Lena Schumacher¹, Wolfgang A. Schulz², Michèle J. Hoffmann², Günter Niegisch², Gerhard Fritz¹

¹Institute of Toxicology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225, Düsseldorf, Germany

²Department of Urology, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225, Düsseldorf, Germany

Correspondence to: Gerhard Fritz, **email:** fritz@uni-duesseldorf.de

Keywords: cisplatin, urothelial carcinoma, DNA damage response, DNA repair, cisplatin resistance

Received: October 07, 2015

Accepted: April 22, 2016

Published: May 12, 2016

ABSTRACT

Cisplatin (CisPt) is frequently used in the therapy of urothelial carcinoma (UC). Its therapeutic efficacy is limited by inherent or acquired drug resistance. Here, we comparatively investigated the CisPt-induced response of two different parental urothelial carcinoma cell lines (RT-112, J-82) with that of respective drug resistant variants (RT-112^R, J-82^R) obtained upon month-long CisPt selection. Parental RT-112 cells were ~2.5 fold more resistant to CisPt than J-82 cells and showed a different expression pattern of CisPt-related resistance factors. CisPt resistant RT-112^R and J-82^R variants revealed a 2–3-fold increased CisPt resistance as compared to their corresponding parental counterparts. Acquired CisPt resistance was accompanied by morphological alterations resembling epithelial mesenchymal transition (EMT). RT-112^R cells revealed lower apoptotic frequency and more pronounced G2/M arrest following CisPt exposure than RT-112 cells, whereas no differences in death induction were observed between J-82 and J-82^R cells. CisPt resistant J-82^R cells however were characterized by a reduced formation of CisPt-induced DNA damage and related DNA damage response (DDR) as compared to J-82 cells. Such difference was not observed between RT-112^R and RT-112 cells. J-82^R cells showed an enhanced sensitivity to pharmacological inhibition of checkpoint kinase 1 (Chk1) and, moreover, could be re-sensitized to CisPt upon Chk1 inhibition. Based on the data we suggest that mechanisms of acquired CisPt resistance of individual UC cells are substantially different, with apoptosis- and DDR-related mechanisms being of particular relevance. Moreover, the findings indicate that targeting of Chk1 might be useful to overcome acquired CisPt resistance of certain subtypes of UC.

INTRODUCTION

Bladder cancer is a frequent type of cancer worldwide. In most countries, the majority of bladder cancers are urothelial carcinoma (UC) [1]. Cisplatin (CisPt)-based therapeutic regimen are commonly used both in the perioperative (neoadjuvant, adjuvant) setting for muscle-invasive UC as well as in the palliative setting for recurrent or metastatic UC [2]. CisPt enters cells by passive diffusion as well as by help of transporters [3, 4]. Upon replacement of its chloride ligands by water, DNA adducts are formed by S_N2 mechanism (nucleophilic substitution) [5]. The vast majority (60–80%) of DNA adducts

generated by CisPt are DNA intrastrand crosslinks (GpG and ApG). Only 1–2% of the DNA crosslinks formed by CisPt are DNA interstrand crosslinks [6, 7]. Platinum-induced DNA crosslinks cause a substantial distortion of the DNA double helix, resulting in transcription and replication blockage [8, 9]. In consequence of stalled replication forks, DNA double-strand breaks (DSBs) can arise as secondary lesions [10]. DSBs are potent triggers of cell death [11] and can be repaired by DNA double-strand break repair (homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ)). The removal of CisPt-induced DNA crosslinks involves nucleotide excision repair (NER), including transcription-coupled

NER (TC-NER) [9]. The relevance of NER mechanisms for the tumor cell response to CisPt is highlighted by the fact that the expression of the NER factor ERCC1 predicts the therapeutic efficacy of CisPt in lung tumors [12, 13] and also seems to be of relevance for UC [14]. The efficacy of platinum-based therapy is limited by intrinsic or acquired drug resistance [15]. Factors that contribute to CisPt resistance are manifold and are poorly characterized for UC [16, 17]. Recently, mechanisms affecting resistance to CisPt have been classified according to their site of action as pre-, on-, post- and off-target [17], with drug transport, DNA repair, apoptosis and signal transduction at membranes, respectively, being representatives of these mechanisms.

Upon induction of DNA damage a highly complex cellular stress response program, known as the DNA damage response (DDR), is activated. It tightly controls cell cycle progression by activation of cell cycle checkpoints and fine-tunes mechanisms of DNA repair and cell death [18, 19]. Activation of the DDR is considered as an inducible barrier against early tumorigenesis [20, 21] and, moreover, to precede genomic instability in bladder cancer [22]. In case of error prone repair of DSBs, genomic instability of bladder carcinomas is favoured [23]. DSBs as well as replication- and transcription-blocking DNA lesions are particular efficient activators of the DDR. The PI3-like kinases ATM and ATR play key roles in the regulation of the DDR [24, 25]. These kinases phosphorylate numerous substrates, among others checkpoint kinases (e.g. Chk1, Chk2) and p53, which eventually affect survival or death of the damaged cell. The relevance of DDR mechanisms for the CisPt sensitivity of UC cells and, most importantly, for CisPt resistant variants, is largely unknown.

Urothelial cancer cells segregate into epithelial and mesenchymal subsets [26]. Therefore, we included both RT-112 and J-82 cells, which are described as UC cells of mainly epithelial- and mesenchymal-like phenotype, respectively [27, 28], in our study. To select CisPt resistant variants we took into account that the therapeutic regimen commonly used in CisPt-based anticancer therapy comprises repetitive treatment cycles, where CisPt is administered by infusion, intermitted by treatment free periods. Therefore, parental RT-112 and J-82 UC cells were selected for resistance by multiple pulse-treatments with CisPt followed by extended recovery periods. The aim of the study was to comparatively analyze CisPt resistant UC cell variants (RT-112^R and J-82^R) with their respective parental cell types regarding (i) DDR capacity, (ii) the expression of putative CisPt resistance factors as suggested by Galluzzi et al. [17] and (iii) the response to a subset of pharmacological modifiers of the DDR and DNA repair, including inhibitors of checkpoint kinases, which are promising novel anticancer compounds acting by selectively increasing replicative stress and cell death in malignant cells [29]. In doing so, we aimed to identify mechanisms that are of relevance

for acquired CisPt resistance of UC cells and, moreover, to figure out therapeutic options to overcome their CisPt resistant phenotype.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the CisPt response of the urothelial carcinoma cells RT-112 and J-82

In light of the fact that urothelial cancer cells can segregate into epithelial and mesenchymal subsets [26], RT-112 and J-82 cells, which are representative of epithelial- and mesenchymal-like UC cells, respectively [27, 28], were used in the present study. RT-112 cells differ from J-82 regarding morphology (Figure 1A) and a higher mRNA expression of the epithelial marker *E-cadherin* as well as a lower expression of the mesenchymal marker *vimentin* (Figure 1B) as expected. Proliferation rate was higher in RT-112 as compared to J-82 cells (Figure 1C). Analyzing the influence of CisPt on cell viability 24–72 h after CisPt pulse-treatment, we observed that RT-112 cells are 2–3-fold more resistant to moderate doses of CisPt than J-82 cells (Figure 1D–1F). This is reflected by IC₅₀/IC₈₀ values of 10.7 μM / 44.3 μM and 3.9 μM / 13.5 μM for RT-112 and J-82, respectively, as determined after a post-incubation period of 72 h by the Alamar blue assay (Figure 1F). This difference in drug sensitivity is not detectable anymore at very high CisPt doses of ≥ 80 μM (Figure 1D–1G). Measuring cell viability via an alternative method, i.e. the Neutral red assay, similar results were obtained (Figure 1G). Based on a recent report of Galluzzi et al. [17], who has classified putative CisPt resistance factors of tumor cells, we assembled a 96 well-based quantitative real-time (qRT) PCR array to comparatively analyze the mRNA expression of these factors in RT-112 and J-82 cells. The results of this analysis revealed large cell type-specific differences in the basal mRNA expression of both pre-, on-, post- as well as off-target factors [17]. In more detail, we observed a significantly stronger mRNA expression of *ATP7A*, *BRCA1*, *VDAC*, *Calpain*, *p53*, *Caspase 6* and *ERBB2* in RT-112 cells as compared to J-82 cells. By contrast, J-82 cells revealed an enhanced expression of *MT1A*, *XAF1*, *BCL2*, *DYRK1VB*, *HMOX1*, *GPX1* and *HSPA1B* as compared to RT-112 cells (Figure 2A, 2B). Analysing gene expression 72 h after treatment with the IC₅₀ of CisPt, we found upregulation of *GPX1* and *XAF1* concomitantly in both RT-112 and J-82 cells (Figure 2C, 2D). Notably, J-82 cells responded to CisPt treatment with the upregulation of various DNA repair-related factors (i.e. *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2*, *XRCC3*) (Figure 2D). This response was not found in RT-112 cells (Figure 2C). Taken together, the data show that both basal and CisPt-stimulated mRNA expression of factors affecting CisPt sensitivity [17] considerably vary between the two examined UC cell lines, indicating that the basal defence capacity of epithelial- and mesenchymal-like UC cells against CisPt-induced injury might be

different. This hypothesis needs future confirmation by analyzing the CisPt response of additional UC cell lines of epithelial or mesenchymal origin both *in vitro* and *in vivo*.

Selection of CisPt resistant UC cell variants

In order to elucidate which mechanisms contribute to acquired CisPt resistance of UC cells and having in mind the therapeutic regimen used in the clinic, RT-112

and J-82 cells were repeatedly pulse-treated twice a week (for each 4 h) with the corresponding IC_{50} of CisPt, followed by a recovery period of one week (Figure 3A). After a total selection time of 10 weeks, CisPt resistant RT-112^R and J-82^R cells were obtained (Figure 3B–3D). Measuring cell viability by the Alamar blue assay, the resistant variants revealed an about 3-fold increase in the IC_{50} as compared to the corresponding parental cells (Figure 3B–3D). Similar results were obtained using

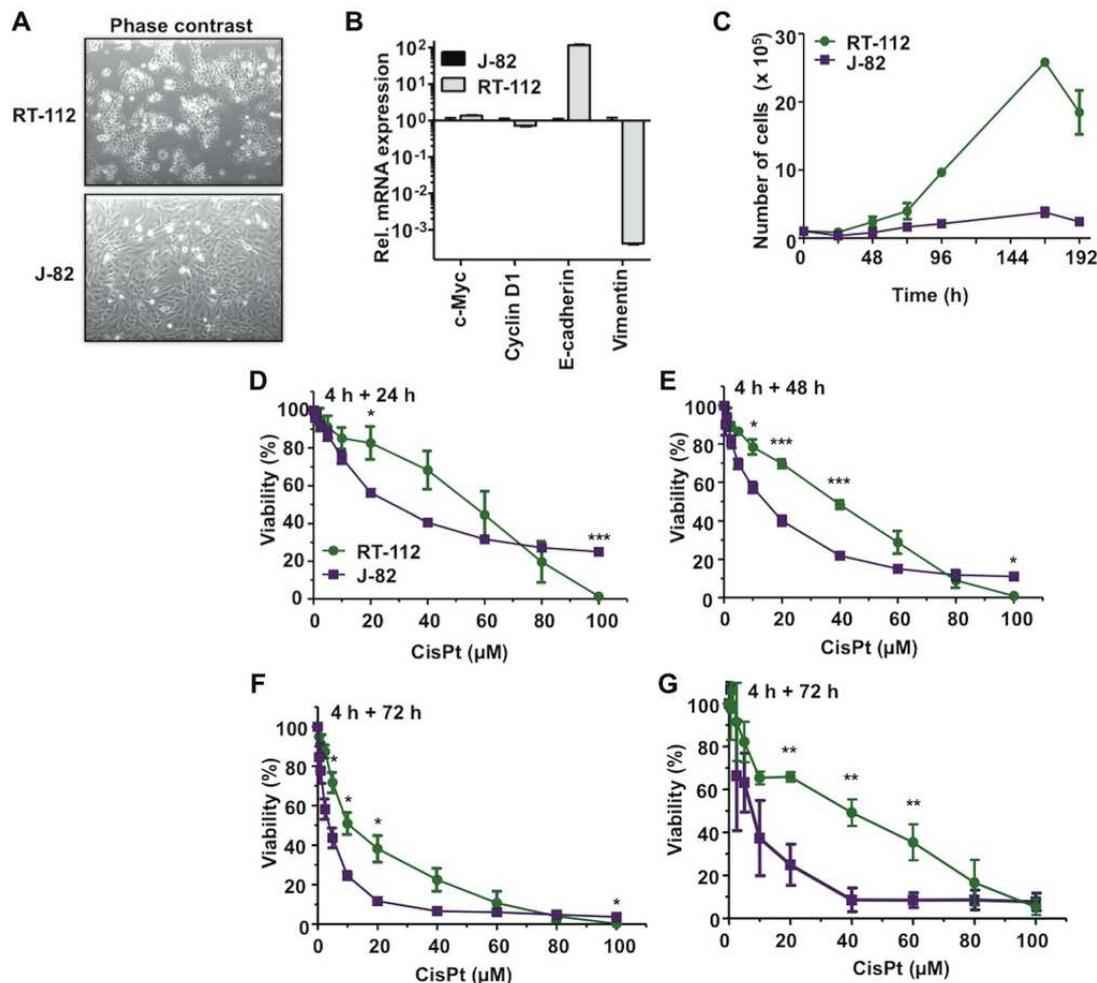


Figure 1: Differential CisPt sensitivity of urothelial carcinoma cells RT-112 and J-82. (A) Different morphology of RT-112 and J-82 cells. (B) Quantitative real-time PCR-based mRNA expression analysis (qRT-PCR) of epithelial (*E-cadherin*) and mesenchymal (*vimentin*) markers in J-82 and RT-112 cells. For control, mRNA expression of *c-Myc* and *CyclinD1* was analyzed as well. Relative mRNA expression in J-82 cells was set to 1.0. Data shown are the mean \pm SD from one experiment performed in triplicate. (C) Cell growth of RT-112 and J-82 cells was monitored by determining the number of cells over a total period of 8 days. Data shown are the mean \pm SD from two to three independent experiments each performed in duplicate. (D–G) Logarithmically growing cells were pulse-treated with different concentrations of cisplatin (CisPt) for 4 h. After post-incubation period of 24 h (D), 48 h (E) or 72 h (F, G) in the absence of CisPt, cell viability was analyzed using the Alamar blue assay (D–F) or the Neutral red assay (G). Data shown are the mean \pm SD from three independent experiments, each performed in triplicate. *statistical significance of RT-112 cells vs. J-82 cells. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

the Neutral red assay (data not shown). Gain of CisPt resistance was accompanied by morphological alterations, in particular cell enlargement and distinct cell protrusions (Figure 3B–3D). Both RT-112^R and J-82^R cells showed an increased mRNA expression of the intermediate filament vimentin (Figure 3C–3E) as compared to their respective parental cells. As vimentin expression represents a prototypical marker of mesenchymal cells, we hypothesize that the development of an EMT-like phenotype is favoured in epithelial-like RT-112 cells and is further promoted in J-82 cells during the selection of CisPt resistant UC cell variants. A coherence between EMT and acquired drug resistance was reported by

others [26, 30–32]. Flow cytometry-based analyses performed 72 h after CisPt treatment showed a reduction of apoptotic cell death in RT-112^R cells as compared to RT-112 (Figure 4A). This effect was only observed in RT-112^R cells (Figure 4A, upper panel) but not in J-82^R cells (Figure 4A, lower panel). Both RT-112^R and J-82^R cells were characterized by a more pronounced activation of G2/M checkpoint mechanisms as compared to their corresponding parental counterparts (Figure 4B). The data show that the mechanisms of acquired CisPt resistance differ between individual UC cell lines with protection from CisPt-induced apoptotic mechanisms and alterations in checkpoint control mechanisms being involved.

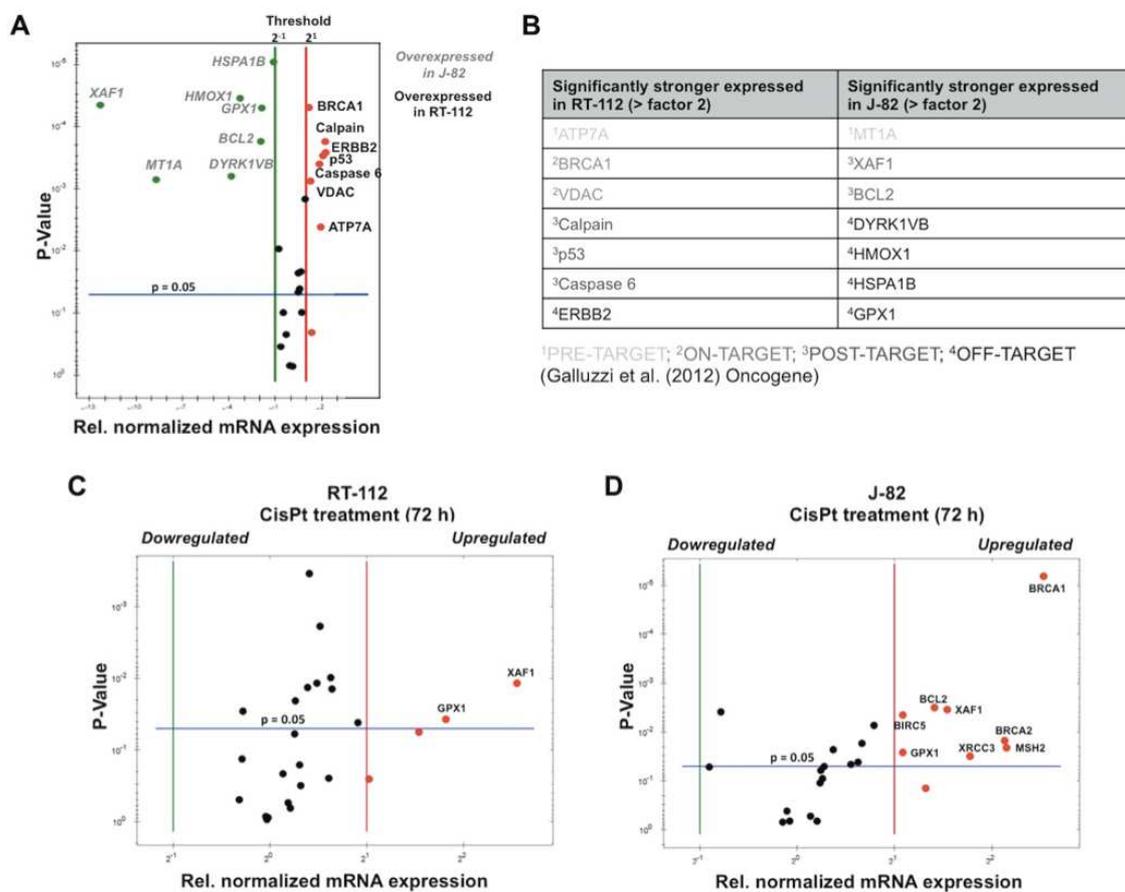


Figure 2: Basal and CisPt-induced mRNA expression of CisPt-related susceptibility factors in UC cells. (A) Basal mRNA expression of CisPt susceptibility factors [17] was analyzed by qRT-PCR analysis. The mean values shown are based on two independent experiments each performed in triplicate. Only differences in mRNA expression of ≤ 0.5 or ≥ 2.0 were considered as biologically relevant. (B) Variations in basal mRNA expression of factors related to CisPt resistance between RT-112 and J-82 cells are classified into mechanisms of pre-, on-, post- and off-target resistance according to Galluzzi et al. [17]. (C, D) mRNA expression of CisPt susceptibility factors was analyzed by qRT-PCR analysis 72 h after treatment with the IC_{50} of CisPt (according to Figure 1F). The mean values shown are based on a representative experiment performed in triplicate. Only differences in mRNA expression of ≤ 0.5 or ≥ 2.0 were considered as biologically relevant.

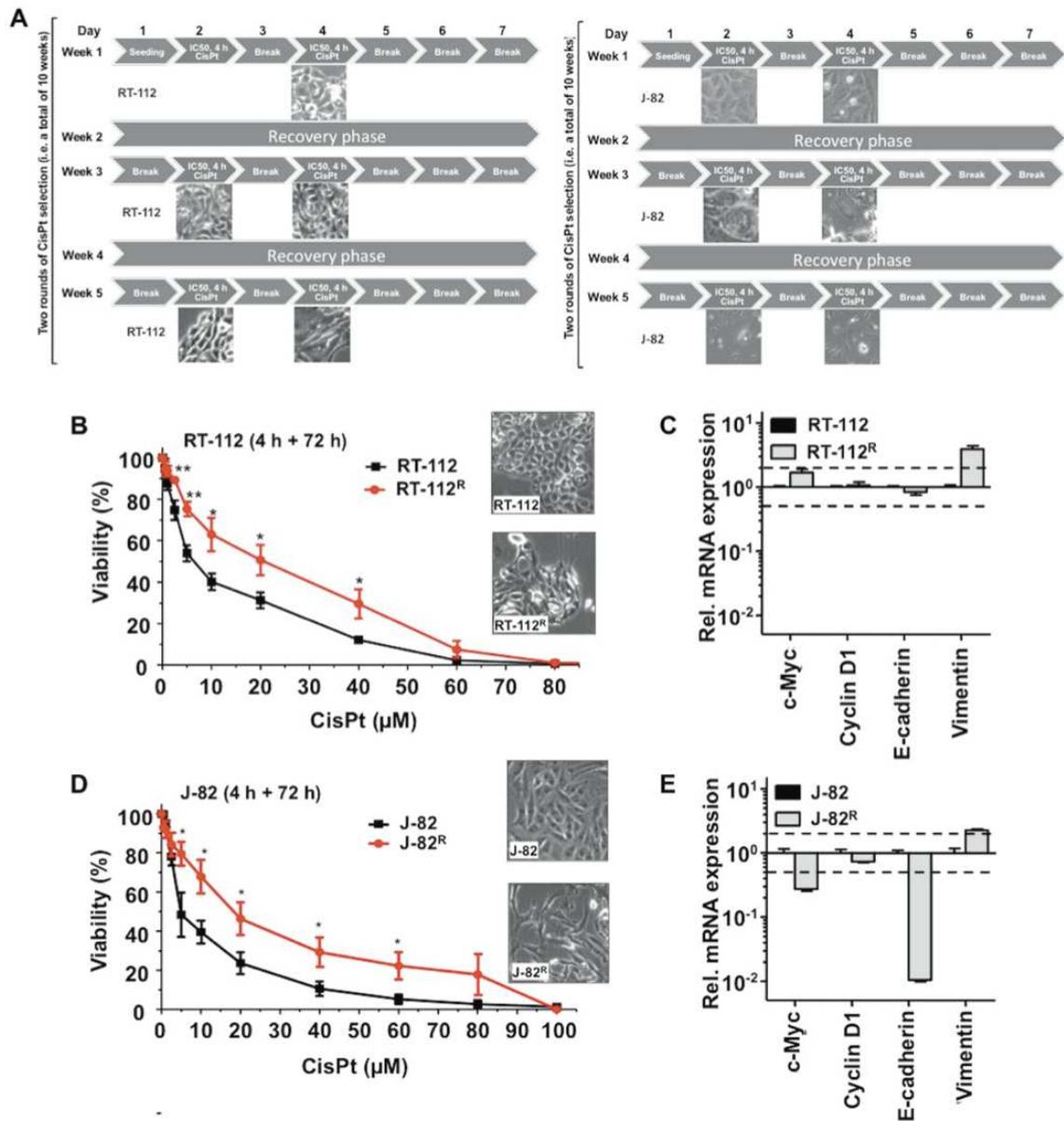


Figure 3: CisPt resistant UC cell variants obtained by long-term selection with CisPt display an intensified mesenchymal phenotype. (A) Schematic representation of the long-term CisPt selection scheme applied to RT-112 and J-82 cells. Cells were pulse-treated with the corresponding IC_{50} of CisPt (according to Figure 1F) twice a week, followed by a recovery period of one week. This selection scheme was performed over a total time period of 10 weeks (shown are only the first 5 weeks). (B, D) Cell viability of parental RT-112 and CisPt selected RT-112^R cells (B) or of parental J-82 and CisPt selected J-82^R cells (D) was measured 72 h after a 4 h pulse-treatment with different concentrations of CisPt using the Alamar blue assay. Data shown are the mean \pm SD from three independent experiments each performed in quadruplicate. The microscopic pictures illustrate the cell morphology of parental and CisPt resistant cells. *statistical significance of parental cells vs. CisPt resistant cells. ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$. (C, E) Alterations in the mRNA expression of marker genes of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in RT-112 versus RT-112^R cells (C) or J-82 versus J-82^R cells (E). The qRT-PCR based data shown are the mean \pm SD from triplicate determinations. *E-cadherin* is a representative marker of epithelial cells while *vimentin* is a prototypical marker of mesenchymal cells. For control, mRNA expression of *c-Myc* and *CyclinD1* were also determined.

Induction of DNA damage and activation of the DNA damage response (DDR) in parental and CisPt resistant UC cell variants

In order to measure the induction of DNA damage following CisPt treatment, ATM/ATR-catalyzed S139 phosphorylation of histone H2AX and the recruitment of 53BP1 to sites of damage were monitored by immunocytochemistry (Figure 5A–5B). Moreover, the level of CisPt-induced DNA intrastrand crosslinks was monitored by Southwestern analysis (Figure 5C–5D). The formation of nuclear γ H2AX foci and 53BP1 foci is part of the DNA damage response (DDR) and is believed to reflect predominantly the formation of DNA double-strand breaks (DSBs) [19]. Following CisPt treatment, DSBs are believed to be mainly generated

as secondary lesions from primary DNA platinum-adducts that stall replication forks [10]. As observed 4 h and 24 h after CisPt pulse-treatment for 4 h, we found a significant reduction in the number of DSBs in J-82^R cells, but not in RT-112^R cells (Figure 5A–5B). This finding indicates that CisPt resistance of J-82^R cells, but not of RT-112^R cells, might result from a reduced formation of highly cytotoxic DSBs and/or attenuated DDR following CisPt treatment. Bearing in mind that CisPt-induced DSBs mainly originate from primary Pt-(GpG) DNA adducts, we next monitored the formation of Pt-(GpG) intrastrand crosslinks by Southwestern blot analyses. The data show that DNA intrastrand crosslink formation was significantly lower in the J-82^R subline as compared to J-82 parental cells (Figure 5D). Based on these observations we suggest that acquired CisPt

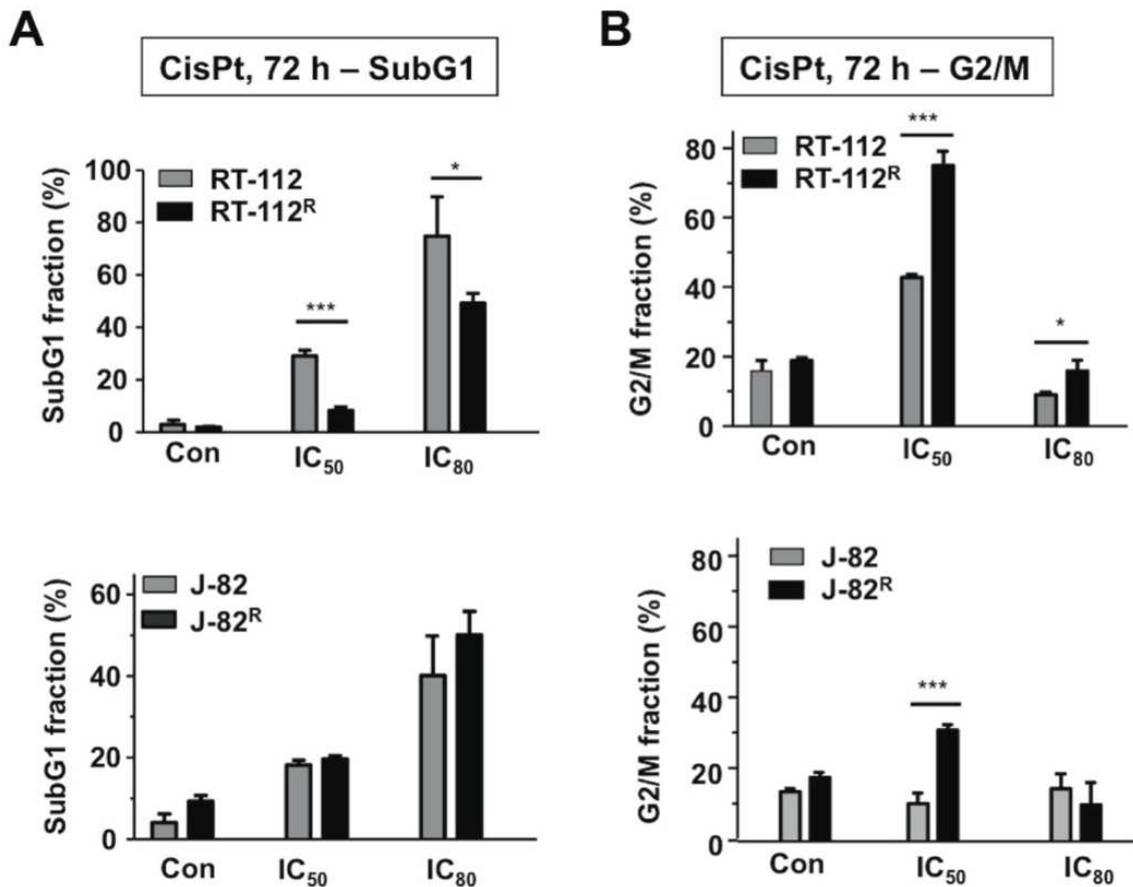


Figure 4: Effects of CisPt on cell cycle distribution of parental and CisPt resistant UC cells. (A, B) Parental (RT-112, J-82) and CisPt resistant (RT-112^R, J-82^R) UC cells were treated with the IC₅₀ or IC₈₀ of CisPt (according to Figure 1F). After incubation period of 72 h, subG1 fraction (A) and cells present in G2/M phase of the cell cycle (B) were determined by flow cytometry-based analyses. Data shown are the mean ± SD from three independent experiments each performed in duplicate. ***statistical significance of parental cells vs. CisPt resistant cells. ****p* ≤ 0.001; **p* ≤ 0.05.

resistance of J-82 cells involves a reduced formation of primary (i.e. Pt-(GpG) adducts) and secondary (i.e. DSBs) DNA damage following CisPt treatment. Mechanistically, it is feasible that pre-target resistance mechanisms such as transport or detoxification mechanisms take part [17]. In this context it is noteworthy that the level of CisPt-

induced Pt-(GpG) DNA intrastrand crosslinks is higher in parental J-82 cells as compared to RT-112 cells (Figure 5C) if the corresponding IC₅₀ and IC₈₀ were used. This finding indicates that the level of Pt-(GpG) intrastrand crosslinks does not necessarily predicts the level of cytotoxicity.

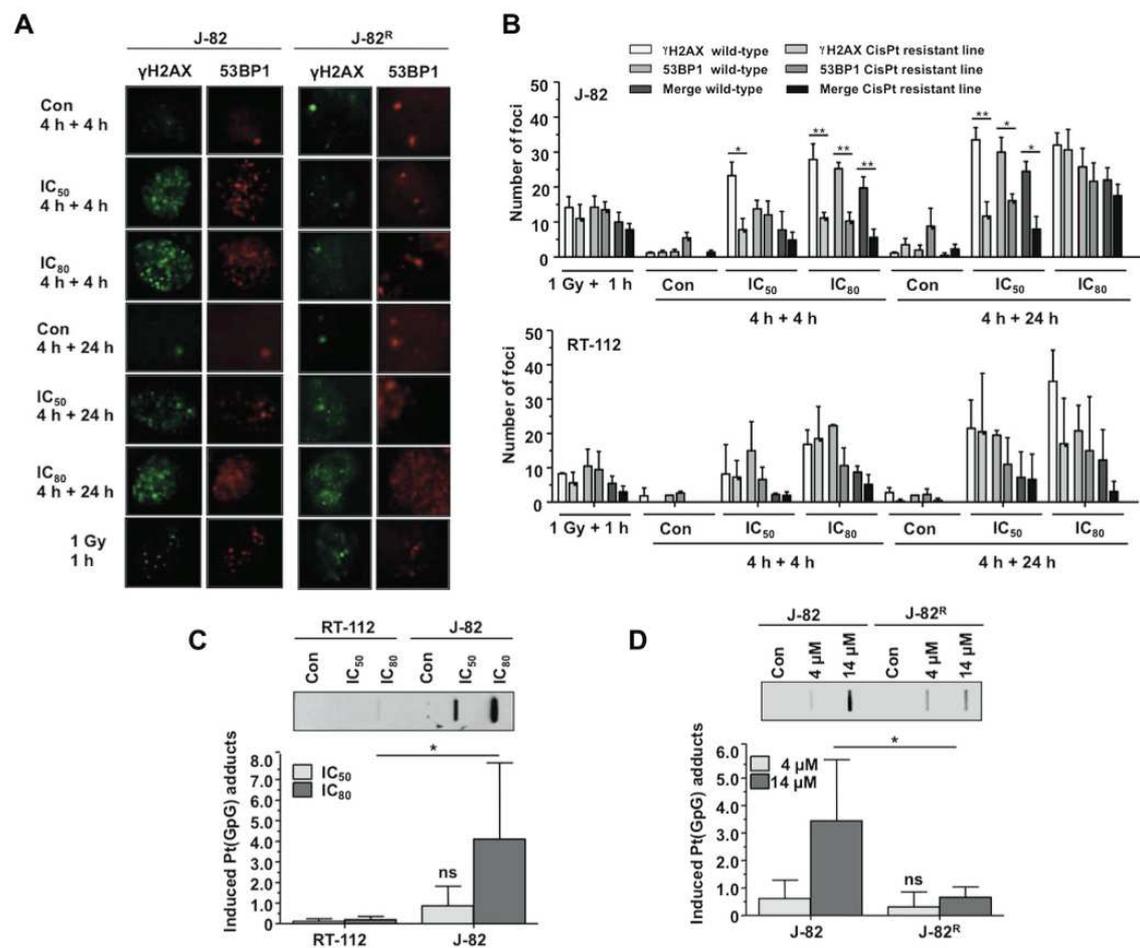


Figure 5: Formation and repair of DNA damage in parental UC cells and CisPt resistant UC variants. (A, B) Parental (RT-112, J-82) and CisPt resistant (RT-112^R, J-82^R) UC cells were pulse-treated for 4 h with the IC₅₀ or IC₈₀ of CisPt (according to Figure 1F) for 4 h. After a post-incubation period of 4 h or 24 h in the absence of CisPt, the formation of nuclear γ H2AX and 53BP1 foci was analyzed by immunocytochemistry. Data shown are the mean \pm SD from three independent experiments with each \geq 50 nuclei being analyzed per experiment. (A) representative microscopic pictures from J-82 and J-82^R cells. (B) histograms with quantitative data from J-82/J-82^R cells (upper panel) and RT-112/RT-112^R cells (lower panel). (C) RT-112 and J-82 cells were pulse-treated for 4 h with the IC₅₀ or IC₈₀ of CisPt (according to Figure 1F). The level of Pt-(GpG) intrastrand crosslinks was determined by Southwestern analyzes using an anti-Pt-(GpG)-specific antibody. Autoradiographies were analyzed densitometrically and the signal intensities of the untreated controls were subtracted. The upper part of the figure shows the result of a representative experiment. In the lower part, mean values \pm SD from two independent experiments each performed in triplicate are shown. Con, untreated control. *statistical significance of RT-112 versus J-82. ns, not significant. (D) Parental (J-82) and CisPt resistant cells (J-82^R) were pulse-treated for 4 h with the indicated CisPt dose. The level of Pt-(GpG) intrastrand crosslinks was determined by Southwestern analyzes using an anti-Pt-(GpG)-specific antibody. Autoradiographies were analyzed densitometrically and the signal intensities of the untreated controls were subtracted. The upper part of the figure shows the result of a representative experiment. In the lower part, mean values \pm SD from two independent experiments each performed in triplicate are shown. Con, untreated control. *statistical significance of J-82 versus J-82^R (**p* \leq 0.05). ns, not significant.

In a next step we comparatively analyzed the DDR of UC parental cells and corresponding CisPt resistant variants following CisPt treatment by Western blot analysis. The data obtained uncover large variations in the activation of DDR mechanisms already in J-82 versus RT-112 parental cells, as reflected on the levels of γ H2AX, p-Chk1, p-p53 and p-Kap1 (Figure 6A–6B). In general, J-82 revealed a more profound activation of the DDR than RT-112 cells. This is likely related to the higher level of Pt-(GpG) adducts in J-82 cells (see Figure 5C), resulting in stronger activation of DDR mechanisms. Comparative analyses of J-82 cells versus CisPt resistant J-82^R cells showed lower phosphorylation levels of H2AX, Chk1, p53 and Kap1 in the CisPt resistant variants (Figure 6A). Again, this is in line with the observed decrease in Pt-(GpG) DNA adducts and DSB formation described in J-82^R as compared to J-82 cells (see Figure 5). RT-112^R cells revealed a specifically increased phosphorylation of Chk1 as compared to RT-112 parental cells (Figure 6B). This is indicative of a selectively increased potency of RT-112^R

cells to activate checkpoint control mechanisms that might contribute to protection from CisPt induced apoptotic mechanisms (see Figure 4A).

Expression of CisPt susceptibility factors in CisPt resistant UC cells

Next, we analyzed the mRNA expression of CisPt-related susceptibility factors reported by Galluzzi et al. [17] in RT-112^R and J-82^R cells as compared to the corresponding parental cells. Regarding RT-112^R cells, we found a significant increase in the mRNA expression of metallothionein (*MT1A*) and the XIAP-associated factor 1 (*XAF1*) as compared to RT-112 cells (Figure 7B). In J-82^R cells we observed an elevated mRNA expression of the antioxidative factors heme oxygenase 1 (*HMOX1*) and glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) as well as of *XAF1* as compared to the corresponding controls (Figure 7A). Hence, the two types of CisPt resistant UC cell variants were characterized by an increased mRNA expression of

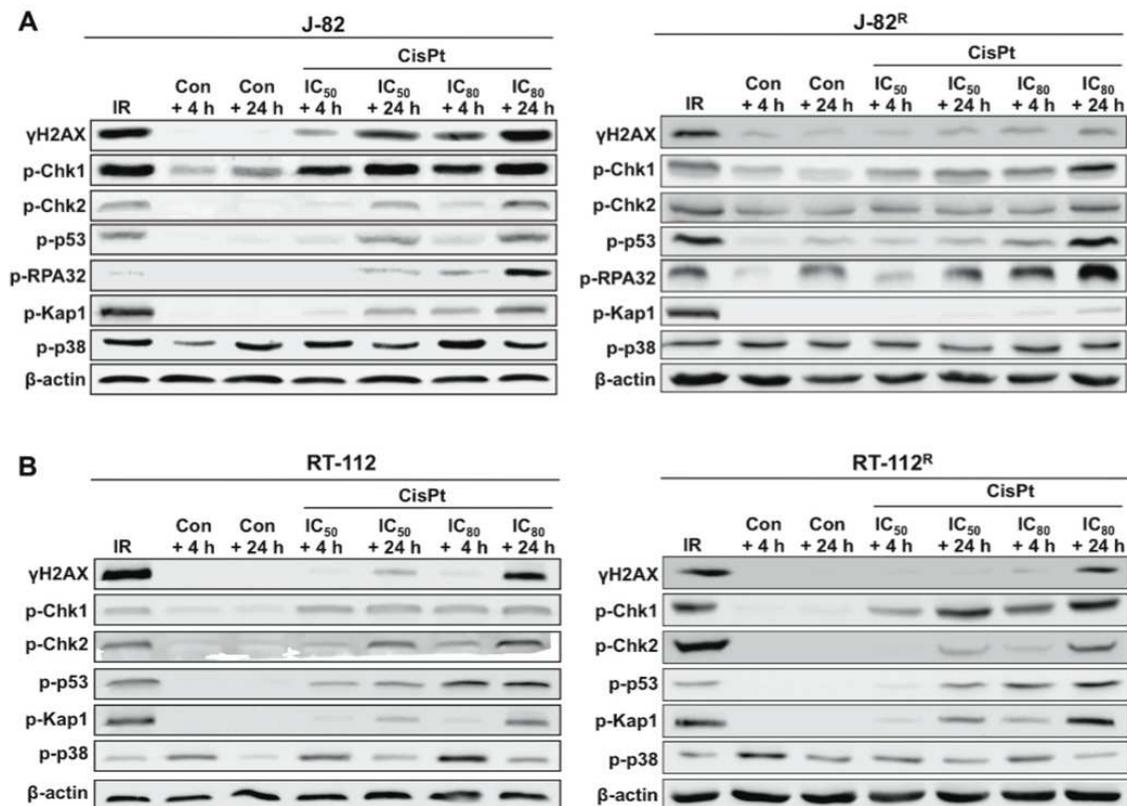


Figure 6: Comparative analyzes of CisPt-induced mechanisms of the DNA damage response (DDR) in parental and CisPt resistant cells. Parental (J-82 (A) and RT-112 (B)) and CisPt resistant (J-82^R (A) and RT-112^R (B)) cells were treated with the IC₅₀ or IC₈₀ of CisPt (according to Figure 1F) for 4 h. After post-incubation periods of 4 h or 24 h cells were harvested for Western blot analyses using phospho-specific antibodies as indicated. For control, cells were irradiated with 10 Gy (IR) and analysis was performed 1 h later. Data shown are representative of two independent experiments. Expression of β -actin was determined as protein loading control.

XAF1. In this context we would like to note that selection of CisPt resistant J-82 and RT-112 cells by a selection protocol using continuous treatment with increasing CisPt doses over a time period of 4 month also resulted in increased level of *XAF1* mRNA in CisPt resistant J-82 cells but not in RT-112 cells (Supplementary Figure S1). The finding of upregulated *XAF1* mRNA expression in drug resistant UC cell variants was unexpected considering that XAF1 is known to inhibit the anti-apoptotic factor XIAP, and hence is anticipated to promote cell death [33]. Correspondingly, high XAF1 level was suggested as predictive marker in pancreatic cancer associated with better overall survival [34]. Therefore, it appears possible that its increased mRNA expression in J-82^R cells accidentally correlates with CisPt resistance but is not causative for acquired CisPt resistance of UC cells. Alternatively, XAF1 might have a so far not yet described pro-survival function in CisPt resistant UC cells. In this context it is noteworthy that a cell cycle regulatory function has been suggested for XAF1 in gastrointestinal cancer, which rests on its interaction with Chk1 [35]. Interestingly enough induction of *XAF1* mRNA expression was also observed in both J-82 and RT-112 parental cells 72 h after CisPt addition (see Figure

2C–2D). So, forthcoming studies are clearly required to dissect the role of XAF1 in the response of UC cells to CisPt. In addition, the data indicate that the improvement of anti-oxidative capacity, as reflected by the upregulation of *HMOX1* and *GSTM1*, and increased expression of metallothionein *MT1A* might be of particular relevance for acquired CisPt resistance of some subtypes of UC. Bearing in mind that oxidative stress contributes to the cytotoxicity of CisPt [36, 37], upregulation of anti-oxidative mechanisms might be a meaningful cytoprotective strategy of UC cells, as is the upregulation of metallothioneins [38]. Noteworthy, upregulation of the mRNA expression of DNA repair factors (i.e. *BRCA1*, *BRCA2*, *ERCC1*, *MLH1*, *MSH2*, *XRCC3*), which are involved in the repair of CisPt-induced DNA damage, was not observed in the CisPt resistant variants.

J-82^R cells show enhanced sensitivity to a Chk1 inhibitor

In search of pharmacological approaches to overcome acquired CisPt resistance of J-82^R cells, we examined their sensitivity to a selected subset of

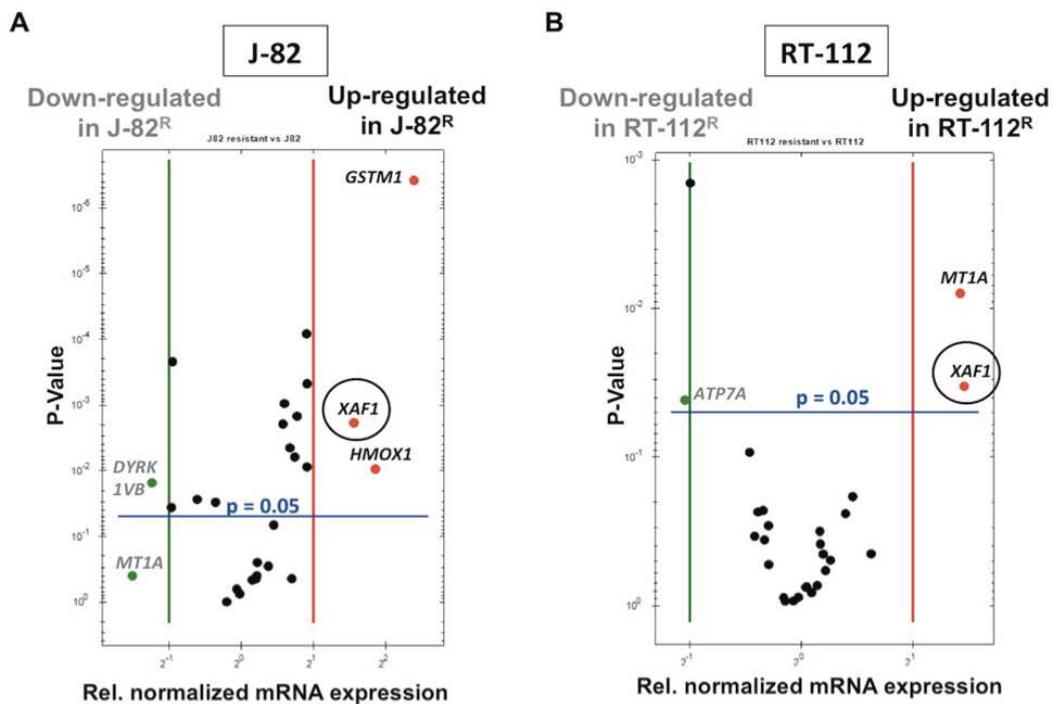


Figure 7: Alterations in gene expression that go along with acquired CisPt resistance of epithelial- and mesenchymal-like UC cells. Alterations in the mRNA expression of selected subset of CisPt-related susceptibility factors [17] was analyzed in drug resistant J-82^R (A) and RT-112^R cells (B) as compared to the corresponding parental cells by qRT-PCR. Relative mRNA expression in parental J-82 cells was set to 1.0. Only alterations in gene expression of ≤ 0.5 or ≥ 2.0 between wild-type (J-82 and RT-112) and CisPt resistant variants (J-82^R and RT-112^R) were considered as biologically relevant. Shown are the genes that are either up- or downregulated in CisPt resistant cells as compared to the parental cells.

Table 1: Influence of selected pharmacological modulators of the DNA damage response (DDR) and of DNA repair factors on the viability of parental and CisPt resistant J-82 cells

Inhibitor	Dose	Cell line	
		J-82	J-82 ^R
AZD-7762	IC ₅₀	1.2 μM	0.7 μM
	IC ₈₀	4.4 μM	1.8 μM
LY2603618	IC ₅₀	2.82 μM	0.54 μM
	IC ₈₀	9.85 μM	1.63 μM
MK-1775	IC ₅₀	0.92 μM	0.47 μM
	IC ₈₀	3.1 μM	1.7 μM
VE-822	IC ₅₀	~ 10 μM	> 10 μM
Roscovitine	IC ₅₀	25 μM	35 μM
Sorafenib	IC ₅₀	9 μM	> 10 μM
RI-1	IC ₅₀	150 μM	140 μM
Olaparib	IC ₅₀	375 μM	347 μM
Lovastatin	IC ₅₀	26 μM	> 30 μM

J-82 cells and the CisPt resistant subline (J-82^R) were treated with different concentrations of the pan Chk inhibitor AZD-7762, the Chk1-specific inhibitor LY2603618, the Wee1 kinase inhibitor MK-1775, the ATM/ATR inhibitor VE-822, the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine, the Raf kinase inhibitor sorafenib, the Rad51 inhibitor RI-1, the PARP-1 inhibitor olaparib or the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin. After an incubation period of 72 h hours, cell viability was analyzed using the Alamar blue assay. Listed are the resulting IC₅₀ and IC₈₀ from 2–3 three independent experiments, each performed in quadruplicate.

pharmacological inhibitors. Unfortunately, these analyses could not be performed with RT-112^R cells because their CisPt resistant phenotype turned out as not stable and got lost upon freezing. For these analyses inhibitors of the DDR-related kinases ATM/ATR (VE-822) as well as of checkpoint (Chk) kinases (AZD-7762 (Chk1 and Chk2 inhibitor) and LY2603618 (Chk1-specific inhibitor)) and Wee1 kinase (MK-1775) were included. Noteworthy, targeting of ATR/Chk1-regulated replicative stress responses of tumor cells has recently been suggested as a novel therapeutic strategy [29]. As additional candidate inhibitors we analyzed the impact of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor roscovitine, the multikinase inhibitor sorafenib, which is frequently used as anticancer drug in the clinic, as well as of inhibitors of the DNA repair proteins RAD51 (RI-1) and PARP-1 (olaparib) on the viability of parental J-82 versus resistant J-82^R cells. As a further candidate inhibitor we employed lovastatin, because statins have been shown to exhibit anticancer activity in various preclinical model systems [39] and are discussed to overcome acquired drug resistance to doxorubicin in neuroblastoma cells [40].

J-82^R cells turned out to be slightly more sensitive to treatment with the pan Chk inhibitor AZD-7762 (Figure 8A) and showed a significantly enhanced

sensitivity to the Chk1-specific inhibitor LY2603618 as compared to parental cells (Figure 8B). The J-82^R cells also revealed a tendentially enhanced sensitivity to the Wee1 kinase inhibitor MK-1775 (Figure 8C) but not to the CDK inhibitor roscovitine (Figure 8D). The pronounced loss of cell viability of J-82^R cells following Chk1 inhibition seems to be specific as it was not observed upon inhibition of ATM/ATR kinase or the DNA repair factors RAD51 and PARP-1 (Table 1). Pre-treatment of J-82^R cells with low non-toxic concentration of Chk inhibitors increased their sensitivity to CisPt (Figure 8E–8F), indicating that targeting of Chk might be particular useful to overcome acquired CisPt resistance of some subtypes of UC cells. Whether targeting of Chk is equally effective in epithelial and mesenchymal-like UC cells remains to be elucidated in forthcoming studies. Noteworthy, Chk inhibition was reported to overcome CisPt resistance of head and neck cancer cells [41] as well as of clear cell carcinoma of the ovary [42] *in vitro*, supporting the hypothesis that targeting of Chk might be a useful approach to deal with acquired CisPt resistance of different types of tumor cells. Taken together, our data support the current view that increasing replicative stress in tumor cells might be a promising therapeutic strategy also in UC [29]. In fact, the antitumor potency of Chk1 inhibitors is currently investigated in

clinical trials. Whereas AZD-7762 revealed unacceptable cardiotoxicity [43], SCH-900776 seems to be better tolerated in humans [44].

Taken together the data show that different molecular mechanisms are involved in acquired resistance of different types of UC cells to CisPt. Apparently, molecularly different sets of CisPt defence programs can become activated in individual UC cells. We hypothesize that acquired CisPt resistance in (epithelial-like) RT-

112 cells might be preferentially related to protection from pro-apoptotic mechanisms, whereas gain of CisPt resistance in (mesenchymal-like) J-82 UC cells seems to be characterized by a lower level of CisPt formed DNA damage and attenuated DDR. Mechanisms of transport and DNA repair seem to be of minor relevance for acquired CisPt resistance of UC cells. Hence, therapeutic targeting of apoptosis- and/or DDR-related mechanisms are suggested as preferential to overcome acquired

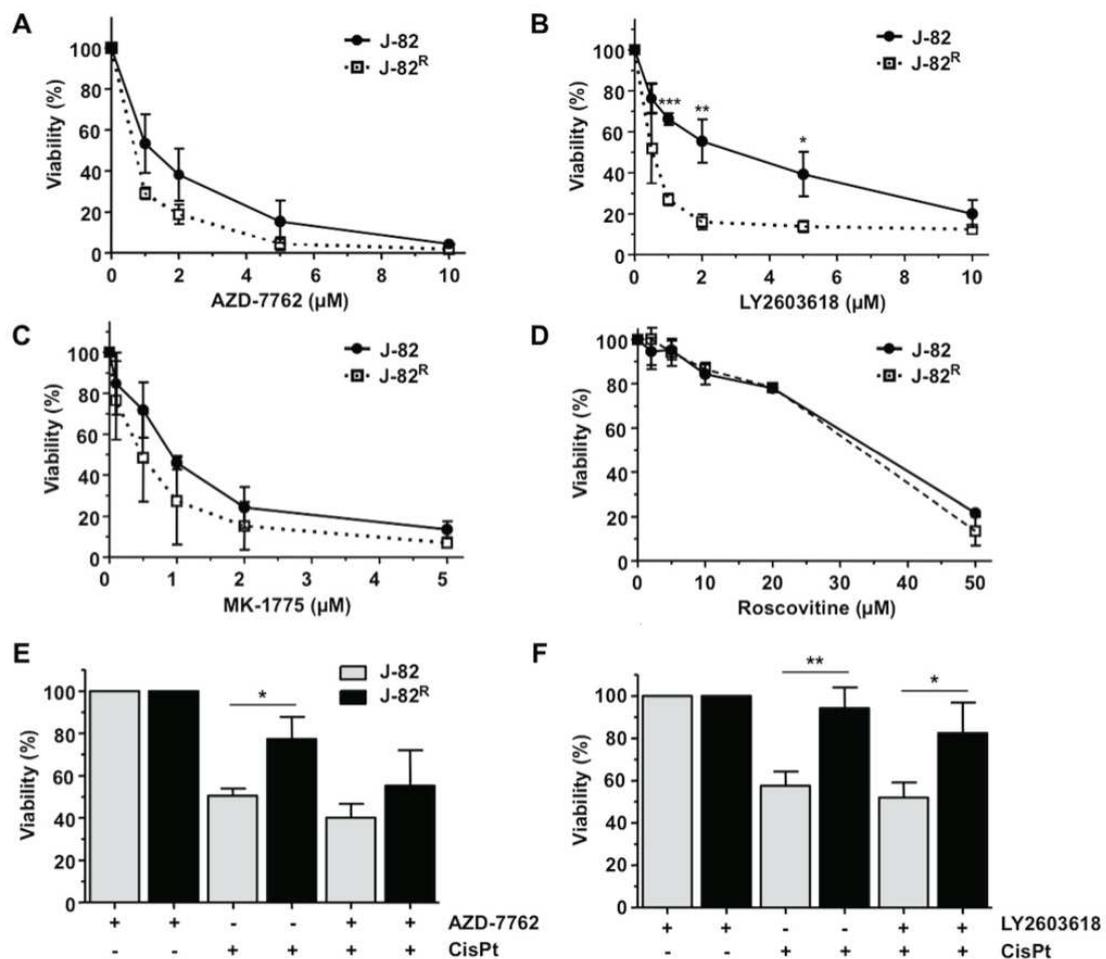


Figure 8: Influence of selected protein kinase inhibitors on the viability of CisPt resistant J-82^R cells. (A–D) J-82 cells and CisPt resistant cells (J-82^R) were treated with different concentrations of the pan Chk inhibitor AZD-7762 (A), the Chk1-specific inhibitor LY2603618 (B), the Wee1 kinase inhibitor MK-1775 (C) or the cyclin dependent kinase inhibitor roscovitine (D). After an incubation period of 72 h in the presence of the corresponding inhibitor, viability was analyzed using the Alamar blue assay. Data shown are the mean ± SD from three independent experiments, each performed in quadruplicate. *statistical significance of parental cells vs. CisPt resistant cells. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$. (E–F) J-82 parental and CisPt resistant cells (J-82^R) were pre-treated with 0.4 μM of the pan Chk inhibitor AZD-7762 (E) or the Chk1-specific inhibitor LY2603618 (F) for 1 h followed by the addition of CisPt (2 μM). After further incubation period of 72 h in the absence of the Chk inhibitor, cell viability was analyzed using the Alamar blue assay. Relative viability in the corresponding inhibitor-only treated controls was set to 100%. Data shown are the mean ± SD from three independent experiments, each performed in quadruplicate. *statistical significance of parental cells vs. CisPt resistant cells. ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$.

CisPt resistance in UC. Importantly, inhibitors of Chk might be useful to handle CisPt resistance in UC cells. Forthcoming *in vivo* studies are required to scrutinize the potency of Chk1 specific inhibitors to work against the non-responsiveness of urothelial carcinoma cells to CisPt-based anticancer therapy in a clinically relevant setting.

MATERIALS AND METHODS

Materials

RT-112 and J-82 urothelial carcinoma cells originate from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ) (Braunschweig, Germany). Cisplatin was obtained from the pharmaceutical department of the University Hospital Düsseldorf and originates from TEVA (Ulm, Germany). The following antibodies were used: antibodies detecting Ser139 phosphorylated histone H2AX (γ H2AX), H2AX (Millipore (Billerica, MA, USA)), β -actin (Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)), 53BP1, p-p53, p-Chk1, p-p38 (Cell Signaling (Denvers, MA, USA)), p-Chk2 (Abcam (Cambridge, UK)), p-RPA32 and p-KAP1 (Bethyl Laboratories (Montgomery, AL, USA)). The antibody detecting GpG intrastrand crosslinks induced by CisPt was generously provided by J. Thomale (Essen, Germany) and has been described before [30]. The fluorescent antibodies Alexa Flour 488 and 546 were obtained from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Rockland (Gilbertsville, PA, USA). ATM/ATR inhibitor VE-822 (CatNo: S7102) and Wee1 kinase inhibitor MK-1775 (CatNo: S1525) were obtained from Selleckchem (Munich, Germany), lovastatin (CatNo: M2147), cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine (CatNo: R7772) and the pan (i.e. Chk1 and Chk2) checkpoint kinase (Chk) inhibitor AZD-7762 (CatNo: SMLO350) from Sigma Aldrich Life Science (Darmstadt, Germany), Rad51 inhibitor RI-1 (CatNo: 553514) from Calbiochem (San Diego, CA, United States), Chk1-specific inhibitor LY2603618 (CatNo: A8638) and PARP-1 inhibitor olaparib (CatNo: A4154) are from Apexbio (Houston, TX, USA) and the Raf kinase inhibitor sorafenib was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Germany) (CatNo: Sc-220125).

Cell culture

RT-112 and J-82 cells were grown in DMEM (Sigma (Steinheim, Germany)) containing 10% of fetal calf serum (FCS) (PAA Laboratories (Cölbe, Germany)) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma (Steinheim, Germany)) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. If not stated otherwise, treatments of logarithmically growing cells were performed 24 h after seeding.

Determination of cell viability

Cell viability was determined using the Alamar blue assay [45]. In this assay, viable cells are detectable by their ability to effectively metabolize the non-fluorescent dye resazurin (Sigma, Steinheim (Germany)) to fluorescent resorufin. Cells were incubated for 1.5 h with the resazurin solution (final concentration 40 μ M) before fluorescence was measured (excitation: 535 nm, emission: 590 nm, 5 flashes, integration time: 20 μ s). Relative viability in the untreated controls was set to 100%. In addition, cell viability was also determined by use of the Neutral red assay [46]. In this assay, viable cells accumulate the red dye 2-methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazine in lysosomes, whereas dead cells are unable to do so. Thus, the staining intensity is directly proportional to the number of viable cells. For this assay, cells were incubated for 1.5 h with the neutral red solution (Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)) (final concentration 0.1 mg/ml) before fixation with 1% formaldehyde. Afterwards the dye was extracted with 50% ethanol and absorption was measured at 550 nm. Relative viability in the untreated controls was set to 100%.

Flow cytometry-based analysis of cell cycle distribution and cell death

Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Adherent cells were trypsinized and combined with the medium that contains floating cells. After centrifugation (800 \times g, 5 min, RT), cell pellet was washed and resuspended in PBS. Afterwards, the cells were fixed with ice-cold ethanol (-20°C , ≥ 20 min). After centrifugation (800 \times g, 5 min, 4°C) the supernatant was discarded. The cells were resuspended in PBS containing RNase A (Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)) (1 μ g/ μ l) and incubated for 1 h at RT. After adding of propidium iodide (Sigma (Steinheim, Germany)) cells were subjected to flow cytometric analysis (Becton Dickinson (Heidelberg, Germany)). The SubG1 fraction was considered as a measure of dead (apoptotic) cells.

Analysis of DNA damage induction

The formation of DNA double-strand breaks (DSBs) was investigated by measuring the level of S139 phosphorylated H2AX (γ H2AX), which is a surrogate marker of DNA damage [47, 48], by Western blot analysis or by immunocytochemistry-based detection of nuclear γ H2AX and 53BP1 foci. For immunocytochemical analysis, the cells were seeded onto coverslips. After treatment the cells were fixed with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) (MERCK (Darmstadt, Germany)) (15 min, RT) and incubated with ice-cold methanol (over night, -20°C). After blocking (1.5 h, RT; blocking solution: 5% BSA in PBS/0.3% Triton X-100,

incubation with γ H2AX antibody (mouse) and 53BP1 antibody (rabbit) was performed (1:500, over night, 4°C), followed by further washing with PBS/0.3% Triton X-100 and addition of the secondary fluorescence-labelled antibody (1:500, 1 h, RT, in the dark). After washing, the cells were mounted in Vectashield (Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)) containing DAPI. Nuclear γ H2AX and 53BP1 foci were counted by microscopical analysis using an Olympus BX43 fluorescence microscope and the number of co-localized γ H2AX and 53BP1 foci was calculated.

The level of Pt-(GpG) DNA intrastrand crosslinks was monitored by Southwestern blot analysis. To this end, genomic DNA was isolated using the "DNeasy Blood and Tissue" kit (Qiagen (Hilden, Germany)). The concentration and purity of the DNA was measured photometrically (NanoVue™Plus (GE Healthcare, UK)). 0.5 μ g of the DNA was diluted in 100 μ l of TE buffer, denatured by heating (10 min, 95°C) and cooled on ice. Afterwards, 100 μ l ice-cold ammonium acetate (2 M) was added. A nitrocellulose membrane was soaked in 1 M ammonium acetate and fixed into a slot-blot apparatus (Roth (Karlsruhe, Germany)). The DNA was transferred onto the membrane by use of a vacuum pump. After washing with 1 M ammonium acetate and water, the membrane was incubated with $5 \times$ SSC ($10 \times$ SSC: 1.5 M NaCl, 150 mM sodium citrate, pH 7.0) for 5 min and baked for 2 h at 80°C before it was blocked in 5% non-fat milk in TBS/0.1% Tween 20 over night at 4°C. Incubation with the primary antibody directed against Pt-(GpG) intrastrand crosslinks (1:200) [49] was conducted for 1 h at RT, followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rat IgG secondary antibody (1:2000, 2 h, RT). Visualization of the Pt-(GpG) intrastrand crosslinks was done by chemiluminescence and autoradiographies were densitometrically analyzed. Additionally, the membrane was stained with methylene blue (MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA)) to ensure equal DNA loading.

Western blot analysis

The activation status of the DNA damage response (DDR) machinery was investigated by Western blot analysis employing a set of phospho-specific antibodies, which detect prototypical factors that become activated by phosphorylation in the course of the DDR. Total cell extracts were obtained by lysing an equal number of cells in Roti®-Load buffer (Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany)) (5 min, RT). After sonication (EpiShear™ Probe sonicator, Active Motif (La Hulpe, Belgium)) proteins were denatured by heating (5 min, 95°C) and separated by SDS-PAGE (12.5% gel). Subsequently, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare (Little Chalfont, UK)) via the Protean Mini Cell System (BioRad (München, Germany)). After blocking in 5% non-fat milk in TBS/0.1% Tween 20

(MERCK (Darmstadt, Germany)) (2 h, RT), the membrane was incubated with the corresponding primary antibody (1:1000, over night, 4°C). After washing with TBS/0.1% Tween 20 the secondary (peroxidase-conjugated) antibody was added (1:2000, 2 h, RT). For visualization of the bound antibodies the Fusion FX7 imaging system (PeqLab (Erlangen, Germany)) was used.

Quantitative real-time PCR-based mRNA expression analyses

Putative markers of CisPt susceptibility were selected on the basis of a recent review by Galluzzi et al. [17] who has classified putative CisPt resistance factors of tumor cells into mechanisms of pre-, on-, post- and off-target. Based on this report we assembled a 96 well-based quantitative real-time (qRT) PCR array to analyze the mRNA expression of these factors in RT-112 und J-82 cells. In addition, mRNA expression of the epithelial marker *E-cadherin* as well as the mesenchymal marker *vimentin* and the proliferation factors *c-Myc* and *cyclinD1* was analyzed by qRT-PCR. Total RNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen (Hilden, Germany)). The reverse transcriptase (RT) reaction was performed by use of the OmniScript Kit (Qiagen) with 2000 ng of mRNA. For each PCR reaction 40 ng of cDNA and 0.25 μ M of the corresponding primers (Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Germany)) were used. Quantitative real-time PCR analysis was performed in triplicates employing the QPCR-SYBR Green Fluorescein Mix (Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany)) and a CFX96 Real-Time System (BioRad (Munich, Germany)) with the Bio-Rad CFX Manager 3.1 software. PCR runs (35–40 cycles) were done as follows: 95°C – 10 min; 95°C – 15 s; 60°C – 30 s; 72°C – 40 s; 72°C – 10 min. At the end of the runs, melting curves were analyzed to ensure the specificity of the amplification reaction. mRNA levels of *β -actin*, *GAPDH*, *PPIA*, *RPL32* and *18S* were taken for normalization. If not stated otherwise, relative mRNA expression of untreated control cells was set to 1.0.

Statistical analysis

For statistical analysis the unpaired two-tailed Student's *t*-test was applied using the GraphPad Prism 5.01 software. *p*-Values ≤ 0.05 were considered as significant and were marked with an asterisk.

Highlights

Expression of CisPt specific resistance factors differs between urothelial carcinoma cells lines

Selection of CisPt resistant UC cell variants promotes an EMT-like phenotype

Acquired CisPt resistance of epithelial-like RT-112 UC cells is related to a lower frequency of apoptosis

CisPt resistant mesenchymal-like J-82 UC cells are characterized by reduced formation of DNA damage and attenuated DDR

Acquired CisPt resistance is reversible by pharmacological inhibition of Chk1.

Abbreviations

53BP1, 53 binding protein 1; ApG, adenine-guanine; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATP7A, copper-extruding P-type ATPase; ATR, ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related; BCL2, B-cell/lymphoma 2; BIRC5, Survivin; BRCA, breast cancer; Chk, checkpoint kinase; CisPt, cisplatin; DDR, DNA damage response; DSBs, DNA double-strand breaks; DYRK1VB, dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1B; ERBB2, oncogenic EGFR-like receptor; Ercc1, excision repair cross complementing gene 1; EMT, epithelial mesenchymal transition; GpG, guanine-guanine; GPX1, glutathione peroxidase 1; GSTM1, glutathione S-transferase type M1; HMOX1, heme oxygenase type 1; H2AX, histone H2AX; γ H2AX, S139 phosphorylated H2AX; HSPA1B, heat shock protein 1B; IR, ionizing radiation; Kap1, KRAB-associated protein 1; MSH2, mutS homolog 2; MT1A, metallothionein 1A; NER, nucleotide excision repair; RT, reverse transcriptase; TC-NER, transcription-coupled NER; PARP-1, poly (ADP-ribose) polymerase 1; RPA32, replication protein A2; UC, urothelial carcinoma; UC, urothelial carcinoma; VDAC, voltage-dependent anion channel; Wee1, nuclear protein tyrosine kinase regulating G2 checkpoint; XAF1, Xiap-associated factor 1; XRCC3, X-ray repair cross-complementing gene 3.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the „Strategischer Forschungsfond (SFF)“ of the Heinrich Heine University Düsseldorf. M. Skowron was supported by a fellowship of the Duesseldorf School of Oncology (funded by the Comprehensive Cancer Centre Düsseldorf/ Deutsche Krebshilfe and the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf). We thank Lena Schumacher for excellent technical support, Jürgen Thomale for providing the Pt-(GpG) adduct specific antibody and Christian Henninger for optimizing quantitative real-time PCR.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll, Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 2006; 27: 361–373.

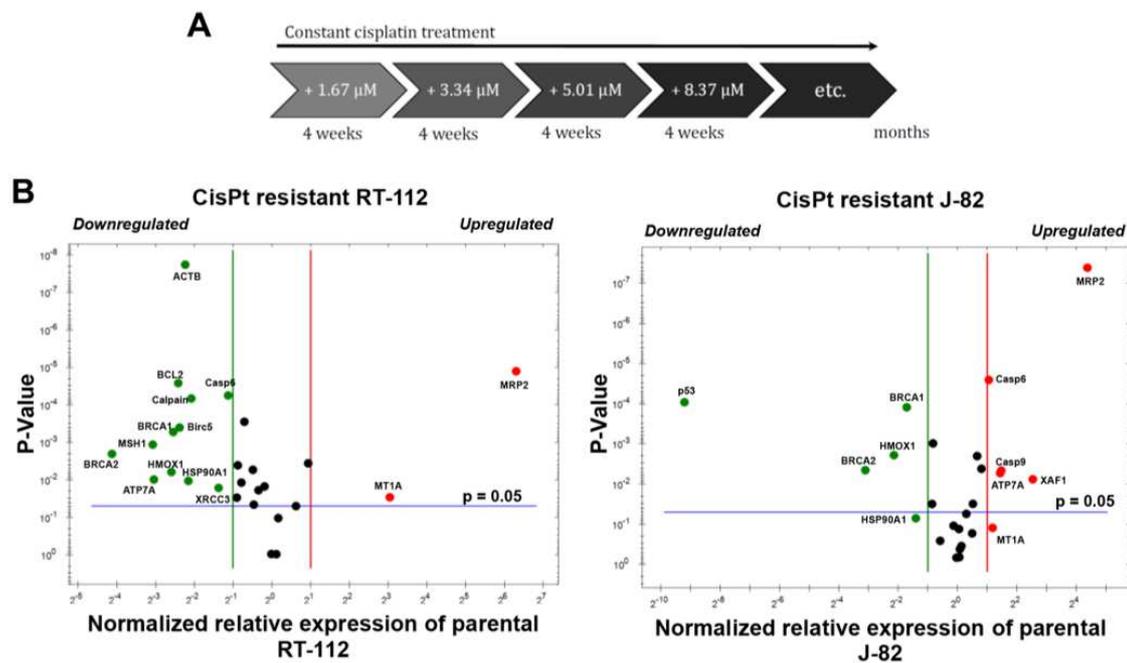
2. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA, European Association of U. [Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines]. [Article in Spanish]. *Actas urologicas espanolas*. 2012; 36:449–460.
3. Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 296:F505–511.
4. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstadt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol*. 2005; 167:1477–1484.
5. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222:385–386.
6. Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature*. 1995; 377:649–652.
7. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*. 1985; 24:707–713.
8. Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2001; 67:93–130.
9. Ljungman M. The transcription stress response. *Cell Cycle*. 2007; 6:2252–2257.
10. Olive PL, Banath JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009; 76:79–90.
11. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*. 2013; 332:237–248.
12. Olaussen KA, Mountzios G, Soria JC. ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*. 2007; 13:284–289.
13. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006; 355:983–991.
14. Kim KH, Do IG, Kim HS, Chang MH, Kim HS, Jun HJ, Uhm J, Yi SY, Lim do H, Ji SH, Park MJ, Lee J, Park SH, et al. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) expression in advanced urothelial carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2010; 118:941–948.
15. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33:9–23.

16. Drayton RM, Catto JW. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012; 12:271–281.
17. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012; 31:1869–1883.
18. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000; 408:433–439.
19. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell.* 2007; 28:739–745.
20. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* 2005; 434:864–870.
21. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009; 461:1071–1078.
22. Schepeler T, Lamy P, Hvidberg V, Laurberg JR, Fristrup N, Reinert T, Bartkova J, Tropia L, Bartek J, Halazonetis TD, Pan CC, Borre M, Dyrskjot L, et al. A high resolution genomic portrait of bladder cancer: correlation between genomic aberrations and the DNA damage response. *Oncogene.* 2013; 32:3577–3586.
23. Bentley J, Diggle CP, Harnden P, Knowles MA, Kiltie AE. DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:5249–5259.
24. Shiloh Y. ATM, ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11:71–77.
25. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Current opinion in cell biology.* 2001; 13:225–231.
26. McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, Svatek R, Das A, Adam L, Kamat A, Siefker-Radtke A, Dinney C. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28: 335–344.
27. Tran MN, Choi W, Wszolek MF, Navai N, Lee IL, Nitti G, Wen S, Flores ER, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney C, Barton M, McConkey DJ. The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J Biol Chem.* 2013; 288:3275–3288.
28. Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodriguez-Santiago B, Mendez-Pertuz M, Auer H, Gomez G, Grossman HB, Pisano DG, Schulz WA, Perez-Jurado LA, Carrato A, Theodorescu D, et al. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics.* 2015; 16:403.
29. Dobbstein M, Sorensen CS. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nature reviews Drug discovery.* 2015; 14:405–423.
30. Liu Y, Du F, Zhao Q, Jin J, Ma X, Li H. Acquisition of 5-fluorouracil resistance induces epithelial-mesenchymal transitions through the Hedgehog signaling pathway in HCT-8 colon cancer cells. *Oncology letters.* 2015; 9:2675–2679.
31. Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget.* 2015; 6:10697–10711. doi:10.18632/oncotarget.4037.
32. Bourlon MT, Flaig TW. The Epidemiological, Mechanistic and Potential Clinical Role of AR in Urothelial Carcinoma. *Curr Drug Targets.* 2015.
33. Plenchette S, Cheung HH, Fong WG, LaCasse EC, Korneluk RG. The role of XAF1 in cancer. *Current opinion in investigational drugs.* 2007; 8:469–476.
34. Huang J, Yao WY, Zhu Q, Tu SP, Yuan F, Wang HF, Zhang YP, Yuan YZ. XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. *Cancer science.* 2010; 101:559–567.
35. Wang J, Gu Q, Li M, Zhang W, Yang M, Zou B, Chan S, Qiao L, Jiang B, Tu S, Ma J, Hung IF, Lan HY, Wong BC. Identification of XAF1 as a novel cell cycle regulator through modulating G(2)/M checkpoint and interaction with checkpoint kinase 1 in gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis.* 2009; 30:1507–1516.
36. Gomez-Sierra T, Molina-Jijon E, Tapia E, Hernandez-Pando R, Garcia-Nino WR, Maldonado PD, Reyes JL, Barrera-Oviedo D, Torres I, Pedraza-Chaverri J. S-allylcysteine prevents cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 2014; 66:1271–1281.
37. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol.* 2010; 40:347–359.
38. Siegmund MJ, Marx C, Seemann O, Schummer B, Steidler A, Toktomambetova L, Kohrmann KU, Rassweiler J, Alken P. Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins. *Urol Res.* 1999; 27:157–163.
39. Graaf MR, Richel DJ, van Noorden CJ, Guchelaar HJ. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30:609–641.
40. Sieczkowski E, Lehner C, Ambros PF, Hohenegger M. Double impact on p-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells. *Int J Cancer.* 2010; 126:2025–2035.
41. Gadhikar MA, Sciuto MR, Alves MV, Pickering CR, Osman AA, Neskey DM, Zhao M, Fitzgerald AL, Myers JN, Frederick MJ. Chk1/2 inhibition overcomes the cisplatin resistance of head and neck cancer cells secondary to the loss of functional p53. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12:1860–1873.

42. Itamochi H, Nishimura M, Oumi N, Kato M, Oishi T, Shimada M, Sato S, Naniwa J, Sato S, Kudoh A, Kigawa J, Harada T. Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 overcomes cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2014; 24:61–69.
43. Sausville E, Lorusso P, Carducci M, Carter J, Quinn MF, Malburg L, Azad N, Cosgrove D, Knight R, Barker P, Zabludoff S, Agbo F, Oakes P, et al. Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014; 73: 539–549.
44. Karp JE, Thomas BM, Greer JM, Sorge C, Gore SD, Pratz KW, Smith BD, Flatten KS, Peterson K, Schneider P, Mackey K, Freshwater T, Levis MJ, et al. Phase I, pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:6723–6731.
45. Liedert B, Plum D, Schellens J, Thomale J. Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:e47.
46. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000; 267:5421–5426.
47. Lowik CW, Alblas MJ, van de Ruit M, Papapoulos SE, van der Pluijm G. Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. *Anal Biochem*. 1993; 213:426–433.
48. Olive PL. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol*. 2004; 75:355–373.
49. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998; 273:5858–5868.

Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin resistance of urothelial carcinoma cells

Supplementary Materials



Supplementary Figure S1: Alterations in gene expression going along with continuous long-time CisPt selection of epithelial- and mesenchymal-like UC cells. (A) Schematic representation of the long-term CisPt selection scheme applied to RT-112 and J-82 cells. After each passage of the cells, CisPt was added at the concentration indicated and left on the cells until next passage (7–10 days later). After a total of four weeks the CisPt concentration was increased as shown. Using this selection procedure cell variants were obtained that revealed an about 3-fold and 4-fold increased CisPt resistance (as concluded from the IC_{50} values) for J-82^R and RT-112^R cells, respectively, as compared to corresponding parental cells. Comparative mRNA expression analyses shown under B and C were performed after a CisPt selection period of 4–6 month. (B, C) The mRNA expression of selected subset of CisPt-related susceptibility factors [5] was analyzed by quantitative RT-PCR as described in Methods. Relative mRNA expression in parental J-82 cells was set to 1.0. Only alterations in gene expression of ≤ 0.5 or ≥ 2.0 between parental cells (J-82) and the CisPt resistant variant (J-82^R) were considered as biologically relevant. Shown are the genes that are either up- or downregulated in RT-112^R as compared to the RT-112 control (A) or J-82^R cells as compared to the corresponding J-82 parental cells (B).

3 Ergänzung der Ergebnisse

Ergänzend zu den in Fig. 6 dargestellten Ergebnissen wurde auch die Proteinexpression der phosphorylierten JNK 1 und 2 mittels Western Blot untersucht. Die Cisplatin-sensitiven J-82- und RT-112-Zellen sowie die Cisplatin-resistenten J-82^R und RT-112^R-Zellen wurden jeweils für die Dauer von vier Stunden mit Cisplatin behandelt. Dabei wurden die jeweilige IC₅₀ und die IC₈₀ für die Cisplatinexposition verwendet. Vier Stunden und 24 Stunden nach Ende der Cisplatinexposition wurden die Zellen geerntet, um die Proteinexpression der phosphorylierten JNK mittels Western Blot zu untersuchen. Zur Kontrolle wurden jeweils zeitgleich unbehandelte Zellen geerntet und analysiert. Als Positivkontrolle für die Aktivierung der JNK wurden Zellen mit ionisierender Strahlung behandelt und eine Stunde später geerntet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

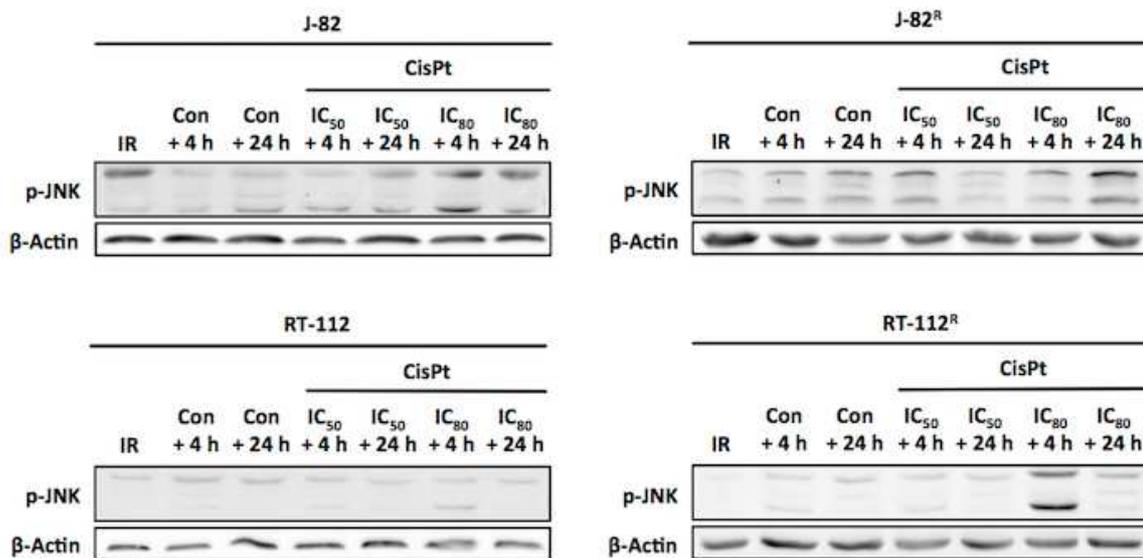


Abb. 5: Proteinexpression der phosphorylierten Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) im Vergleich der Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zelllinien

Die Cisplatin-sensitiven Zelllinien J-82 und RT-112 sowie die Cisplatin-resistenten Zelllinien J-82^R und RT-112^R wurden für vier Stunden mit der jeweiligen IC₅₀ (3,9 µM für J-82, 10,7 µM für RT-112) oder IC₈₀ (13,5 µM für J-82, 44,3 µM für RT-112) von Cisplatin behandelt. Vier Stunden und 24 Stunden nach Cisplatinexposition wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression der phosphorylierten JNK (p-JNK) mittels Western Blot analysiert. Zu Kontrollzwecken wurden zeitgleich unbehandelte Zellen geerntet. Als Positivkontrolle diente die Bestrahlung mit 10 Gy, wobei die Zellen bereits nach einer Stunde geerntet wurden. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, von denen hier jeweils ein repräsentatives Ergebnis gezeigt wird.

Abkürzungen: CisPt = Cisplatin, IR = Ionisierende Strahlung, Con = Kontrolle, IC₅₀/IC₈₀: Inhibitorische Konzentration, bei der das Zellwachstum um 50% bzw. 80% inhibiert wird.

Wie in Abb. 5 erkennbar ist, werden bei der Analyse der Proteinexpression der JNK im Western Blot zwei Banden detektiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch alternatives Spleißen bei der Translation der JNK eine 54 kDa-Variante und eine 46 kDa-Variante des Proteins entstehen, die durch die beiden Banden repräsentiert werden.

Im Zuge der Analyse der DNA-Schadensantwort mittels Western Blot konnten Unterschiede in der Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinasen nach Cisplatinexposition zwischen den Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Zellen detektiert werden. Die Proteinexpression der p-JNK ist in den mesenchymalen J-82-Zellen ausgeprägter als in den epithelialen RT-112-Zellen. Zudem weisen die Cisplatin-resistenten Zelllinien insgesamt eine stärkere Aktivierung der JNK auf als ihre Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen. Die stärkste Aktivierung der JNK wurde in den Zelllinien RT-112, J-82 und RT-112^R vier Stunden nach Cisplatinbehandlung mit der IC₈₀ detektiert und war nach 24 Stunden bereits wieder rückläufig. In den J-82^R-Zellen war die Phosphorylierung der JNK hingegen 24 Stunden nach Cisplatinexposition mit der IC₈₀ am ausgeprägtesten. Ionisierende Strahlung führte nur in den J-82-Zellen zur unmittelbaren Aktivierung der JNK.

4 Diskussion

4.1 Diskussion von in der Studie angewandten Methoden

4.1.1 Selektion der Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen

Um die Cisplatin-resistenten Varianten RT-112^R und J-82^R zu selektieren, wurden die Zellen über einen Zeitraum von zehn Wochen regelmäßig über vier Stunden einer Pulsbehandlung mit Cisplatin ausgesetzt. Nach zweimaliger Exposition gegenüber Cisplatin im Abstand von 48 Stunden folgte eine elftägige Pause, bevor die Zellen erneut mit Cisplatin behandelt wurden (siehe Fig. 3A). Diese pulsatile Behandlung der Zellen wurde gewählt, um die klinische Verabreichung von Cisplatin in Chemotherapie-Zyklen zu imitieren. Insgesamt wurden im Zellkulturmodell sechs der oben genannten Zyklen durchgeführt.

4.1.1.1 Vergleich des Selektionsschemas mit der klinischen Anwendung von Cisplatin

Das verwendete Selektionsschema ist an die klinische Anwendung von Cisplatin bei Urothelkarzinom-Patienten angelehnt; bei initialem Ansprechen auf die Chemotherapie werden ebenfalls zunächst sechs Zyklen verabreicht [52]. Bei den für die Behandlung von Urothelkarzinomen am häufigsten verwendeten Schemata Cisplatin/Gemcitabin bzw. MVAC werden jedoch Zyklen mit einer Dauer von 28 Tagen gewählt, nur am zweiten Tag wird Cisplatin verabreicht [52]. Dieser lange Abstand zwischen zwei Gaben erschien in einem Zellkulturmodell jedoch zu groß, um eine relevante Selektion Cisplatin-resistenter Zellen erreichen zu können. Dennoch ist die pulsatile Cisplatinbehandlung über wenige Stunden mit längeren Expositionspausen ein Versuch, sich der klinischen Anwendung von Cisplatin im Zellkulturmodell anzunähern. Dies unterscheidet diese Studie von vergleichbaren Experimenten, in denen Cisplatin-resistente Zellen durch Dauerexposition mit über die Zeit ansteigenden Cisplatin-Dosen selektiert wurden [643]. Es ist vorstellbar, dass sich die Mechanismen der Resistenzentwicklung im klinischen Setting z.B. aufgrund der längeren Regenerationszeit zwischen den Cisplatin-Gaben von den in der hier vorliegenden Arbeit detektierten Mechanismen unterscheiden. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte somit berücksichtigt werden, dass trotz Orientierung des Versuchsaufbaus an der klinischen Applikation von Cisplatin methodisch bedingt deutliche Unterschiede zu einem realen Therapieschema bestehen.

Zusätzlich müssen die Pharmakokinetik von Cisplatin im Organismus sowie Wechselwirkungen mit anderen Zytostatika, z.B. Gemcitabin oder Methotrexat, Vinblastin und Doxorubicin (beim MVAC-Schema) Betracht gezogen werden. Die klinisch verabreichte Konzentration von Cisplatin (bei Verabreichung der Standarddosis von 70mg/m² Körperoberfläche) liegt bei einem durchschnittlichen Erwachsenen mit einer Körperoberfläche von 1,75 m² und einem Blutvolumen von 4,875 l im Blut rechnerisch bei etwa 84 µM (Molekulargewicht von Cisplatin = 300,05 g/mol). Diese Konzentration im

Blut liegt über der hier verabreichten IC_{80} von $44,3 \mu\text{M}$ bei RT-112 bzw. $13,5 \mu\text{M}$ bei J-82. Ziel einer Chemotherapie ist die Abtötung von 80-90% der Tumorzellen pro Therapiezyklus. Die Verteilung im Interstitium und die Vaskularisation von Tumoren unterliegen jedoch erheblicher Variabilität, zudem ist die Geometrie eines soliden Tumors durch ein Zellkulturmodell mit flächigem Wachstum unzureichend repräsentiert. Welcher Cisplatinkonzentration eine Urothelkarzinomzelle *in vivo* tatsächlich ausgesetzt ist, kann daher kaum vorhergesagt werden. Somit sind zusätzliche *in vivo* Untersuchungen für ein detaillierteres Verständnis der Cisplatin-Resistenzmechanismen in Urothelkarzinomzellen unabdingbar.

4.1.1.2 Vor- und Nachteile des Selektionsschemas im Vergleich zu kontinuierlicher Cisplatinexposition

Zur Selektion Cisplatin-resistenter Urothelkarzinomzellen *in vitro* und Analyse der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen wurden in vergleichbaren präklinischen Studien Selektionsschemata mit kontinuierlicher Cisplatinexposition angewendet [577, 643]. In einer Studie von Skowron et al., die auch die hier untersuchten Zelllinien RT-112 und J-82 einbezog, wurden die Ursprungszellen dauerhaft einer Cisplatinkonzentration ausgesetzt, die zwei- bis achtmal höher war als die IC_{50} der Ursprungszellen [643]. Dieses nicht-pulsatile Selektionsschema mit hohen Cisplatinkonzentrationen führte zu einem erheblich höheren Anstieg der IC_{50} als beim hier angewendeten pulsatilem Selektionsschema: In der hier vorliegenden Arbeit waren die IC_{50} -Werte nach der Selektion zwei- bis dreifach erhöht (siehe Figg. 3B und 3D), während sie bei Skowron et al. um den Faktor 10 bis 21 zunahmen [643]. Es liegt nahe, dass ein Nachteil des pulsatilem Selektionsschemas darin bestehen könnte, dass die erworbene Cisplatinresistenz nach Abschluss der Cisplatinexposition nur zeitlich begrenzt anhält. Für diese Vermutung ergab sich in der hier vorliegenden Arbeit im Laufe von 16 Wochen, während der die selektierten Zellen eine stabile Cisplatinresistenz aufwiesen, jedoch kein Anhalt. Ein Vorteil kontinuierlicher Expositionsschemata könnte außerdem sein, dass Veränderungen der Expression von Resistenzfaktoren aufgrund des erheblich höheren Resistenzgrads der selektierten Zellen deutlicher zutage treten, sodass sie leichter identifiziert werden können. Andererseits besteht die Gefahr, auch Resistenzmechanismen zu detektieren, die in einem klinischen Setting gar nicht relevant sind, da während einer Chemotherapie Cisplatin nie kontinuierlich verabreicht wird.

4.1.1.3 Beurteilung des pulsatilem Expositionsschemas im Hinblick auf die Anwendbarkeit in Zellkulturmodellen

Bezüglich der in dieser Studie angewandten Methode eines pulsatilem Expositionsschemas zur Selektion Cisplatin-resistenter Zellen kann das Fazit gezogen werden, dass es möglich ist, Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen auf diese Weise zu selektionieren. Beide Cisplatin-resistenten Zelllinien konnten über mehrere Wochen nach der Cisplatinexposition weiter kultiviert werden bei stabiler Resistenz gegenüber

Cisplatin. Eine Einschränkung ergab sich jedoch für die RT-112^R-Zellen, die nach dem Einfrieren nicht erneut in Kultur genommen werden konnten, da sie beim Auftauen abgestorben sind. Die Ursache hierfür bleibt unklar. Insgesamt ist die pulsatile Cisplatinexposition nach dem oben genannten Schema als Methode zur Etablierung Cisplatin-resistenter Urothelkarzinomzellen in weiten Teilen erfolgreich verlaufen und kann ggf. als Orientierung für weitere Studien dieser Art dienen.

4.1.2 Detektion von γ H2AX- und 53BP1-Foci durch Immunfluoreszenz

4.1.2.1 Eignung von γ H2AX- und 53BP1-Foci als Marker für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden

Zur Untersuchung der DNA-Schadensantwort wurden in dieser Studie mittels Immunfluoreszenz nukleäre γ H2AX- und 53BP1-Foci sowie deren Kolokalisation untersucht (siehe 1.3.2.1 bis 1.3.2.3; siehe Figg. 5A und 5B). γ H2AX-Foci wurden ursprünglich als Indikatoren für DNA-Doppelstrangbrüche angesehen [808]. Die Histonvariante H2AX wird jedoch auch unabhängig von DNA-Doppelstrangbrüchen in Reaktion auf Replikationsstress und Interstrang-Crosslinks durch ATR phosphoryliert [808, 809]. Nicht nur infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen, sondern auch in Reaktion auf Replikationsstress kolokalisieren 53BP1 und γ H2AX an blockierten Replikationsgabeln [136] und können daher auch bei der Analyse Cisplatin-induzierter DNA-Schäden hilfreich sein. Es muss bedacht werden, dass exzessive, irreparable DNA-Schäden eine pannukleäre H2AX-Phosphorylierung bedingen, die kurz vor der Einleitung der Apoptose in diesen Zellen auftritt (siehe auch 1.3.5.1); dies wurde auch in Reaktion auf Replikationsstress festgestellt [291, 810]. Es ist daher fraglich, ob γ H2AX-Foci bei sehr hohen Cisplatin-Dosen, die für den überwiegenden Teil der Zellen letal sind, wie die hier verwendete IC₈₀, überhaupt sinnvoll zur Quantifizierung Cisplatin-induzierter DNA-Schäden eingesetzt werden können. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Kolokalisation von γ H2AX- und 53BP1-Foci ein besonders spezifischer Indikator (Surrogatmarker) für DNA-Doppelstrangbrüche ist.

4.1.2.2 Zeitliche Aspekte bei der Entstehung von γ H2AX- und 53BP1-Foci

Retrospektiv betrachtet wäre es möglicherweise aufschlussreich gewesen, die γ H2AX- und 53BP1-Foci nicht nur vier Stunden und 24 Stunden nach Cisplatinexposition zu quantifizieren, sondern auch noch zu einem späteren Zeitpunkt. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist in humanen Zellen zwar in der Regel innerhalb weniger Stunden abgeschlossen. Vor dem Hintergrund, dass die initial entstehenden Monoaddukte an der DNA erst verzögert in Crosslinks umgewandelt werden und Cisplatin-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche bzw. blockierte Replikationsgabeln erst entstehen, wenn die Zelle in die S-Phase eingetreten ist, ist es jedoch durchaus plausibel, dass das volle Ausmaß Cisplatin-induzierter DNA-Schäden in einigen Zelllinien auch erst später erreicht wird. Im Hinblick darauf muss berücksichtigt werden, dass die Verdopplungszeit der RT-112-Zellen im exponentiell verlaufenden Bereich der

Wachstumskurve ca. 24 Stunden beträgt (siehe Fig. 1C), während die Verdopplungszeit der J-82-Zellen wesentlich länger ist. In einer Studie von Skowron et al. zeigte sich, dass die Anzahl der γ H2AX-Foci im zeitlichen Verlauf über 72 Stunden in den J-82-Zellen noch weiter zunimmt, während sie sich in den RT-112-Zellen nach 24 Stunden nicht mehr wesentlich verändert [643]. Es wäre somit interessant gewesen, insbesondere bei J-82 die Anzahl der γ H2AX-Foci in der hier vorliegenden Arbeit auch 72 Stunden nach Cisplatinexposition zu untersuchen. Andererseits wären nach 72 Stunden bereits viele Zellen apoptotisch gewesen, sodass pannukleäre H2AX-Phosphorylierung eine sinnvolle Quantifizierung der Doppelstrangbrüche erschwert hätte.

4.1.3 Berücksichtigung dosisbezogener Aspekte bei der Interpretation der Ergebnisse

Nach Bestimmung der Zelllinien-spezifischen IC_{50} bzw. IC_{80} der Ausgangszelllinien RT-112 und J-82 sowie der Cisplatin-resistenten Zelllinien RT-112^R und J-82^R wurden für die nachfolgenden Versuche mit den Cisplatin-resistenten Zelllinien die IC_{50} bzw. IC_{80} der jeweiligen Ursprungszellen verwendet. Dieser Versuchsaufbau entspricht am ehesten der klinischen Applikation von Cisplatin. Zu Beginn einer Chemotherapie wird die voraussichtlich maximal tolerierbare Cisplatinosis anhand der Körperoberfläche des Patienten ermittelt. Eine Erhöhung der Dosis bei erworbener Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin ist aufgrund der ausgeprägten Normalgewebstoxizität in der Regel nicht möglich; im Gegenteil muss die Dosierung im Lauf der Therapie aufgrund von Nebenwirkungen häufig reduziert werden. Dennoch ergeben sich aus dieser Applikationsform in unserem präklinischen Setting im Hinblick auf die Detektion von Unterschieden der DNA-Schadensantwort auch Nachteile. Zieht man Resistenzmechanismen in Betracht, die Cisplatin bereits vor dessen Bindung an die DNA inaktivieren (beispielsweise Membrantransporter und intrazytoplasmatische Nukleophile), führt die Verwendung äquimolarer Dosen in den Cisplatin-resistenten Zelllinien zu einer deutlich abgeschwächten DNA-Schadensantwort. Dies ist jedoch unter Umständen nicht auf tatsächliche Veränderungen der DNA-Schadensantwort in den Cisplatin-resistenten Zellen zurückzuführen, sondern auf die Inaktivierung von Cisplatin vor Erreichen des Nukleus und somit auf eine stark reduzierte Anzahl an initialen DNA-Schäden, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Interessant wäre diesbezüglich ein Vergleich von Dosierungen, die die gleiche Anzahl eines Indikator-DNA-Schadens in den Cisplatin-sensiblen bzw. resistenten Zelllinien hervorrufen. Bei dieser Konzeption wäre jedoch problematisch, dass nach wie vor nicht geklärt ist, welcher DNA-Schaden am relevantesten für die Zytotoxizität von Cisplatin ist; somit wäre nicht eindeutig, ob als Indikator-DNA-Schäden beispielsweise Intrastrang-Crosslinks zwischen zwei benachbarten Guaninen, Interstrang-Crosslinks oder resultierende DNA-Doppelstrangbrüche besser geeignet wären. Hinzu kommt, dass ein solcher Versuchsaufbau den Anteil der Zytotoxizität von Cisplatin, der unabhängig von

nukleären DNA-Schäden ist (z.B. ER-Stress, Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies), unberücksichtigt lassen würde.

Ein weiterer dosisbezogener Aspekt, der bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden sollte, ist die Applikation sehr hoher Cisplatin Dosen in den durchgeführten Versuchen bei Verwendung der IC_{80} . In der hier vorliegenden Arbeit dienen sie insbesondere dazu, die Dosisabhängigkeit bei Veränderungen der DNA-Schadensantwort zu evaluieren. Bereits bei Behandlung der Ursprungszellen bzw. der Cisplatin-resistenten Zelllinien mit äquimolaren Dosen (siehe Figg. 3B und 3D) hat sich jedoch gezeigt, dass oberhalb der IC_{80} der Cisplatin-resistenten Zellen keine wesentlichen Unterschiede in der Viabilität zwischen RT-112 und RT-112^R bzw. J-82 und J-82^R mehr bestehen. Da der überwiegende Teil der Zellen bei Behandlung mit der IC_{80} zugrunde geht und nur wenige Zellen überleben, ist die Aussagekraft reduziert. Die Interpretation der Veränderungen der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit der IC_{80} sollte hier daher nur im Zusammenhang mit den Ergebnissen nach Exposition mit der IC_{50} erfolgen.

4.2 Bedeutung der Epithelial-Mesenchymalen Transition für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen

Eines der Ziele dieser Arbeit ist, eine mögliche Bedeutung der Epithelial-Mesenchymalen Transition für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen zu evaluieren (siehe 1.7). Die Auswahl der verwendeten Zelllinien erfolgte unter der Annahme, dass die Zelllinie RT-112 den epithelialen Phänotyp repräsentiert, während die Zelllinie J-82 stellvertretend für den mesenchymalen Phänotyp untersucht wurde (siehe 1.1.4). Erwartungsgemäß zeigten die RT-112-Zellen vor Selektion eine deutlich höhere E-Cadherin- und eine niedrigere Vimentin-Expression als die J-82-Zellen (siehe Fig. 1B). Während der Selektion veränderten die Zellen ihre Morphologie im Sinne der Epithelial-Mesenchymalen Transition; sie entwickelten lang gezogene Ausläufer, verloren ihre rundliche Form und wiesen reduzierte Zell-Zell-Kontakte auf (siehe Figg. 3A, 3B und 3D). Einhergehend verringerte sich die E-Cadherin-Expression während der Selektion in beiden Zelllinien, während die Vimentinexpression zunahm (siehe Figg. 3C und 3E). In den J-82^R-Zellen, deren morphologische Veränderungen noch augenfälliger waren als die der RT-112^R-Zellen, nahm die E-Cadherin-Expression besonders stark ab (Faktor 10⁻²). Somit korrespondieren die E-Cadherin- und Vimentinexpression mit den morphologischen Veränderungen in den beiden Zelllinien. Bemerkenswerterweise wiesen die bereits vor Selektion eher als mesenchymal charakterisierten J-82-Zellen sowohl morphologisch als auch bezüglich der E-Cadherin- und Vimentin-Expression während der Selektion noch stärkere Veränderungen im Sinne der EMT auf als die RT-112-Zellen. Insgesamt wurde somit in dieser Arbeit beobachtet, dass pulsatile Cisplatinexposition Epithelial-Mesenchymale Transition in Urothelkarzinomzellen zur Folge hat und mit Cisplatinresistenz einhergeht. Auch durch kontinuierliche Cisplatinexposition selektionierte Urothelkarzinomzellen weisen Veränderungen im Sinne der EMT auf, die

mit Cisplatinresistenz einhergehen [38], woraus geschlossen werden kann, dass die Epithelial-Mesenchymale Transition im Zuge der erworbenen Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin unabhängig vom Selektionsschema auftritt.

4.2.1 Bedeutung von Tumorstammzellen für den Zusammenhang von Cisplatinresistenz und EMT

Eine Hypothese, die die Korrelation zwischen EMT und Cisplatinresistenz in Tumorzellen erklärt, ist, dass während der Cisplatintherapie die meisten Zellen zugrunde gehen, während in den wenigen überlebenden Zellen Veränderungen im Sinne der EMT induziert und erworbene Mutationen angehäuft werden, die das onkogene Potential der Zellen erhöhen [811, 812]. Es werden Tumorzellen selektioniert, die Stammzeleigenschaften aufweisen und sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie hohes Invasions- und Metastasierungspotential auszeichnen [811]. Diese verbleiben nach abgeschlossener Chemotherapie im Körper, sind jedoch aufgrund ihrer geringen Anzahl durch gängige Staging-Diagnostik wie radiologische Verfahren oder Tumormarker nicht nachweisbar. Nach einer variablen Latenzzeit proliferieren diese Tumorstammzellen erneut und verursachen Rezidive, wobei sich durch das erhöhte Migrationspotential häufig Metastasen bilden, die dann nicht mehr kurativ therapiert werden können [813]. Zudem weisen diese Zellen eine hohe Chemoresistenz auf, sodass die initial verwendeten Zytostatika (wie z.B. Cisplatin) nicht mehr wirksam sind [812]. Die Entwicklung therapeutischer Methoden, um Tumorstammzellen zu entdecken und gezielt zu eliminieren sowie die Epithelial-Mesenchymale Transition während der initialen Therapie zu unterbinden, sind daher unerlässlich, um Chemoresistenz im Allgemeinen bzw. Cisplatinresistenz im Speziellen wirksam zu bekämpfen. In Xenograft-Modellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumorstammzellen aus Urothelkarzinomen vermehrt das Cytokeratin CK14 sowie den Oberflächenmarker CD90 exprimieren [814], sodass letzterer als mögliche Zielstruktur für therapeutische Interventionen in Betracht kommen könnte. In mehreren Cisplatin-resistenten Urothelkarzinom-Zelllinien konnte *in vitro* jedoch keine erhöhte CD90- oder CK14-Expression detektiert werden, obwohl die Zellen eindeutig phänotypische Zeichen der EMT und ein verändertes Expressionsprofil von E-Cadherin, Vimentin sowie der Transkriptionsfaktoren Twist und ZEB1 im Sinne der EMT aufwiesen [38]. Auch in dieser Arbeit ergab sich kein Unterschied in der Expression von CK14 und CD90 zwischen den Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen und ihren korrespondierenden Ursprungszellen. Diese Ergebnisse lassen zwar die Frage nach zuverlässigen Markern für Tumorstammzellen in Urothelkarzinomen offen, unterstreichen jedoch die Bedeutung der EMT bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin, die auch in dieser Arbeit unter Verwendung eines alternativen Selektionsschemas beobachtet wurde.

Mögliche Strategien zur zielgerichteten Elimination von Tumorstammzellen - Ausblick

Als Marker für Tumorstammzellen in Urothelkarzinomen kommt das Zellzyklus-regulierende Onkoprotein Bmi1 in Betracht, das für die Fähigkeit von Stammzellen zur Selbsterneuerung essentiell ist [815]. *Knockdown* von Bmi1 führte in Urothelkarzinomzellen mit Tumorstammzell-Eigenschaften *in vitro* zur Sensitivierung gegenüber Cisplatin [815], sodass Inhibition von Bmi1 als Strategie zur Bekämpfung von Tumorstammzellen in Urothelkarzinomen in Betracht kommen könnte.

Weitere mögliche therapeutische Ziele zur Bekämpfung von Tumorstammzellen könnten der wachstumsregulierende YAP1- und der Cyclooxygenase 2-Signalweg sein [816]. Diese kooperieren bei der Rekrutierung des Transkriptionsfaktors SOX2, der Pluripotenz und Selbsterneuerung in Tumorstammzellen vermittelt [816]. Die Involvierung der proinflammatorischen Cyclooxygenase 2 (COX2) bei der Entstehung von Tumorstammzellen ist aus klinischer Sicht besonders interessant, da COX-Inhibitoren als analgetische, antipyretische und antiinflammatorische Medikamente in breitem klinischem Gebrauch sind und daher unkompliziert als Co-Medikation im Rahmen einer zytostatischen Therapie eingesetzt werden könnten. Cisplatintherapie führt *in vitro* zur Überexpression von YAP1, COX2 und SOX2 in Urothelkarzinomzellen [816]. Die YAP1-Expression korreliert in von Urothelkarzinom-Patienten stammenden Xenograft-Modellen mit der Cisplatinresistenz [817]. Pharmakologische YAP1-Inhibition kann Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen *in vivo* resensitivieren [817]. Die kombinierte Inhibition von YAP1 und COX2 als Co-Medikation im Rahmen einer Cisplatin-basierten Chemotherapie zur Elimination von Tumorstammzellen hat im Xenograft-Modell vielversprechende Ergebnisse gezeigt [816].

Das *TNF α -induzierte Protein 2* (TNFAIP2), dessen Expression in mehreren Tumorentitäten mit Migration und Invasion assoziiert ist, vermittelt Epithelial-Mesenchymale Transition in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen *in vitro* [818]. Bei Urothelkarzinom-Patienten ist die immunhistochemisch detektierte E-Cadherin-Expression nach einer Cisplatin-basierten Chemotherapie signifikant geringer und die TNFAIP2-Expression höher als vor einer Cisplatin-basierten Chemotherapie [818]. *Knockdown* von TNFAIP2 führt in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen *in vitro* zur Reduktion von Markern der EMT und reduzierter Invasivität [818]. Insofern kommt TNFAIP2 als therapeutisches Ziel zur Bekämpfung der EMT und Verhinderung der Entstehung Cisplatin-resistenter Tumorstammzellen in Betracht.

Die präklinische Forschung zur zielgerichteten Elimination Cisplatin-resistenter Tumorstammzellen in Urothelkarzinomen befindet sich noch in den Anfängen. Insofern wäre es interessant zu untersuchen, ob in bereits etablierten Cisplatin-resistenten Urothelkarzinom-Zelllinien - wie beispielsweise den in dieser Arbeit selektierten J-82^R-Zellen - tatsächlich Zellen mit Tumorstammzell-Eigenschaften nachweisbar sind und ob diese durch YAP1- bzw. COX2-Inhibitoren oder *Knockdown* von TNFAIP2 bzw. Bmi1 gegenüber Cisplatin sensitiviert werden können.

4.2.2 Zusammenhang zwischen EMT und reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies können auf zahlreichen Wegen die Epithelial-Mesenchymale Transition begünstigen. ROS können die freien Thiolgruppen von Cysteinresten oxidieren und so die Funktion von Proteinen modifizieren: Dazu gehören Integrine, die als Transmembranproteine Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Kollagen und Lamin mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett verbinden, sowie Aktin selbst [819]. Diese Modifikationen des Zytoskeletts bedingen erhöhte Zellmotilität und die morphologischen Veränderungen im Sinne der EMT [820], wie sie auch in den Cisplatin-resistenten J-82^R- und RT-112^R-Zellen beobachtet werden konnten (siehe Fig. 3). Zudem tragen reaktive Sauerstoffspezies zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten im Rahmen der EMT bei und aktivieren den TGF β -, HIF1- und NF- κ B-Signalweg, wodurch die Expression von Transkriptionsfaktoren, die EMT vermitteln, hochreguliert wird [819]. Durch Stimulation der Transkription von *Urokinase Plasminogen Activator* (uPA) und Matrix-Metalloproteinasen fördern reaktive Sauerstoffspezies außerdem die Zersetzung der extrazellulären Matrix, was Invasion und Metastasierung begünstigt [819]. Andererseits ist die Hochregulierung antioxidativer Enzyme ein häufig beobachteter erworbener Resistenzmechanismus gegenüber Cisplatin, der sich auch in Urothelkarzinomzellen als relevant erwiesen hat (siehe 1.6.2). In dieser Arbeit wurde mittels quantitativer Realtime-PCR die mRNA-Expression zahlreicher Kandidatengene untersucht, die an der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin beteiligt sein könnten (siehe Fig. 7), darunter auch antioxidative Enzyme. Hierbei zeigten sich die GSTM1 sowie die Hämoxigenase 1 in den mesenchymalen J-82^R-Zellen signifikant erhöht (siehe Fig. 7A, siehe 4.6.2).

Insgesamt nehmen ROS in Bezug auf die Epithelial-Mesenchymale Transition und die Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin somit eine duale Rolle ein [821]. Es ist denkbar, dass der lokale Entstehungsort der reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zelle diesbezüglich von Bedeutung ist, oder dass verschiedene reaktive Sauerstoffspezies unterschiedliche Effekte haben [819]. Beispielsweise hat sich gezeigt, dass ein hohes Verhältnis von O₂^{•-} zu H₂O₂ Resistenz gegenüber Anoikis begünstigt [822]. Anoikis ist eine spezielle Form der Apoptose, die in Zellen eingeleitet wird, die sich aus der extrazellulären Matrix oder dem Kontext ihrer benachbarten Zellen abgelöst haben [823]. Anoikis wirkt somit der EMT und Metastasierung von Tumorzellen entgegen [823]. Während HMOX1 und GSTM1 in den J-82^R-Zellen überexprimiert sind, ist DYRK1B/MIRK signifikant herunterreguliert (siehe Fig. 7). DYRK1B/MIRK begünstigt die Expression der Superoxiddismutasen 2 und 3 (siehe 1.6.2 e), was zur Reduktion des Verhältnisses von O₂^{•-} zu H₂O₂ führt. Somit könnte die Herunterregulierung von DYRK1B/MIRK in den J-82^R-Zellen über verminderte Expression von Superoxiddismutasen Resistenz gegenüber Anoikis vermitteln und dadurch die Epithelial-Mesenchymale Transition begünstigen. Es wäre somit interessant, die mRNA-Expression der Superoxiddismutasen 2 und 3 in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen zu analysieren, um zu prüfen, ob sich diese Hypothese erhärten lässt.

4.2.3 Beziehung zwischen EMT und Proteinen der HSP70-Familie

Ähnlich wie reaktive Sauerstoffspezies nehmen auch Proteine der HSP70-Familie eine duale Rolle bezüglich erworbener Cisplatinresistenz ein. Einerseits können sie durch Inhibierung der Apoptose, Unterstützung von DNA-Reparaturmechanismen und verstärkte Autophagie Cisplatinresistenz vermitteln (siehe 1.6.3 b). Die hier erhobenen Daten zeigen im Widerspruch dazu jedoch eine hochsignifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression von HSPA1B aus der HSP70-Familie in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen, die allerdings den Schwellenwert der biologischen Relevanz mit Faktor 0,52 knapp verfehlte. (Der Schwellenwert der biologischen Relevanz wurde als < Faktor 0,5 definiert; HSPA1B ist daher nicht beschriftet in Fig. 7.) Eigentlich wäre eher zu erwarten, dass Herunterregulierung von HSPA1B die Cisplatinempfindlichkeit erhöht, sodass die Suppression von HSPA1B in den J-82^R-Zellen zunächst paradox erscheint. Andererseits geht Herunterregulierung von Proteinen der HSP70-Familie mit Epithelial-Mesenchymaler Transition einher. In Zellkulturen haben sich Hinweise darauf ergeben, dass HSP70-Inhibitoren Epithelial-Mesenchymale Transition begünstigen können [824]. Herunterregulierung von HSP70 führt zur Auflösung von Zellkontakten durch Destabilisierung der Interaktion von E-Cadherin-Dimeren und Cateninen *in vitro* [825], wodurch EMT vermittelt wird. Somit ist es denkbar, dass die Herunterregulierung von HSPA1B in den J-82^R-Zellen zur Epithelial-Mesenchymalen Transition beigetragen hat, die wiederum mit Cisplatinresistenz einhergeht.

4.3 Bedeutung von Veränderungen der DNA-Schadensantwort für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen

4.3.1 Veränderungen der Formierung von γ H2AX- und 53BP1-Foci im Vergleich der Cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinien

Die durch Immunfluoreszenz detektierten γ H2AX- und 53BP1-Foci kolokalisieren im Bereich von DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe 1.3.2.1 bis 1.3.2.3). Die Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foci war bei Verwendung äquimolarer Dosen in den J-82^R-Zellen signifikant geringer ausgeprägt als in den Cisplatin-sensitiveren J-82-Zellen (siehe Fig. 5B). Auch im Southwestern-Blot zeigte sich bei Behandlung mit der höheren Cisplatin-Dosierung (14 μ M, entspricht in etwa der IC₈₀ der J-82-Zellen), dass die Intrastrang-Crosslinks zwischen zwei benachbarten Guaninen, die das häufigste Cisplatin-Addukt an der DNA ausmachen, in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen gegenüber den J-82-Zellen reduziert sind (siehe Fig. 5D). Dies deutet darauf hin, dass in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen ein relevanter Anteil der Cisplatinmoleküle bereits vor Erreichen des Nukleus inaktiviert wird. Somit erscheint die Beteiligung von Membrantransportern, intrazytoplasmatischen Nukleophilen oder antioxidativen Enzymen (siehe 1.6.1 und 1.6.2) möglich. Bemerkenswerterweise war die Reduktion der γ H2AX- und 53BP1-Foci in den J-82^R-Zellen bei Behandlung mit der jeweiligen IC₅₀ 24 Stunden nach Cisplatinbehandlung jedoch deutlich stärker ausgeprägt als vier Stunden nach Cisplatinbehandlung (siehe Fig.

5B). Dies könnte auf eine erhöhte Reparaturkapazität für DNA-Doppelstrangbrüche in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen hinweisen. Bei Behandlung mit der IC₈₀ wiesen die J-82^R-Zellen nach 24 Stunden hingegen fast genauso viele Doppelstrangbrüche auf wie die Cisplatin-sensitiven J-82-Zellen. Möglicherweise sind die DNA-Reparaturkapazitäten bei dieser hohen Cisplatinkonzentration erschöpft.

In den Cisplatin-sensitiven J-82-Zellen zeigte sich verglichen mit RT-112 bei Behandlung mit äquitoxischen Dosen eine deutlich erhöhte Anzahl von Intrastrang-Crosslinks zwischen benachbarten Guaninen (siehe Fig. 5C). Einhergehend wiesen die J-82-Zellen auch eine höhere Anzahl an γ H2AX- und 53BP1-Foci auf. Dies impliziert, dass die J-82-Zellen eine erhöhte Reparaturkapazität für diese DNA-Addukte aufweisen, da bei gleicher Zytotoxizität (durch Verwendung äquitoxischer Dosen) eine erhöhte Anzahl von Intrastrang-Crosslinks und Doppelstrangbrüchen unmittelbar nach Cisplatinexposition detektiert wurde. Zu dieser Theorie passt, dass nach einmaliger Cisplatinexposition mehrere Reparaturfaktoren in den J-82-Zellen hochreguliert werden, darunter BRCA1, BRCA2 und XRCC3 (siehe Fig. 2D), was bei RT-112 nicht der Fall ist (siehe Fig. 2C). Zudem weisen die J-82-Zellen insgesamt eine stärkere Aktivierung der DNA-Schadensantwort auf als RT-112 (siehe Fig. 6). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Zytotoxizität in den RT-112-Zellen weniger von nukleären DNA-Schäden abhängt als von anderen Mechanismen Cisplatin-induzierter Toxizität, z.B. dem vermehrten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies oder der Induktion von ER-Stress. Dafür spricht, dass der VDAC, an den Cisplatin direkt bindet und der zudem an der Einleitung der Apoptose über das endoplasmatische Retikulum beteiligt ist, in den RT-112-Zellen stärker exprimiert wird als in den J-82-Zellen (siehe Figg. 2A und 2B). In den J-82-Zellen ist hingegen das HSPA1B aus der HSP70-Familie stärker exprimiert, das ER-Stress reduzieren kann. Zudem werden in den J-82-Zellen im Vergleich zu RT-112 antioxidative Enzyme wie HMOX1, GPX1 und DYRK1B sowie der Radikalfänger MT1A vermehrt exprimiert (siehe Figg. 2A und 2B), was für eine geringere Relevanz ROS-induzierter Zytotoxizität in den J-82-Zellen spricht. In den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen ist zwar eine Tendenz zur geringeren Formierung von γ H2AX- und 53BP1-Foci sowohl vier Stunden als auch 24 Stunden nach Cisplatinexposition erkennbar, diese ist jedoch nicht signifikant (siehe Fig. 5B). Auch dies spricht dafür, dass die Zytotoxizität von Cisplatin in den RT-112-Zellen weniger von nukleären DNA-Schäden abhängt und somit bei der Resistenzentwicklung Mechanismen der DNA-Schadensantwort weniger relevant sind als in den J-82-Zellen.

4.3.2 Veränderungen der Zellzyklusregulation in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen

Neben Unterschieden in der Entstehung und Detektion von DNA-Schäden (siehe 4.3.1) zeigten die Cisplatin-resistenten Zellen eine deutlich veränderte Zellzyklusregulation in Reaktion auf Cisplatin-induzierte DNA-Schäden. Durchflusszytometrisch ergab sich 72 Stunden nach Cisplatinexposition mit der jeweiligen IC₅₀ in der Zellzyklusanalyse ein

deutlicher Anstieg der G₂-/M-Fraktion bei den Cisplatin-resistenten Varianten J-82^R und RT-112^R im Vergleich zu ihren Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen (siehe Fig. 4B). Auch die Cisplatin-sensitiven RT-112-Zellen wiesen einen Anstieg der G₂-/M-Fraktion nach Cisplatinexposition mit der IC₅₀ auf, der jedoch weniger ausgeprägt ist als in den Cisplatin-resistenten Zelllinien. Offenbar wird infolge der Cisplatin-induzierten DNA-Schäden ein Zellzyklusarrest am G₂-/M-Checkpoint eingeleitet. Nach Exposition gegenüber der IC₈₀ wurde hingegen weder in den Cisplatin-sensitiven noch den Cisplatin-resistenten Varianten ein Anstieg der G₂-/M-Fraktion beobachtet. Wahrscheinlich sind die DNA-Schäden bei der höheren Cisplatinkonzentration so gravierend, dass überwiegend die Apoptose eingeleitet wird, was sich auch in der deutlich erhöhten SubG₁-Fraktion 72 Stunden nach Behandlung mit der IC₈₀ in allen vier Zelllinien widerspiegelt (siehe Fig. 4A). Insgesamt zeigten die RT-112^R-Zellen einen größeren Anstieg der G₂-/M-Fraktion als die J-82^R-Zellen; einhergehend ist phosphoryliertes CHK1 im Western Blot nach Cisplatinbehandlung in den RT-112^R-Zellen ausgeprägter detektierbar als in den J-82^R-Zellen (siehe Fig. 6). Es ist jedoch möglich, dass die Einleitung eines G₂-/M-Arrests in den J-82^R-Zellen als Resistenzmechanismus ebenso relevant ist wie in RT-112^R und die geringere Aktivierung der CHK1 mit nachfolgend geringerem Zellzyklusarrest auf die reduzierte Anzahl von DNA-Schäden (erkennbar an der reduzierten Anzahl an γH2AX- und 53BP1-Foci; siehe 4.3.1) und die aus diesem Grund insgesamt abgeschwächte Aktivierung der DNA-Schadensantwort zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Cisplatin Dosen zu ermitteln, die die gleiche Anzahl an Intrastrang-Crosslinks in RT-112^R und J-82^R verursachen und die Zellzyklusregulation in Reaktion auf diese Dosierungen zu vergleichen.

Differenzierte Effekte auf die Zellzyklusregulation in Abhängigkeit vom Selektionsschema

Unterschiedliche Selektionsmechanismen Cisplatin-resistenter Urothelkarzinomzellen führen bemerkenswerterweise zu differenzierten Effekten auf die Zellzyklusregulation der resistenten Zellen: Eine 72-stündige kontinuierliche Cisplatinexposition mit einer Konzentration, die deutlich unterhalb der IC₅₀ der Cisplatin-resistenten Zellen lag, führte bei Skowron et al. zu einer Akkumulation der Cisplatin-resistenten Zellen in der S-Phase [643]. In der hier vorliegenden Studie wurden die Cisplatin-resistenten Zellen ebenfalls mit einer Dosis deutlich unterhalb ihrer IC₅₀ behandelt, nämlich mit der IC₅₀ der Ursprungszellen. Dies führte nach 72 Stunden zu einer signifikanten Zunahme der G₂/M-Fraktion in der Durchflusszytometrie (siehe Fig. 4B). Bemerkenswert ist, dass sich beim Vergleich verschiedener Zelllinien mit erworbener Cisplatinresistenz in der hier vorliegenden Arbeit sowie bei Skowron et al. innerhalb der jeweiligen Studie ähnliche Ergebnisse bezüglich der Zellzyklusregulation ergeben haben. Trotz Verwendung annähernd äquitoxischer Dosen (ca. 0,3- bis 0,5-fache IC₅₀) zeigten sich im Vergleich zwischen den Studien jedoch die genannten Unterschiede in der Zellzyklusregulation. Sowohl in der hier vorliegenden Arbeit als auch bei Skowron et al. wurden die Zelllinien

J-82 und RT-112 verwendet, sodass ein Zelllinien-spezifisches Zellzyklusverhalten als Ursache unwahrscheinlich ist. Somit sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Zellzyklusprogression infolge der Exposition gegenüber Cisplatin vom Selektionsschema abhängig ist. Dies könnte ein Argument dafür sein, das Applikationsschema von Cisplatin in präklinischen Versuchen möglichst nah an der klinischen Verabreichung im Rahmen von Chemotherapie-Zyklen zu orientieren.

4.3.3 Pharmakologische Modulation der DNA-Schadensantwort als Strategie zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen

Nachdem sich in der hier vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung der DNA-Schadensantwort an der Entstehung erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen ergeben hatten, wurden die Effekte verschiedener Modulatoren der DNA-Schadensantwort auf die Cisplatinempfindlichkeit in den J-82^R-Zellen evaluiert (siehe Tab. 1). Hierzu wurden ein Inhibitor der Initiatorkinasen der DNA-Schadensantwort ATM und ATR, ein unselektiver Checkpointkinase-Inhibitor, der CHK1 und CHK2 inhibiert, ein selektiver Checkpointkinase-Inhibitor für CHK1, ein Inhibitor der Kinase Wee1 und der CDK-Inhibitor Roscovitin verwendet. Zudem wurde die Wirksamkeit des Multikinase-Inhibitors Sorafenib untersucht, der unter anderem Raf und Tyrosinkinase des VEGF-Signalwegs inhibiert [826] und in der Therapie fortgeschrittener Nierenzellkarzinome, nicht resektabler hepatozellulärer Karzinome sowie Radiojodtherapie-refraktärer differenzierter Schilddrüsenkarzinome klinisch etabliert ist [827]. Inhibitoren der DNA-Reparaturproteine PARP1 und RAD51 wurden ebenfalls eingesetzt, um deren Auswirkung auf die erworbene Cisplatinresistenz der Urothelkarzinomzellen zu evaluieren. Auch die Auswirkung der Applikation von Lovastatin, eines Inhibitors der Cholesterinbiosynthese, auf die Cisplatinempfindlichkeit wurde untersucht. Lovastatin wird klinisch als Lipidsenker eingesetzt, jedoch in präklinischen Modellen auch als Tumorthapeutikum und Chemosensitizer erprobt [828]. Für den Inhibitor von ATM und ATR, die Inhibitoren der DNA-Reparaturproteine, sowie für Sorafenib, Roscovitin und Lovastatin ergaben sich keine relevanten Unterschiede bezüglich ihrer Zytotoxizität im Vergleich zwischen den Cisplatinempfindlichen J-82-Zellen und den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen (siehe Tab. 1). Die nach pharmakologischer Inhibition der Checkpointkinasen detektierten Resultate erbrachten jedoch Hinweise auf ein besseres Ansprechen der Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen im Vergleich zu den Cisplatinempfindlicheren J-82-Zellen. Beim Einsatz des unselektiven Checkpointkinase-Inhibitors AZD7762 zeigte sich eine Tendenz zum besseren Ansprechen in den J-82^R-Zellen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Der selektive CHK1-Inhibitor LY2603618 hingegen war in den J-82^R-Zellen signifikant wirksamer als in den Cisplatinempfindlichen J-82-Zellen und führte vor allem in den Cisplatin-resistenten Zellen bereits in geringer Dosierung zu einem ausgeprägten zytotoxischen Effekt. Eine subsignifikante Tendenz zu einem besseren Ansprechen in den

Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen zeigte sich auch für den Wee1-Inhibitor MK-1775 (siehe Fig. 8C). Insgesamt scheint somit pharmakologische Modulation von Kinasen, die die Zellzyklusprogression beeinflussen, als Therapieansatz für Cisplatin-resistente Urothelkarzinome am ehesten vielversprechend zu sein.

4.3.3.1 Checkpointkinase-Inhibitoren

4.3.3.1.1 Wirksamkeit von CHK-Inhibitoren bei der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin in präklinischen Studien

In Cisplatin-resistenten Tumorzellen konnte *in vitro* die Aktivierung von CHK1 und Wee1 beobachtet werden [829, 830]. CHK1-Inhibitoren erhöhen in präklinischen Studien die Sensitivität von zahlreichen Tumorzelllinien gegenüber Cisplatin, darunter kleinzellige Lungenkarzinomzellen [831–834], Ovarialkarzinomzellen [835], Mammakarzinomzellen [836] HCC-Zellen [837] Osteosarkomzellen [838, 839], Neuroblastomzellen [840], Medulloblastomzellen [841] und Nasopharynxkarzinomzellen [842]. WYC0209, ein synthetisches Flavonoid-Derivat, das die Phosphorylierung von CHK1, jedoch nicht von CHK2 inhibiert, kann Urothelkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* gegenüber Cisplatin sensitivieren [843] und urotheliale Tumorstammzellen bekämpfen [844]. Zudem reduziert WYC0209 die Expression des Efflux-Transporters P-Glykoprotein [843], der unter anderem die intrazelluläre Konzentration von Doxorubicin, Methotrexat und Vinblastin verringert, sodass eine Chemosensitivierung auch gegenüber den Chemotherapeutika, die im MVAC-Schema in Kombination mit Cisplatin eingesetzt werden, zu erwarten wäre. Darüber hinaus erhöhen verschiedene CHK1-Inhibitoren auch die Effektivität einer Gemcitabin-Therapie in präklinischen Versuchen *in vitro* und *in vivo* [845–848]. Außerdem wurde in präklinischen Studien die Sensitivierung von Blasen-Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie durch CHK1-Inhibition beobachtet [849]. Somit ist neben einer synergistischen Wirkung mit Cisplatin durch CHK1-Inhibitoren auch eine Sensitivierung gegenüber anderen in der Erstlinientherapie eingesetzten Zytostatika sowie einer ergänzenden Strahlentherapie zu erwarten, was CHK1-Inhibitoren für eine Kombinationstherapie attraktiv erscheinen lässt. In verschiedenen Tumorentitäten haben sich *in vitro* Hinweise auf einen synergistischen Effekt bei Kombination von CHK1-Inhibitoren mit Cisplatin und PARP-Inhibitoren ergeben [836, 839, 850]. Die Expression von CHK1 und Wee1 wird durch miRNAs beeinflusst [851, 852], sodass auch diese als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Cisplatin in Betracht gezogen werden sollten.

4.3.3.1.2 Tumorzellen mit erhöhter Suszeptibilität gegenüber CHK1-Inhibitoren

Tumorzellen mit mutiertem p53 sind *in vitro* besonders sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Checkpointkinase-Inhibitoren [853, 854]. Außerdem sind p53-Mutationen häufig mit Cisplatinresistenz assoziiert (siehe 1.3.3.1). In p53-mutierten HNSCC-Zellen führt Checkpointkinase-Inhibition *in vitro* zur Sensitivierung gegenüber Cisplatin, während dieser Effekt in p53-Wild-Typ-Zellen nicht beobachtet wurde [855]. Der

Synergismus zwischen Cisplatin und CHK1-Inhibitoren ist in kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (SCLC-Zellen) [832] und Kolonkarzinomzellen [853] ohne funktionsfähiges p53 höher. Hinweise auf eine erhöhte Sensitivität von Tumorzellen mit p53-Mutation gegenüber CHK1-Inhibitoren haben sich auch für Urothelkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* ergeben [847]. Gegebenenfalls könnten Patienten mit Urothelkarzinomen, die eine p53-Mutation aufweisen, somit besonders von einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und Checkpointkinase-Inhibitoren profitieren. Dies betrifft immerhin 55-60% der Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen (siehe 1.3.3.1). Weiterführende Studien zu Checkpointkinase-Inhibitoren in Urothelkarzinomen sollten daher unbedingt den p53-Mutationsstatus berücksichtigen. In Urothelkarzinomzellen mit kombinierter p21-Mutation und p53-Mutation sind CHK1-Inhibitoren besonders effektiv. Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinie RT-112 weist im Gegensatz zur Zelllinie J-82 eine Kombination aus einer p21- und p53-Mutation auf [847] (siehe auch 4.3.3.1.3).

Darüber hinaus führt c-Myc-Amplifikation, die auch in fortgeschrittenen Urothelkarzinomzellen häufig vorliegt [856], in Medulloblastomzellen [841] und SCLC-Zellen [833] zu einem verbesserten Ansprechen auf CHK1-Inhibition. Somit liegt nahe, dass Urothelkarzinom-Patienten mit Nachweis einer c-Myc-Amplifikation besonders von einer Therapie mit CHK1-Inhibitoren profitieren könnten. Die Selektion geeigneter Patientenkollektive könnte somit für den erfolgreichen klinischen Einsatz von Checkpointkinase-Inhibitoren im Zuge einer individualisierten Tumorthherapie entscheidend sein.

4.3.3.1.3 Bedeutung der erhöhten Sensitivität der Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen gegenüber CHK1-Inhibitoren

Von den verwendeten Inhibitoren der DNA-Schadensantwort wies nur der selektive CHK1-Inhibitor LY26003618 (Rabusertib) eine signifikant erhöhte Zytotoxizität in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen auf. Möglicherweise ist die erkennbare Tendenz zur verbesserten Wirksamkeit des unselektiven Checkpointkinase-Inhibitors AZD7762 in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen auf die Inhibition der CHK1 zurückzuführen. Dass mit Cisplatin vorbehandelte Zellen ein verbessertes Ansprechen auf Inhibitoren der CHK1 aufweisen, ist insofern plausibel, als die CHK1 vorwiegend durch ATR infolge von Replikationsstress aktiviert wird, während die CHK2 überwiegend durch ATM in Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird (siehe 1.3.1 und 1.3.4). Die für die Zytotoxizität von Cisplatin wesentlichen DNA-Läsionen verursachen in erster Linie Replikationsstress während der S-Phase des Zellzyklus und erst sekundär DNA-Doppelstrangbrüche, sodass für die DNA-Schadensantwort infolge Cisplatin-induzierter DNA-Crosslinks die Aktivierung der Checkpointkinase 1 durch ATR besonders relevant ist. Die Kombination aus Cisplatin und LY26003618 erwies sich jedoch weder in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen noch in den Cisplatin-sensitiven J-82-Zellen als signifikant effektiver als die Behandlung mit Cisplatin allein (siehe Fig. 8F). Dies impliziert, dass CHK1-Inhibitoren

weniger als chemosensitivierende Medikamente gegenüber Cisplatin für fortgeschrittene Urothelkarzinome in Betracht kommen, sondern eher in der Zweitlinientherapie bei Urothelkarzinomen mit erworbener Cisplatinresistenz und fortgeschrittener Epithelial-Mesenchymaler Transition zum Einsatz kommen könnten.

Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass Veränderungen der DNA-Schadensantwort in den als eher mesenchymal charakterisierten J-82^R-Zellen für die Cisplatinresistenz bedeutsamer sind als in den als epithelial charakterisierten RT-112^R-Zellen (siehe 4.3.1). Andererseits war insbesondere die Aktivierung der Checkpointkinase 1 in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen ausgeprägter als in den Cisplatin-sensitiveren RT-112-Zellen, während CHK1 in den J-82^R-Zellen tendenziell weniger aktiviert wurde als in den J-82-Zellen (siehe Fig. 6). Einhergehend zeigte sich in den RT-112^R-Zellen ein besonders deutlicher G₂/M-Arrest (siehe Fig. 4B). Dies deutet darauf hin, dass in den RT-112^R-Zellen die Aktivierung der Checkpointkinase 1 einen ausgeprägten G₂/M-Arrest bedingt, wodurch die Zellen vor Cisplatin-induzierter Apoptose bewahrt werden. Diese Hypothese wird auch durch die deutlich reduzierte SubG₁-Fraktion in den RT-112^R-Zellen im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven RT-112-Zellen gestützt (siehe Fig. 4A). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass CHK1-Inhibitoren in Urothelkarzinomzellen mit einer Kombination aus p21- und p53-Mutation, wie sie in der Zelllinie RT-112 vorliegt, besonders effektiv sind [847] (siehe 4.3.3.1.2). Es wäre daher sehr interessant gewesen zu klären, ob die RT-112^R-Zellen durch den CHK1-Inhibitor gegenüber Cisplatin sensitiviert werden können. Da die RT-112^R-Zellen nach dem Einfrieren nicht erneut kultivierbar waren, konnte diese Frage in der hier vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Zukünftige *in vitro* Experimente und *in vivo* Studien mit orthotopen Tumormodellen mit mehreren Cisplatin-resistenten Zelllinien sind erforderlich, um die Beziehung zwischen Epithelial-Mesenchymaler Transition und Veränderungen der DNA-Schadensantwort im Zuge der erworbenen Cisplatinresistenz weiter zu untersuchen und die Wirksamkeit von CHK1-Inhibitoren in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen zu untermauern.

4.3.3.1.4 Erschwerte klinische Etablierung von CHK1-Inhibitoren

In klinischen Studien haben sich variable Bioverfügbarkeit sowie Dosis-limitierende Toxizitäten, insbesondere Kardiotoxizität und Hämatotoxizität, als Probleme bei der klinischen Etablierung von Checkpointkinase-Inhibitoren erwiesen [857]. Zudem blieben die Effekte der ersten in klinischen Studien erprobten CHK1-Inhibitoren hinter den Erwartungen zurück [858]. Der in der hier vorliegenden Arbeit verwendete unselektive Checkpointkinase-Inhibitor AZD7762 kann beispielsweise klinisch nicht eingesetzt werden wegen inakzeptabler Kardiotoxizität [859]. Der hier ebenfalls verwendete CHK1-selektivere Inhibitor LY2603618 (Rabusertib) ist aufgrund struktureller Veränderungen weniger kardiotoxisch als AZD7762 [858]. Trotz insgesamt vielversprechender präklinischer Resultate beim Einsatz von Rabusertib [860–862] konnten in klinischen Phase-II-Studien bei NSCLC-Patienten in Kombination mit Permetrexed [863] bzw. Pankreaskarzinom-Patienten in Kombination mit Gemcitabin [864] keine signifikanten

Vorteile von Rabusertib nachgewiesen werden. Die Verabreichung von Rabusertib zusätzlich zu Cisplatin/Permetrexed erbrachte bei NSCLC-Patienten zwar einen deutlichen Vorteil für das progressionsfreie Überleben, jedoch kann diese Kombination aufgrund häufiger thromboembolischer Komplikationen klinisch nicht etabliert werden [865]. In keiner klinischen Studie konnte ein vollständiges Ansprechen eines soliden Tumors auf die Kombination von Rabusertib mit den verabreichten Zytostatika dokumentiert werden [857]. Zudem zeigte sich, dass Rabusertib einer großen patientenbezogenen pharmakokinetischen Variabilität unterliegt, wodurch die Bioverfügbarkeit limitiert sein kann [857]. Dies könnte erklären, warum die klinischen Ergebnisse sich nicht mit den Erwartungen deckten, die sich aus den präklinischen Studien mit LY2603618 (Rabusertib) ergeben hatten. Die genannten Schwierigkeiten bei der klinischen Etablierung der ersten Checkpointkinase-Inhibitoren führten zur Entwicklung weiterer Checkpointkinase-Inhibitoren, darunter LY2606368 (Prexasertib), welches aktuell in klinischen Studien erprobt wird und ein vielversprechender Kandidat für einen klinisch effektiven CHK-Inhibitor zu sein scheint [857]. In vielen laufenden klinischen Studien werden auch Kombinationstherapien aus Checkpointkinase-Inhibitoren und Zytostatika eingesetzt [866]. Zudem wurden oral bioverfügbare CHK1-Inhibitoren entwickelt [866], die aufgrund ihrer einfachen Applikation klinische Vorteile insbesondere im Hinblick auf die Lebensqualität der Patienten bieten könnten.

Bislang konnten Checkpointkinase-Inhibitoren für keine Tumorentität eine klinische Zulassung erlangen. Für den Nutzen von CHK1-Inhibitoren bei Patienten mit fortgeschrittenen Urothelkarzinomen liegen bislang kaum klinische Daten vor. Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass insbesondere Patienten mit Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomen in der Zweitlinientherapie von CHK1-Inhibitoren profitieren könnten. Deshalb sollte im Zuge der fortschreitenden Entwicklung von CHK1-Inhibitoren mit einem verbesserten Nebenwirkungsprofil und höherer klinischer Effektivität auch deren Nutzen in fortgeschrittenen Urothelkarzinomen weiter untersucht werden, wobei in Betracht gezogen werden muss, dass ggf. nur ausgewählte Patientengruppen von den CHK1-Inhibitoren profitieren (siehe 4.3.3.1.2).

4.4 Bedeutung von DNA-Reparaturfaktoren für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen

4.4.1 Beteiligung in dieser Arbeit untersuchter DNA-Reparaturfaktoren an der Resistenzentwicklung

Die mittels qRT-PCR in dieser Studie untersuchten DNA-Reparaturfaktoren ERCC1, BRCA1, BRCA2, XRCC3, MSH2, MLH1 und POLH scheinen für die Resistenzentwicklung in den eher epithelialen RT-112-Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Da sich jedoch in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen eine ausgeprägte Erhöhung der G₂/M-Fraktion in der Durchflusszytometrie zeigte und zudem eine erhöhte Proteinexpression

der phosphorylierten, also aktivierten CHK1 detektiert wurde, ist von einer Beteiligung der DNA-Schadensantwort an der Resistenzentwicklung der RT-112-Zellen auszugehen. Auch in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen konnte keine relevante Veränderung in der mRNA-Expression der genannten DNA-Reparaturfaktoren detektiert werden. Eine deutliche zeitliche Dynamik der Anzahl der γ H2AX-Foci nach Cisplatinexposition in den J-82^R-Zellen (Reduktion der Foci 24 Stunden nach Cisplatinexposition im Vergleich zu vier Stunden nach Cisplatinexposition; siehe 4.3.1) deutet jedoch auf eine erhöhte Reparaturkapazität der J-82^R-Zellen hin. Ähnliche Beobachtungen wurden auch durch Skowron et al. in Cisplatin-resistenten J-82-Zellen gemacht, die durch kontinuierliche Cisplatinexposition selektioniert wurden. Einhergehend zeigte sich bei Skowron et al. in den Cisplatin-resistenten J-82-Zellen ein mRNA-Expressionsprofil, das für eine erhöhte Reparaturkapazität dieser Zellen spricht: Während eine signifikante Hochregulierung der ERCC1-Expression beobachtet werden konnte, waren die Mismatch-Reparaturfaktoren MLH1 und MSH2, die Cisplatin-induzierte DNA-Schäden zwar erkennen, jedoch nicht reparieren können und somit andere Reparaturmechanismen blockieren (siehe 1.4.1.2), herunterreguliert [643]. Insgesamt stützen die Ergebnisse von Skowron et. al somit die Hypothese, dass bei der erworbenen Resistenzentwicklung der den mesenchymalen Phänotyp repräsentierenden J-82-Zellen DNA-Reparaturmechanismen von Bedeutung sind (siehe 4.3.1). Für weitere untersuchte Zelllinien (unter anderem RT-112) zeigten sich hingegen auch bei Skowron et al. keine Veränderungen, die ein schlüssiges Bild bezüglich der Entwicklung von Cisplatinresistenz durch veränderte Expression von DNA-Reparaturfaktoren ergaben [643]. Es besteht die Möglichkeit, dass die Funktionalität der DNA-Reparaturproteine posttranslational reguliert wird und sich Veränderungen aus diesem Grund nicht in der mRNA-Expression, die durch die qRT-PCR bestimmt wurde, widerspiegeln. Vorstellbar ist beispielsweise, dass der Abbau von DNA-Reparaturfaktoren beeinträchtigt ist oder posttranslationale Modifikationen die Aktivität der Reparaturfaktoren beeinflussen.

4.4.2 Potentielle Beteiligung hier nicht untersuchter DNA-Reparaturfaktoren an der Resistenzentwicklung - Ausblick

Zudem ist denkbar, dass Reparaturfaktoren, die in dieser Arbeit bzw. bei Skowron et al. nicht untersucht wurden, an der Resistenzentwicklung beteiligt sind. Potentielle Kandidaten werden im Folgenden beleuchtet. Eine Beteiligung von DNA-Reparaturmechanismen an der Resistenzentwicklung der RT-112- oder J-82-Zellen kann somit trotz fehlender konkreter Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

4.4.2.1 Fanconi-Anämie-Signalweg

Interessant wäre zum Beispiel, die Beteiligung des Fanconi-Anämie-Signalwegs an der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin in Urothelkarzinomzellen zu untersuchen. Interstrang-Crosslinks machen zwar nur einen geringen Anteil der Cisplatin-induzierten DNA-Addukte aus (siehe 1.2.3.1), sind aber die Läsionen mit den ausgeprägtesten

sterischen Folgen für die DNA und sind hoch zytotoxisch [69]. Welche DNA-Läsionen für die Zytotoxizität von Cisplatin am relevantesten sind, wird kontrovers diskutiert. Es ist wahrscheinlich, dass neben den bei weitem am häufigsten vorkommenden Intrastrang-Crosslinks, die relativ leicht durch Nukleotid-Exzisionsreparatur beseitigt werden können, auch die Interstrang-Crosslinks, die über den FA-Signalweg repariert werden, einen relevanten Anteil an der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin haben [85]. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, dass Komponenten des FA-Signalwegs, insbesondere der Schlüsselfaktor FANCD2, mit Cisplatinresistenz assoziiert sind: FANCD2-Überexpression schwächt die Cisplatinwirkung in NSCLC-Zellen *in vitro* ab, während Suppression von FANCD2 mittels RNA-Interferenz die Cisplatinsensitivität erhöht [867, 868]. Auch *Knockdown* von FANCF und FANCL kann Cisplatin-resistente NSCLC-Zellen *in vitro* resensitivieren [868]. In einer weiteren Studie konnte Transfektion mit einem Adenovirus, das dominant-negatives FANCA trägt, NSCLC-Zellen *in vivo* gegenüber Cisplatin sensitivieren [869]. Naturstoffe, die den FA-Signalweg inhibieren, können die Sensitivität von Mamma- und Ovariakarzinomzellen [870] sowie NSCLC-Zellen [867] gegenüber Cisplatin *in vitro* verbessern. Für Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-/Hals-Bereichs und der Lunge konnte gezeigt werden, dass FANCD2-*Knockdown* *in vitro* zu erhöhter Cisplatinsensitivität führt [206]. Interessanterweise wird die Expression von FANCD2 durch Δ Np63 hochreguliert [206]. Insofern könnten Δ Np63 und FANCD2 Ansätze für zielgerichtete Therapien sein, um die Cisplatinresistenz in Tumorzellen zu erhöhen. Die Bedeutung des FA-Signalwegs bzw. von FANCD2 im Speziellen für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomen ist jedoch noch unklar. Die Aktivität des FA-Signalwegs kann unter anderem durch die immunhistochemische Detektion von FANCD2-Foci quantifiziert werden [871]. Eine Quantifizierung von FANCD2-Foci könnte auch aufschlussreich sein, um eine mögliche Beteiligung des FA-Signalwegs an der Resistenzentwicklung in den RT-112- und J-82-Zellen zu untersuchen.

4.4.2.2 DNA-Polymerase ζ

Ein weiterer DNA-Reparaturfaktor, der in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, für den es jedoch Hinweise gibt, dass er Cisplatinresistenz bedingen kann, ist die DNA-Polymerase ζ [344]. Die Polymerase ζ ist nicht nur an der Transläsionssynthese über Intrastrang-Crosslinks hinweg beteiligt (siehe 1.4.1.3), sondern auch an der Reparatur von Interstrang-Crosslinks im FA-Signalweg (siehe 1.4.3). In Reaktion auf Cisplatinexposition wird die mRNA-Expression der DNA-Polymerase ζ *in vitro* hochreguliert [872], was zu vermehrter Transläsionssynthese führt und zudem genomische Instabilität und somit die Entstehung Cisplatin-resistenter Tumorzellen begünstigt [872]. Bei Zervixkarzinom-Patientinnen, die mit einer Platin-basierten Radiochemotherapie behandelt wurden, geht positive Proteinexpression der Polymerase ζ mit einer schlechteren Prognose einher [873]. Überexpression von Rev3L, der katalytischen Untereinheit der Polymerase ζ , führt in Zervixkarzinom- [874] und Gliomzellen [875] *in vitro* zu Cisplatinresistenz, während Suppression von Rev3L durch RNA-Interferenz die Cisplatinsensitivität erhöht. Das

Potential der Rev3L-Suppression zur Chemosensitivierung gegenüber Cisplatin konnte für Cisplatin-resistente NSCLC-Tumoren *in vivo* bestätigt werden [876, 877]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in NSCLC-Zellen Rev3L durch die miRNA miR-29a negativ reguliert wird; somit bedingt erhöhte Expression der miR-29a Cisplatinsensitivität, während Herunterregulierung dieser miRNA zu erhöhter Expression von REV3L führt und Cisplatinresistenz vermittelt [878]. In einem ersten Schritt zur Evaluierung der Bedeutung der DNA-Polymerase ζ für die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen wäre es interessant, die mRNA- und Proteinexpression der DNA-Polymerase ζ in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen mit der Expression in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen zu vergleichen.

4.5 Bedeutung von Cisplatin-Resistenzmechanismen mit Bezug zur Apoptose in Urothelkarzinomzellen

Da die Apoptose neben einem Zellzyklusarrest und der Einleitung der DNA-Reparatur eine weitere unmittelbare Konsequenz der DNA-Schadensantwort sein kann, sind Veränderungen im Ablauf der Apoptose für die Fragestellung dieser Studie von besonderer Relevanz. Proteine mit Bezug zur Apoptose stellen somit ebenfalls mögliche Angriffspunkte zielgerichteter Therapien zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz dar. Pharmakologische Modulation der DNA-Schadensantwort hat zudem direkte Auswirkungen auf die Apoptose.

4.5.1 Veränderungen der SubG₁-Fraktion in der Durchflusszytometrie in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen

Als orientierender Indikator zur Quantifizierung apoptotischer Zellen kann aufgrund der Fragmentierung der DNA während der Apoptose die SubG₁-Fraktion in der Propidiumiodid-Durchflusszytometrie herangezogen werden. Nach Behandlung mit äquimolaren Cisplatindosen (IC₅₀ und IC₈₀) wiesen die RT-112^R-Zellen in der Durchflusszytometrie eine signifikant geringere SubG₁-Fraktion auf als die Cisplatin-sensitiven RT-112-Zellen (siehe Fig. 4A). Es zeigte sich somit eine geringere Fragmentierung der DNA, was auf eine reduzierte Apoptose in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen hindeutet. In der qRT-PCR ergab sich keine relevante Veränderung der untersuchten mit der Apoptose assoziierten Faktoren zwischen RT-112 und RT-112^R bis auf eine paradoxe Hochregulierung von XAF1 (siehe Fig. 7B und Kapitel 4.5.2). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Reduktion der SubG₁-Fraktion in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen direkte Folge der reduzierten Toxizität von Cisplatin in diesen Zellen ist und nicht auf Veränderungen im Ablauf der Apoptose zurückzuführen ist. In den J-82^R-Zellen hingegen war die SubG₁-Fraktion bei äquimolaren Cisplatindosen vergleichbar zu den Cisplatin-sensitiveren J-82-Zellen (siehe Fig. 4A). Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da sich die Viabilität der Zellen zumindest bei Behandlung mit der IC₅₀ der Ursprungszellen signifikant unterscheidet (siehe Fig. 3D). Möglicherweise ist die hohe

SubG₁-Fraktion auf eine Zunahme der genomischen Instabilität der J-82^R-Zellen zurückzuführen. Zu dieser Theorie passt, dass sich bereits in der Kontrolle (ohne Cisplatinexposition) eine höhere SubG₁-Fraktion in den J-82^R-Zellen zeigte als in den Ursprungszellen. Tatsächlich wurden während der Selektion der Cisplatin-resistenten Zellen bei J-82 vermutlich polyploide Riesenzellen beobachtet, was ebenfalls für zunehmende genomische Instabilität im Verlauf der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin spricht. Bis auf die paradoxe Hochregulierung von XAF1 (siehe 4.5.2) wiesen die J-82^R-Zellen in der qRT-PCR ebenfalls keine Veränderungen Apoptose-assoziiierter Faktoren im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen auf (siehe Fig. 7A).

4.5.2 Bedeutung der paradoxen Hochregulierung von XAF1 für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen

Überraschenderweise zeigte sich sowohl in den RT-112^R als auch in den J-82^R-Zellen XAF1 signifikant und biologisch relevant erhöht (siehe Fig. 7). Aufgrund der proapoptotischen Funktion von XAF1 wäre in den Cisplatin-resistenten Zellen eher eine Herunterregulierung von XAF1 zu erwarten gewesen. Bemerkenswerterweise zeigte sich bereits nach einmaliger Behandlung mit Cisplatin für 72 Stunden in den nativen RT-112- bzw. J-82-Zellen eine Induktion der XAF1-Expression (siehe Fig. 2C und 2D). Dies ist wahrscheinlich auf die Einleitung der Apoptose in diesen Zellen zurückzuführen. Es ist vorstellbar, dass die Hochregulierung von XAF1 in den RT-112^R- und J-82^R-Zellen zwar auf die regelmäßige Cisplatinexposition zurückzuführen ist, jedoch unabhängig von der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass XAF1 bei der Resistenzentwicklung eine Rolle einnimmt, die bislang unzureichend charakterisiert ist. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Funktionen von XAF1 entdeckt, die nicht unmittelbar auf die Inhibition von XIAP zurückzuführen sind [174](siehe 4.5.2.1 und 4.5.2.2).

4.5.2.1 Rolle von XAF1 als Zellzyklusregulator

Neben seiner Funktion als Inhibitor von XIAP wurde XAF1 als Zellzyklusregulator charakterisiert, der durch Aktivierung der Checkpointkinase 1 und Inhibition der Phosphatase Cdc25c einen Zellzyklusarrest insbesondere in der G₂-Phase des Zellzyklus vermittelt [879]. Diese Funktion von XAF1 könnte Cisplatinresistenz begünstigen, indem die Tumorzellen durch den Zellzyklusarrest Zeit für DNA-Reparaturprozesse gewinnen. Zu dieser Hypothese würde passen, dass 72 Stunden nach Cisplatinexposition sowohl in den RT-112^R- als auch in den J-82^R-Zellen die G₂/M-Fraktion im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangszellen deutlich größer ist (siehe Fig. 4B), was einen ausgeprägteren Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase in den Cisplatin-resistenten Zelllinien impliziert. Auch in Magenkarzinomzellen führte Überexpression von XAF1 zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase [880]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in Ovarialkarzinomzellen beobachtet, dass Plasmid-vermittelte Überexpression von XAF1 zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase führt [597]. Zusammenfassend ist

anzunehmen, dass die Funktion von XAF1 als Zellzyklusregulator die Proliferation, DNA-Reparatur und Apoptose sowohl von Urothelkarzinomen als auch von anderen Tumorentitäten beeinflusst, was wiederum Auswirkungen auf deren Chemosensitivität hat. Aus diesem Grund sind weitere Studien zur Bedeutung der XAF1-Expression für die Zellzyklusregulation sowie die Cisplatinempfindlichkeit von Tumorzellen im Allgemeinen und Urothelkarzinomzellen im Speziellen erforderlich. In einem ersten Schritt sollte neben der mRNA-Expression auch die Proteinexpression von XAF1 analysiert werden. Zudem wäre es interessant zu beobachten, ob *Knockdown* von XAF1 den G₂/M-Arrest in den J-82^R-Zellen 72 Stunden nach Cisplatinexposition abschwächen würde und ob der *Knockdown* mit einer Resensitivierung gegenüber Cisplatin einhergehen würde.

4.5.2.2 Rolle von XAF1 bei der Umverteilung von XIAP in den Nukleus

Neben seiner Funktion als direkter Antagonist von XIAP bedingt XAF1 eine Umverteilung von XIAP in den Nukleus, wo XIAP seine antiapoptotische Wirkung nicht entfalten kann [583] (siehe 1.5.2 b). In den letzten Jahren hat sich Evidenz dafür ergeben, dass XIAP neben seiner Funktion als Inhibitor von Caspasen im Zytoplasma auch Funktionen im Nukleus übernimmt und dort an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, wodurch XIAP zur Aktivierung des NFκB-, des PI3-Kinase/Akt- und des Wnt-Signalwegs sowie der Transkriptionsfaktoren c-Jun und E2F1 beiträgt [881]. Möglicherweise kann XAF1 somit durch Umverteilung von XIAP in den Nukleus zur Aktivierung von Signalwegen beitragen, die Cisplatinresistenz und EMT begünstigen. Zur Lokalisation von XIAP innerhalb der Zelle im Zusammenhang mit erworbener Cisplatinresistenz gibt es bis dato jedoch keine Erkenntnisse. Diesbezüglich könnte in der hier vorliegenden Arbeit eine immunhistochemische Analyse der Verteilung von XIAP innerhalb der Zelle weiterführen, indem man den Anteil von nukleär und zytoplasmatisch lokalisiertem XIAP zwischen den Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen und den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen vergleicht. Zudem wäre eine immunhistochemische Untersuchung von Zystektomiepräparaten bei Patienten, die neoadjuvant mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie behandelt wurden, im Hinblick auf die Verteilung von XIAP innerhalb der Zelle interessant. In einem ersten Schritt könnte evaluiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der subzellulären Verteilung von XIAP und dem Ansprechen auf eine Cisplatin-basierte neoadjuvante Chemotherapie besteht.

4.5.2.3 Bezugnahme auf andere Studien, in denen eine paradoxe Hochregulierung von XAF1 nachgewiesen wurde

Eine auf Grundlage der bisher bekannten Funktionen von XAF1 paradoxe Hochregulierung wurde bemerkenswerterweise auch bei der Resistenzentwicklung des Hirntumors Glioblastoma multiforme gegenüber dem Alkylanz Temozolomid beobachtet [882]. Die Resistenzentwicklung gegenüber Temozolomid ging mit epigenetischen Veränderungen einher: Die unbehandelten Glioblastomzellen waren initial im Bereich des

XAF1-Promotors hypermethyliert, verloren diese Methylierungen jedoch im Verlauf der Resistenzentwicklung gegenüber Temozolomid, sodass XAF1 verstärkt exprimiert wurde [882]. Durch siRNA-vermittelte Suppression von XAF1 konnte *in vitro* und *in vivo* ein verbessertes Ansprechen gegenüber Temozolomid erzielt werden [882]. Zudem konnte *in vitro* beobachtet werden, dass hohe XAF1-Expression Migration und Invasion der Glioblastomzellen begünstigt [882].

4.5.2.3.1 Hypothese zum Zusammenhang von XAF1 und EMT

Korrespondierend zu den oben genannten Ergebnissen kam es in dieser Arbeit während der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sowohl zu einem Anstieg der XAF1-Expression (siehe Fig. 7) als auch zu Veränderungen im Sinne der EMT mit einhergehender Zunahme der Vimentin-Expression (siehe Fig. 3C, 3E). Bemerkenswerterweise wurde bereits vor Cisplatinexposition in den als mesenchymal charakterisierten J-82-Zellen, die eine geringere E-Cadherin- und höhere Vimentin-Expression aufweisen als die RT-112-Zellen (siehe Fig. 1B), eine erheblich höhere XAF1-Expression detektiert als in den RT-112-Zellen (siehe Fig. 2A). Diese Korrelation kann zufällig sein; möglich wäre aber auch ein Zusammenhang zwischen der Höhe der XAF1-Expression und dem Grad der Epithelial-Mesenchymalen Transition in Urothelkarzinomzellen, der bisher nicht beschrieben ist. Diesbezüglich könnte weiterführen, eine XAF1-Tranfektion in verschiedenen Urothelkarzinom-Zelllinien vorzunehmen und diese auf Veränderungen im Sinne der EMT sowie deren Cisplatinresistenz zu untersuchen.

4.5.2.3.2 Prognostischer Einfluss einer paradoxen Hochregulierung von XAF1 in anderen Tumorentitäten

Hohe XAF1-Expression war bei Patienten mit Glioblastoma multiforme in der oben genannten Studie mit einer signifikant verkürzten Gesamtüberlebensdauer assoziiert [882]. Die Autoren führen diese Ergebnisse auf eine bislang unbekannte Aktivität von XAF1 zurück, die das Tumorwachstum begünstigt [882]. Eine inverse Korrelation zwischen XAF1-Expression und Gesamtüberlebensdauer wurde auch in histologisch als WHO Grad III klassifizierten Gliomen detektiert [883].

4.5.2.4 XAF1 als potentiell therapeutisches Ziel in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen

In Zusammenhang mit der letztgenannten Studie ist besonders interessant, dass Temozolomid in Gliomzellen einen Zellzyklusarrest in der G₂-Phase zur Folge hat [883, 884], genau wie Cisplatin in den Cisplatin-resistenten RT-112^R- und J-82^R-Zellen (siehe Fig. 4B). Suppression von XAF1 durch siRNA führte in den Gliomzellen zur Aufhebung dieses Zellzyklusarrests [883]. Mit diesen Resultaten im Einklang steht die Erkenntnis, dass XAF1 durch Aktivierung der Checkpointkinase 1 und Inhibition der Phosphatase Cdc25c einen Zellzyklusarrest insbesondere in der G₂-Phase des Zellzyklus vermittelt [879] (siehe 4.5.2.1). Diese Identifikation von XAF1 als Zellzyklusregulator erfolgte

allerdings in Karzinomzellen des Gastrointestinaltrakts [879]. Das wiederum könnte darauf hindeuten, dass die Rolle von XAF1 als Zellzyklusregulator nicht nur in Glioblastomzellen, sondern auch in soliden viszeralen Tumoren relevant ist - und auf diesem Weg auch Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen vermittelt werden kann. Insofern wäre es sehr interessant, die Effekte einer siRNA-vermittelten XAF1-Suppression auf die Cisplatin-induzierte Zellzyklusregulation in den Cisplatin-sensitiven Urothelkarzinomzellen und den daraus hervorgegangenen Zellen mit erworbener Cisplatinresistenz zu vergleichen. Wenn XAF1-Suppression tatsächlich zu einer Resensitivierung Cisplatin-resistenter Zellen führen würde, könnte sich daraus ein möglicher Therapieansatz ergeben, um Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen zu überwinden. Diesbezüglich könnte sich jedoch als problematisch erweisen, dass XAF1 in den meisten Geweben als Tumorsuppressor fungiert und Inhibition von XAF1 somit zur onkogenen Transformation von Normalgeweben beitragen könnte, sodass Sekundärtumore entstehen könnten.

4.5.2.5 Hochregulierung von XAF1 als möglicher Nebeneffekt eines übergeordneten Signalwegs

Insgesamt überwiegen in der Literatur bislang deutlich Studien, die entgegen den hier erhobenen Daten eine positive Korrelation zwischen der XAF1-Expression und der Cisplatinempfindlichkeit von Tumorzellen festgestellt haben (siehe dazu 1.5.2 b). Neben der Hypothese, dass die Hochregulierung von XAF1 in kausalem Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin und/oder der Epithelial-Mesenchymalen Transition steht, ist auch denkbar, dass XAF1 als Nebeneffekt im Zuge der Aktivierung eines übergeordneten Signalwegs hochreguliert wird, der Cisplatinresistenz vermittelt - dann wäre die Hochregulierung von XAF1 zwar mit Cisplatinresistenz assoziiert, jedoch nicht ursächlich an der Resistenzentwicklung beteiligt.

4.5.2.5.1 Zusammenhang zwischen dem JNK-Signalweg und der XAF1-Expression

Im Hinblick darauf ist erwähnenswert, dass der JNK1-Signalweg die Expression von XAF1 begünstigt, indem JNK1 den *Interferon Regulatory Factor 1* (IRF1) induziert, der an den Promotor von XAF1 bindet [885]. Zudem reguliert die JNK1 die Expression von p53 herunter [278] (siehe auch 1.3.5.1), was wiederum zur Hochregulierung von XAF1 beitragen könnte, da p53 die Expression von XAF1 supprimiert [587] (siehe auch 1.5.2 b). In dieser Arbeit zeigte sich jedoch zumindest die mRNA-Expression von p53 nicht relevant verändert zwischen den Cisplatin-resistenten Zelllinien und deren Ursprungszellen (siehe Fig. 7). Allerdings kann die Expression von XAF1 auch durch p73 beeinflusst werden: Im Zuge der ROS-vermittelten Aktivierung von JNKs wird die Proteinexpression von p73 und XAF1 in Blasentumorzellen hochreguliert [886]. Ob sich im Zuge der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin die mRNA-Expression von p73 in den Urothelkarzinomzellen verändert, wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht.

JNKs nehmen hinsichtlich der Cisplatinresistenz von Tumorzellen eine duale Rolle ein: Sie begünstigen einerseits die Expression proapoptotischer Gene, andererseits aber auch die Induktion von DNA-Reparaturfaktoren; zudem können sie durch Aktivierung von Autophagie und von kompensatorischer Zellproliferation in der Umgebung apoptotischer Zellen Cisplatinresistenz vermitteln (siehe 1.3.5.1). Es wird angenommen, dass kurzfristige Aktivierung von JNKs Überlebenssignale und Zellproliferation vermittelt, während lang andauernde Aktivierung die Einleitung der Apoptose begünstigt (siehe 1.3.5.1). Zu der Hypothese, dass durch die JNK1 Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen vermittelt wird, könnte somit passen, dass vier Stunden nach Cisplatinexposition die Aktivierung der JNK in den Cisplatin-resistenten RT-112^R-Zellen deutlich ausgeprägter ist als nach 24 Stunden (siehe 3, Abb. 5), was für eine transiente Aktivierung der JNK spricht. Insofern wäre es interessant, die Effekte eines JNK-Inhibitors auf die Chemosensitivität der Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen sowie die mRNA- und Proteinexpression von XAF1 zu untersuchen.

4.5.2.5.2 Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor STAT1 und der XAF1-Expression

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor STAT1 an der Aktivierung der Transkription von XAF1 in Kolonkarzinomzellen beteiligt ist [887]. Die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie werden durch Bindung von Zytokinen an Rezeptoren aktiviert, die mit Tyrosinkinassen assoziiert sind; diese Tyrosinkinassen werden Januskinasen (JAKs) genannt [888]. Die Januskinasen phosphorylieren und aktivieren die intrazytoplasmatische Domäne der Zytokinrezeptoren sowie die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie, die die weitere Signaltransduktion ausführen [888]. STAT1 hat sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Funktionen und nimmt in Tumorzellen daher eine duale Rolle ein [889]. Cisplatinexposition führt zur Aktivierung von STAT1 in Tumorzellen verschiedener Entitäten [890], was die Hochregulierung von XAF1 in den Cisplatin-resistenten RT-112^R- und J-82^R-Zellen erklären könnte. Es gibt Hinweise darauf, dass p53, ATM und c-Abl an der Aktivierung von STAT1 infolge einer Cisplatinexposition beteiligt sind [891]. Suppression von STAT1 führt in Cisplatin-resistenten Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen *in vitro* zur Sensitivierung gegenüber Cisplatin [892, 893], während Transfektion von STAT1-cDNA in Ovarialkarzinomzellen *in vitro* Cisplatinresistenz vermittelt [894]. Zudem ergab sich in Cisplatin-resistenten Nasopharynxkarzinomzellen *in vitro* eine erhöhte STAT1-Aktivierung, während Herunterregulierung von STAT1 die Cisplatinresistenz überwinden konnte [895]. Der JAK-Inhibitor Ruxolitinib resensitiviert Cisplatin-resistente HNSCC-Zellen *in vitro* gegenüber Cisplatin [896]. Auch in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen haben sich *in vitro* Hinweise auf die Wirksamkeit von JAK-Inhibitoren ergeben [897]. Zusammengefasst könnte die Überexpression von XAF1 ein Hinweis auf eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs in den Cisplatin-resistenten Zellen sein. Deshalb sollte die Expression und Aktivierung von STAT1 und die Wirksamkeit von JAK-Inhibitoren in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen weiter

untersucht werden. Hierzu könnte man in einem ersten Schritt die Proteinexpression von p-STAT1 mittels Western Blot analysieren.

Interessanterweise begünstigt STAT1 die mRNA- und Proteinexpression des Oberflächenproteins PD-L1 in Mammakarzinomzellen *in vitro* [898]. Die Expression von PD-L1 führt durch Interaktion mit Rezeptoren auf Immunzellen (PD-1) zur Immunevasion. In der Tat wird PD-L1 im Verlauf einer Cisplatintherapie in SCLC-Zellen [899] und Ovarialkarzinomzellen [900] *in vitro* hochreguliert und begünstigt so Cisplatinresistenz. Suppression von PD-L1 durch siRNA kann die Cisplatin-resistenten Tumorzellen resensitivieren [899, 900]. Zudem wird im Zuge der Epithelial-Mesenchymalen Transition die immunhistochemisch detektierte Expression von PD-L1 verstärkt [901, 902]. Antikörper gegen PD-L1 können in Cisplatin-resistenten NSCLC-Zellen *in vitro* EMT und Invasion verringern [903]. Deshalb sollte insbesondere bei Cisplatin-resistenten Tumoren eine Therapie mit Antikörpern gegen PD-L1 und PD-1 erwogen werden. Dies ist in der Therapie des Urothelkarzinoms bereits etabliert: Die monoklonalen Antikörper Pembrolizumab, Atezolizumab und Nivolumab werden in der Zweitlinientherapie des metastasierten und lokal fortgeschrittenen Urothelkarzinoms der Harnblase nach vorangegangener Cisplatin-basierter Chemotherapie eingesetzt; Pembrolizumab und Atezolizumab sind auch für die Erstlinientherapie bei Patienten mit positivem PD-L1-Status, die nicht für eine Cisplatin-basierte Chemotherapie geeignet sind, zugelassen [45]. Während Pembrolizumab und Nivolumab PD-1 neutralisieren, ist Atezolizumab gegen PD-L1 gerichtet [904]. Sollte STAT1-Aktivierung tatsächlich zur erworbenen Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen beitragen, könnte dies eine weitere Rationale für den klinischen Einsatz von PD-1- bzw. PD-L1-Antikörpern in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomen sein.

4.5.2.6 Inhibition der Translation von XAF1 als mögliche Ursache der paradoxen Hochregulierung der XAF1-mRNA

Letztendlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass infolge einer wiederholten Cisplatinexposition zwar die mRNA-Expression von XAF1, nicht jedoch die Proteinexpression hochreguliert wird. Interessanterweise wird durch Interferontherapie in Apoptose-sensitiven Zellen sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von XAF1 hochreguliert, während in Apoptose-resistenten Zelllinien nur die mRNA-Expression, nicht jedoch die Proteinexpression verstärkt wird [591]. In den Apoptose-resistenten Zelllinien scheint somit die Translation von XAF1 gestört zu sein; möglicherweise ist dies auf RNA-Interferenz zurückzuführen. Vorstellbar ist, dass die Cisplatin-resistenten Zellen im Zuge der Resistenzentwicklung miRNAs hochregulieren, die die XAF1-mRNA blockieren und so die Proteinexpression von XAF1 supprimieren. Durch Feedbackmechanismen könnte so eine erhöhte mRNA-Expression zustande kommen, während die Proteinexpression erniedrigt ist – beispielsweise wenn durch verminderte XAF1-Proteinexpression p53 destabilisiert würde, was zu einer vermehrten Transkription von XAF1 führen würde, da p53 die Transkription von XAF1 inhibiert

(siehe 1.5.2 b). Insofern wäre es retrospektiv interessant gewesen, neben der mRNA-Expression auch die Proteinexpression von XAF1 in den RT-112- und J-82-Zellen sowie deren korrespondierenden Cisplatin-resistenten Zelllinien zu untersuchen.

4.5.2.7 Mögliche Bedeutung dysfunktionaler Spleißvarianten von XAF1

Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass es verschiedene Spleißvarianten von XAF1 mit unterschiedlicher Funktion und Affinität zu XIAP gibt [585, 905, 906]. Um die Akkumulation fehlerhafter Proteine zu unterbinden, wird die Translation von mRNA, in der sich durch alternatives Spleißen vorzeitige Stoppcodons befinden, durch den Mechanismus *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) verhindert, indem die fehlerhafte mRNA abgebaut wird [907]. In zirkulierenden Tumorzellen mit hoher Metastasierungstendenz, die Veränderungen im Sinne der Epithelial-Mesenchymalen Transition aufweisen, wird der NMD-Mechanismus häufig inhibiert [907, 908]; die Translation fehlerhafter Spleißvarianten begünstigt dann die EMT [909, 910]. In diesem Zusammenhang ist relevant, dass in gastralen Adenokarzinomen eine Spleißvariante von XAF1, die eine Deletion des für die Zinkfingerdomäne kodierenden Bereichs aufweist, mit zunehmendem Tumorstadium häufiger auftritt [905]. Die Zinkfingerdomäne ist entscheidend für die Interaktion von XAF1 mit XIAP [905]. Zudem wurde in zirkulierenden Magenkarzinomzellen eine XAF1-Spleißvariante mit einem vorzeitigen Stoppcodon identifiziert, die aufgrund eines dysfunktionalen NMD-Mechanismus in diesen Zellen akkumuliert [908]. Bei Patienten mit fortgeschrittenem T-Stadium der TNM-Klassifikation bzw. venöser Invasion wurde diese Spleißvariante signifikant häufiger nachgewiesen [908]. Die Inhibition des NMD-Mechanismus erfolgt in Tumorzellen in Reaktion auf zellulären Stress, insbesondere infolge von starkem ER-Stress oder bei Anfall reaktiver Sauerstoffspezies [911, 912]. Somit wäre es plausibel, dass NMD-Inhibition auch in Cisplatin-exponierten Zellen die Expression alternativer Spleißvarianten begünstigen und möglicherweise auf diesem Weg Epithelial-Mesenchymale Transition und Cisplatinresistenz vermitteln kann. Über die Bedeutung von NMD für die Cisplatinempfindlichkeit von Tumorzellen gibt es bis dato jedoch keine Erkenntnisse. Diesbezüglich wäre es interessant, die mRNA-Expression von XAF1 bei Verwendung von Primern, die dysfunktionale Spleißvarianten von XAF1 mitdetektieren bzw. Primern, die sie nicht mitdetektieren mittels qRT-PCR zu vergleichen oder alternativ eine RNA-Sequenzierung von XAF1 in den J-82^R-Zellen vorzunehmen.

4.5.2.8 Zusammenfassung der Hypothesen zur paradoxen Hochregulierung von XAF1

Insgesamt bleibt die Bedeutung der auf den ersten Blick paradoxen Hochregulierung von XAF1 im Zuge der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin unklar. Dass ein Zufall zugrunde liegt, erscheint unwahrscheinlich, da die Hochregulierung in beiden Zelllinien biologisch relevant und statistisch signifikant war (siehe Fig. 7). Zudem beobachtete eine kooperierende Arbeitsgruppe ebenfalls eine signifikante Hochregulierung von XAF1 in

Cisplatin-resistenten J-82-Zellen, die unabhängig von den hier verwendeten Zellen nach einem anderen Schema, das auf kontinuierlicher Cisplatinexposition basierte, selektioniert wurden (siehe Supplement Fig. S1). Hypothesen eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Hochregulierung von XAF1 und der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin ergeben sich aus der Funktion von XAF1 als Zellzyklusregulator, der einen G₂/M-Arrest vermitteln kann, sowie aus Hinweisen auf eine Beteiligung von XAF1 an der Epithelial-Mesenchymalen Transition. Darüber hinaus könnte die Rolle von XAF1 bei der Umverteilung von XIAP in den Nukleus Cisplatinresistenz begünstigen. Unabhängig davon ist eine Induktion von XAF1 im Zuge einer Aktivierung des JAK/STAT- oder JNK-Signalwegs denkbar, die ihrerseits Cisplatinresistenz vermitteln können. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass aufgrund einer Inhibition der Translation nur auf mRNA-Ebene die scheinbar paradoxe Hochregulierung von XAF1 besteht oder durch dysfunktionale Spleißvarianten von XAF1 die Funktionalität des Proteinprodukts beeinträchtigt wird. Welche Mechanismen der Hochregulierung von XAF1 zugrunde liegen und ob diese in kausalem Zusammenhang zur Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sowie zur Epithelial-Mesenchymalen Transition stehen, sollte weiter untersucht werden, um zielgerichtete Therapien zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen entwickeln zu können.

4.6 Bedeutung von Cisplatin-Resistenzmechanismen ohne Bezug zur DNA-Schadensantwort oder Apoptose in Urothelkarzinomzellen

Auch Mechanismen, die Cisplatin bereits vor Erreichen der nukleären DNA inaktivieren, erwiesen sich in dieser Studie als potentiell relevant für die erworbene Cisplatinresistenz der Urothelkarzinomzellen. In den Cisplatin-resistenten RT-112^R- Zellen ergab die qRT-PCR eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des nukleophilen Radikalfängers MT1A sowie eine verminderte Expression des Efflux-Transporters ATP7A (siehe Fig. 7B). Zudem zeigte sich die Expression des Efflux-Transporters MRP2 signifikant um den Faktor 1,99 erniedrigt (nicht beschriftet in Fig.7B, da MRP2 die auf den Faktor 2 festgelegte Schwelle der biologischen Relevanz knapp verfehlte).

4.6.1 Paradoxe Hochregulierung von Efflux-Transportern

Während die Überexpression von MT1A auf eine Inaktivierung von Cisplatin in den RT-112^R-Zellen bereits vor Erreichen des Nukleus hindeutet und somit die reduzierte SubG₁-Fraktion der RT-112^R-Zellen erklären könnte (siehe 4.3.1), ist die Herunterregulierung der Efflux-Transporter MRP2 und ATP7A in den Cisplatin-resistenten Zellen paradox, da verminderter Efflux von Cisplatin eigentlich zu höheren intrazellulären Cisplatinkonzentrationen und somit erhöhter Toxizität führen müsste. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Herunterregulierung von MRP2 in Tumorzellen mit Epithelial-Mesenchymaler Transition assoziiert ist [913, 914]. In NSCLC-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass *Snail*, ein Transkriptionsfaktor, der EMT vermittelt, die Expression

von MRP2 auf mRNA-Ebene herunterreguliert [914]. Die Cisplatinresistenz der Snail-exprimierenden Zellen, die Veränderungen im Sinne der EMT aufwies, nahm in der genannten Studie trotz der Suppression der MRP2-mRNA zu, was möglicherweise auf eine erhöhte Proteinexpression von membranständig lokalisiertem MRP5 zurückzuführen ist [914]. MRP5 ist ebenfalls ein Efflux-Transporter, der Cisplatinresistenz vermitteln kann [915]. Auch die in den RT-112^R-Zellen detektierte Überexpression von MT1A würde zur Hypothese der Aktivierung von Snail passen: In HCC-Zellen wurde *in vitro* gezeigt, dass der *Metal Response Element Binding Transcription Factor 2* (MTF2), ein Transkriptionsfaktor, der an die *Metal Response Elements* (MRE) von Metallothioneinen bindet und deren Transkription aktiviert, auch die Transkription von Snail begünstigt [916]. Somit könnte MTF2 in Reaktion auf die zyklische Cisplatinexposition in den RT-112^R-Zellen hochreguliert worden sein, wodurch die Transkription von MT1A und Snail aktiviert wurde. Snail wiederum könnte die Epithelial-Mesenchymale Transition vermittelt und die Expression von MRP2 herunterreguliert haben. Die immunhistochemisch detektierte Expression von Metallothioneinen korreliert zudem bei Schilddrüsenkarzinom-Patienten mit der Expression der Transkriptionsfaktoren HIF1 α und *Slug*, die ebenfalls Epithelial-Mesenchymale Transition vermitteln [917]. HIF1 α induziert dabei die Transkription von Metallothioneinen und *Slug* [917].

Bemerkenswerterweise fand eine Studie von Skowron et al., in der Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen durch kontinuierliche Cisplatinexposition selektioniert wurden, ebenfalls eine paradox erscheinende Herunterregulierung der mRNA-Expression des Efflux-Transporters ATP7A in den Cisplatin-resistenten RT-112-Zellen [643]. Zudem wurde in der genannten Studie genau wie in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Hochregulierung der mRNA-Expression von MT1A in den Cisplatin-resistenten RT-112-Zellen detektiert [643]. Behandlung mit einem Inhibitor der Metallothionein-Synthese konnte die Sensitivität der Cisplatin-resistenten Zellen *in vitro* jedoch nicht erhöhen [643]. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hochregulierung von MT1A eher als Nebeneffekt der EMT auftritt (siehe oben) und selbst nicht entscheidend die Cisplatinresistenz der RT-112^R-Zellen beeinflusst. Die mRNA-Expression von MT1A war in den Cisplatin-resistenten J-82-Zellen hingegen bei Skowron et al. überraschenderweise herunterreguliert [643]. Dieser Effekt wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Fig. 7A). Somit sind im Bezug auf die Mechanismen, die Cisplatin bereits vor Erreichen des Nukleus inaktivieren, trotz der unterschiedlichen Selektionsschemata durchaus Parallelen zwischen den Studien erkennbar. Die von Skowron et al. beobachtete signifikante Hochregulierung von MRP2 in den Cisplatin-resistenten RT-112- und J-82-Zellen [643] unterscheidet sich jedoch von den hier erhobenen Daten, was möglicherweise auf die methodischen Unterschiede bei der Selektion zurückzuführen ist.

4.6.2 Überexpression antioxidativer Enzyme

In den J-82^R-Zellen waren die Expression der Glutathion-S-Transferase GSTM1 sowie der Hämoxygenase 1 signifikant erhöht (siehe Fig. 7A). Dies impliziert, dass in den als eher mesenchymal charakterisierten J-82-Zellen die Hochregulierung antioxidativer Enzyme von Bedeutung für die Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin sein könnte. Im Hinblick auf den relevanten Beitrag, den reaktive Sauerstoffspezies zur Cisplatin-induzierten Zytotoxizität leisten, ist dies zwar ein plausibler Resistenzmechanismus, steht jedoch im Widerspruch zur Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Epithelial-Mesenchymalen Transition (siehe 4.2.2). Insgesamt scheint für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen die proapoptotische Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies relevanter zu sein als deren Auswirkung auf die EMT, sodass die Überexpression antioxidativer Enzyme Cisplatinresistenz vermitteln kann [708, 709].

4.6.2.1 Die Hämoxygenase 1 als potentieller Angriffspunkt zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz

In einer Studie von Yu und Wang, in der Cisplatin-resistente Zellen durch Selektion aus der Urothelkarzinom-Zelllinie NTUB1 gewonnen wurden, zeigte sich im Vergleich der Cisplatin-resistenten Zellen mit ihren Ursprungszellen eine erhöhte Expression der Hämoxygenase 1 [577], genau wie in dieser Arbeit bei den J-82^R-Zellen. Durch *Knockdown* der Hämoxygenase 1 konnten die Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen bei Yu und Wang *in vitro* resensitiviert werden [577]. Insofern wäre es interessant, den Effekt eines siRNA-vermittelten *Knockdowns* der Hämoxygenase 1 auf die Cisplatinresistenz in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen und ggf. einem Xenograft-Modell zu untersuchen. Inhibition oder *Knockdown* der Hämoxygenase 1 erscheint als potentieller Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie zur Resensitivierung Cisplatin-resistenter Zellen vielversprechend. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass sich Hinweise auf eine Rolle der Hämoxygenase 1 bei der Resistenzentwicklung von Urothelkarzinomzellen gegenüber Gemcitabin ergeben haben [918]. Inhibition der Hämoxygenase 1 konnte die Urothelkarzinomzellen *in vivo* gegenüber Gemcitabin sensitivieren [918]. Bei der klinisch am häufigsten verwendeten Kombinationschemotherapie aus Cisplatin und Gemcitabin könnte ein Hämoxygenase 1-Inhibitor somit sowohl der erworbenen Cisplatinresistenz als auch erworbener Gemcitabinresistenz entgegenwirken.

4.6.2.2 Hochregulierung des Transkriptionsfaktors NRF2 als mögliche Ursache der Überexpression antioxidativer Enzyme

Bemerkenswerterweise führte kontinuierliche Cisplatinexposition während der Selektion in der Studie von Skowron et al. vor allem in den Cisplatin-resistenten RT-112-Zellen *in vitro* zur Hochregulierung der mRNA-Expression zahlreicher antioxidativer Enzyme [709]. Dies konnte auf eine *Missense*-Mutation im Exon 2 des für KEAP1 (siehe 1.6.2) kodierenden Gens zurückgeführt werden, wodurch die Interaktion von KEAP1 mit der Ubiquitinligase Cullin-3 gestört wird, sodass der proteasomale Abbau von NRF2

beeinträchtigt ist [709]. Die gleiche Mutation wurde retrospektiv in unabhängig davon von einer anderen Arbeitsgruppe selektionierten Cisplatin-resistenten RT-112-Zellen nachgewiesen [709], wobei das Selektionsschema ebenfalls auf kontinuierlicher Cisplatinexposition basierte [919]. In den hier vorliegenden, durch pulsatile Cisplatinexposition selektionierten RT-112^R-Zellen zeigten sich Veränderungen in der mRNA-Expression antioxidativer Enzyme hingegen nur bei den mesenchymaleren J-82-Zellen (siehe oben). Retrospektiv wurden die in dieser Arbeit selektionierten Cisplatin-resistenten RT-112^R- und J-82^R-Zellen ebenfalls auf die bei Skowron et al. zugrunde liegende *Missense*-Mutation im KEAP1-Gen untersucht; diese war jedoch in keiner der beiden Zelllinien nachweisbar [709]. Die Bedeutung von NRF2 für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen wird auch durch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bekräftigt: Epigenetische Gen-Inaktivierung durch Promotor-Hypermethylierung führt zur verminderten Expression des Proteins GULP1 und vermittelt Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen [920]. GULP1 interagiert mit KEAP1 und trägt auf diese Weise dazu bei, dass die Translokation von NRF2 vom Zytoplasma in den Zellkern verhindert wird [920]. GULP1 zeigte sich in Gewebeproben aus fortgeschrittenen (muskelinvasiven) Urothelkarzinomen häufig epigenetisch inaktiviert. *In vitro* hatte die epigenetische Inaktivierung von GULP1 in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen eine konsekutiv erhöhte Expression von NRF2 und HMOX1 zur Folge [920].

Im Gegensatz zu den in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten war bei Skowron et al. die mRNA-Expression der GSTM1 in den Cisplatin-resistenten J-82-Zellen signifikant herunterreguliert, obwohl auch in den Cisplatin-resistenten J-82-Zellen eine erhöhte Proteinexpression von NRF2 sowie eine verstärkte induzierbare NRF2-Aktivität nachgewiesen wurde [709]. Als Erklärung liegt nahe, dass die unterschiedlichen Expositionsschemata gegenüber Cisplatin für diese Unterschiede von Bedeutung sind. Zum Beispiel ist vorstellbar, dass in den J-82-Zellen, die einer kontinuierlichen Cisplatinexposition ausgesetzt sind, GSTM1 kontinuierlich verbraucht wird, was durch die physiologische Hochregulierung und Aktivierung von NRF2 im Rahmen der ROS-Exposition nur unzureichend ausgeglichen werden kann. In den RT-112-Zellen, die durch die *Missense*-Mutation im KEAP1-Gen einen Selektionsvorteil erworben haben, führt die stark erhöhte NRF2-Aktivität zu einer Hochregulierung von GSTM1 [709]. Da neben der GSTM1 in der hier vorliegenden Arbeit auch die Hämoxigenase 1, die ebenfalls NRF2-abhängig transkribiert wird, in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen hochreguliert war, wäre es interessant, die Proteinexpression von NRF2 und KEAP1 mittels Western Blot sowie die transkriptionelle Aktivität von NRF2 durch einen Luciferase-Assay in den J-82^R-Zellen im Vergleich zu den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen zu untersuchen.

4.6.2.3 Zusammenhang zwischen Zellzyklusregulatoren und der Expression antioxidativer Enzyme

Im Zusammenhang mit der Hochregulierung von NRF2 als möglichem Resistenzmechanismus könnte auch eine Untersuchung der Proteinexpression von p21

zum Erkenntnisgewinn beitragen, weil p21 durch Behinderung der Interaktion von KEAP1 und NRF2 zur Stabilisierung von NRF2 beiträgt [921]. Da die RT-112-Zellen aufgrund einer Mutation, die zur Leserasterverschiebung führt, kein funktionsfähiges p21 exprimieren [845], könnte sich hieraus eine Erklärung ergeben, warum sich in der hier vorliegenden Arbeit nur in den J-82^R-Zellen eine relevante Überexpression antioxidativer Enzyme gezeigt hat. Somit könnte die Aktivierung von p21 im Zuge der DNA-Schadensantwort in den J-82^R-Zellen zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies beigetragen haben. Eine p21-vermittelte Hochregulierung antioxidativer Enzyme würde auch die Hypothese stützen, dass in den RT-112-Zellen, die kein funktionsfähiges p21 exprimieren, reaktive Sauerstoffspezies und ER-Stress für die Zytotoxizität von Cisplatin besonders relevant sind (siehe 4.3.1). Bemerkenswerterweise wurde in der oben genannten Studie von Yu und Wang (siehe 4.6.2.1) in den Cisplatin-resistenten NTUB1/P-Zellen auch eine Hochregulierung des Zellzyklusregulators p16/CDKN2A beobachtet [577]. Dieser Zellzyklusregulator ist ein Inhibitor des CDK4/6-Komplexes, der so den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert [922]. Da die Wirkung Cisplatin-induzierter DNA-Schäden in erster Linie auf der Entstehung von Replikationsstress während der S-Phase beruht, ist die Hochregulierung von p16/CDKN2A als Resistenzmechanismus durchaus plausibel. *Knockdown* von p16/CDKN2A führte in den Cisplatin-resistenten NTUB1/P-Zellen zur Resensitivierung gegenüber Cisplatin [577]. Im Vergleich zu den in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten fällt auf, dass einerseits in beiden Cisplatin-resistenten Zelllinien eine Hochregulierung der Hämoxygenase 1 beobachtet wurde und sich andererseits in beiden Studien Hinweise darauf fanden, dass eine Modulation des Zellzyklus in den Cisplatin-resistenten Zellen eine erfolgreiche Strategie sein könnte: In der hier vorliegenden Arbeit ergab die Inhibition der Checkpointkinase 1, bei Yu und Wang der *Knockdown* von p16/CDKN2A vielversprechende Ergebnisse. Hinsichtlich der Expression von E-Cadherin und Vimentin bzw. des Grades der EMT ist die verwendete Zelllinie NTUB1 bislang nicht charakterisiert, weshalb keine Rückschlüsse gezogen werden können, ob die ähnlichen Resistenzmechanismen in den Cisplatin-resistenten J-82^R- und NTUB1/P-Zellen mit einem ähnlichen Grad der EMT in Zusammenhang stehen könnten.

4.7 Ausblick: Weitere potentielle Angriffspunkte zielgerichteter Therapien zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen

Darüber hinaus gibt es Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin, die sich in Urothelkarzinomzellen als relevant herausgestellt haben, in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurden. Zukünftige präklinische Studien mit Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen sollten auch diese Resistenzmechanismen mitberücksichtigen, da sie ebenfalls eine Angriffsfläche für zielgerichtete Therapien bieten, um Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen zu überwinden.

4.7.1 Autophagie-Inhibitoren

In den letzten Jahren haben sich in mehreren präklinischen Studien Autophagie-Inhibitoren zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen als vielversprechend erwiesen. Die physiologische Funktion der Autophagie sind der lysosomale Abbau und die Wiederverwertung von zelleigenen Bestandteilen wie beschädigten Organellen oder fehlgefalteten Proteinen [923]. Bei Krebserkrankungen nimmt die Autophagie eine duale Rolle ein [924]. Im Hinblick auf die Karzinogenese werden der Autophagie tumorsuppressive Funktionen zugeschrieben [923]. In fortgeschrittenen Tumoren wirken Autophagie-Prozesse hingegen der Apoptose entgegen, indem sie defekte Zellorganellen und Proteine recyceln, um dem erhöhten Metabolismus der Tumorzellen gerecht zu werden, die gestörte Homöostase der Zellen wiederherzustellen und so das Überleben der Tumorzellen fördern [924]. Zudem begünstigt Autophagie auf diesem Weg die Entstehung von Chemoresistenz gegenüber Zytostatika [925], darunter Cisplatin [926]. Autophagie-Inhibitoren werden bereits in zahlreichen Tumorentitäten als Tumorthapeutika und Chemosensitizer in klinischen Studien erprobt, darunter Pankreas-, Kolon- und Lungenkarzinome [927]. Für Urothelkarzinome liegen bislang jedoch nur präklinische Daten vor. Verschiedene Autophagie-Inhibitoren induzieren Apoptose in Urothelkarzinomzellen *in vitro* und erzielen in Kombination mit Cisplatin eine höhere Zytotoxizität als eine Cisplatin-Monotherapie [928, 929]. Gewebeproben von *High Grade* Urothelkarzinome weisen eine höhere Expression von Autophagie-Proteinen und eine größere Anzahl an Autophagivesikeln auf als *Low Grade* Karzinome [928]. Cisplatinbehandlung induziert Autophagie-Proteine in Urothelkarzinomzellen *in vitro* und kann so Cisplatinresistenz begünstigen [930]. Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen, die durch kontinuierliche Cisplatinexposition selektioniert wurden, exprimieren mehr Autophagie-Proteine als ihre Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen und können *in vitro* durch Autophagie-Inhibitoren gegenüber Cisplatin resensitiviert werden [931, 932]. Insofern wäre es interessant, die Expression von Autophagie-Proteinen, z.B. BECN1, das an der Bildung des Kernkomplexes der Autophagie beteiligt ist und mit Bcl-2 interagiert [930], auch in den hier vorliegenden, durch pulsatile Cisplatinexposition selektionierten Zellen, zu untersuchen.

4.7.2 Modulation des Raf/MEK/ERK und PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs

Ein weiterer Signalweg, der bei der Entstehung von erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen relevant zu sein scheint, ist der Raf/MEK/ERK-Signalweg. Cisplatintherapie führt *in vitro* zur Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs in Urothelkarzinomzellen, während *Knockdown* von ERK in Kombination mit einem spezifischen MEK-Inhibitor die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität verstärkt [328]. Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs ist bei Urothelkarzinom-Patienten mit Chemoresistenz assoziiert [328]. Des Weiteren sprechen mehrere Studien für die Involvierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs in die Mechanismen erworbener

Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen. Nikotinexposition, einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Urothelkarzinomen der Harnblase, führt zur Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs und schwächt die Wirkung von Cisplatin auf Urothelkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* ab [933]. Die Kombination von Cisplatin mit einem dualen Inhibitor, der sowohl die PI3-Kinase als auch mTOR inhibiert, hat sich in einem Xenograft-Modell mit Nikotin-exponierten Urothelkarzinomzellen als effektiv erwiesen [933].

4.7.2.1 Inhibition des Onkoproteins MUC1-C

Die C-terminale Untereinheit des Transmembranproteins MUC1, das in Tumorzellen häufig überexprimiert und aberrant glykosyliert ist, ist ein Onkoprotein (MUC1-C), das von extrazellulären Signalen entkoppelt den PI3-Kinase/Akt/mTOR- sowie den Ras/MEK/ERK-Signalweg aktiviert [934]. Des Weiteren beeinflusst MUC1-C durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Expression von Membrantransportern, was durch Veränderung der intrazellulären Cisplatinkonzentration sowie der Verfügbarkeit von Glutathion ebenfalls Cisplatinresistenz begünstigt [935]. Außerdem ist MUC1-C in die Regulation von Zelladhäsionsproteinen wie z.B. E-Cadherin involviert und kann dadurch in Tumorzellen zur Epithelial-Mesenchymalen Transition beitragen [934]. MUC1-C ist in Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen *in vitro* überexprimiert und korreliert bei Urothelkarzinom-Patienten, die eine Cisplatin-basierte Chemotherapie erhalten haben, mit einer kurzen Gesamtüberlebenszeit [935]. MUC1-C-Inhibition kann Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* resensitivieren und die autonome Aktivierung des PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs aufheben [935].

4.7.2.2 Inhibition des Transmembranproteins Glykoprotein 130

Glykoprotein 130 (GP130), ein Transmembranprotein, das Teil des Interleukin 6-Rezeptorkomplexes ist, welcher in der weiteren Signaltransduktion den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg aktiviert, ist in Cisplatin- und Gemcitabin-resistenten Urothelkarzinomzellen *in vitro* überexprimiert, während Inhibition von GP130 in diesen Zellen zytotoxisch ist und deren Migrationsfähigkeit reduziert [327]. Da GP130-Inhibition eine indirekte Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs bedingen kann, ist die Kombination mit einem ERK-Inhibitor sinnvoll [327].

4.7.2.3 Inhibition von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Darüber hinaus werden der PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalweg und der Raf/MEK/ERK-Signalweg in Tumorzellen infolge der weiteren Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Neben ERBB2/HER2 (siehe 1.6.3 a), dessen mRNA-Expression in der hier vorliegenden Arbeit keine Veränderungen in den Cisplatin-resistenten Zellen aufwies, sind für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomen der *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) und der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) potentiell relevant [936], die in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

4.7.2.3.1 FGFR-Inhibitoren

Ca. 20% der Patienten mit muskelinvasiven Urothelkarzinomen weisen genetische Alterationen im FGFR3-Gen auf, was mit einem schlechteren Ansprechen einer Cisplatin-basierten neoadjuvanten Chemotherapie assoziiert ist [937]. Überexpression von FGFR3 geht zudem mit einem kürzeren Gesamtüberleben nach adjuvanter Chemotherapie einher [938]. Der FGFR-Inhibitor Erdafitinib ist inzwischen für die Zweitlinientherapie (nach vorheriger Platin-basierter Chemotherapie) von lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen bei Patienten mit nachgewiesenen Alterationen von FGFR2 oder FGFR3 zugelassen [939]. Erdafitinib führt in dieser Patientengruppe häufig zu einer partiellen, jedoch nur selten zu einer kompletten Remission [940], weshalb es naheliegt, dass Kombinationstherapien mit anderen zielgerichteten Therapeutika erforderlich sind, um das *Outcome* weiter zu verbessern [941]. Da FGFR-Inhibition über einen Feedback-Mechanismus zur Aktivierung von ERBB2 und EGFR sowie in der Folge des PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs führt, erscheint die Evaluation einer möglichen Kombinationstherapie aus FGFR- und PI3-Kinase-Inhibitoren sinnvoll [942].

4.7.2.3.2 EGFR-Inhibitoren

Überexpression von EGFR geht mit einem erhöhten Rezidivrisiko nach Zystektomie und Cisplatin-basierter adjuvanter Chemotherapie einher [943]. Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen können *in vitro* durch *Knockdown* von EGFR [943] oder *in vitro* und *in vivo* durch den EGFR-Inhibitor Gefitinib [944], der klinisch für die Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten NSCLC mit aktivierender EGFR-Mutation eingesetzt wird [945], resensitiviert werden. Klinische Phase-II-Studien konnten jedoch keine Prognoseverbesserung für eine Kombinationstherapie von Cisplatin, Gemcitabin und Gefitinib gegenüber der Standard-Erstlinien-Chemotherapie mit Cisplatin/Gemcitabin nachweisen [946, 947], was möglicherweise darin begründet ist, dass aktivierende EGFR-Mutationen in Urothelkarzinomen im Gegensatz zum NSCLC äußerst selten sind [946]. Interessanterweise exprimiert in präklinischen Modellen ein Phänotyp, der aus der undifferenzierten Basalzellschicht des Urothels hervorgeht und durch molekulare Marker, die auch in Tumorstammzellen vorkommen, charakterisiert ist, vermehrt EGFR und ist sensitiv gegenüber dem EGFR-Inhibitor Erlotinib [948]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass bestimmte Patienten-Subgruppen, insbesondere mit aggressiven Urothelkarzinomen, die aus undifferenzierten Basalzellen hervorgehen, doch von der Therapie mit einem EGFR-Inhibitor profitieren würden.

4.7.2.4 Zusammenfassung zu Modulatoren des Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass der Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalweg infolge diverser molekularer Alterationen bei der Entstehung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen aktiviert werden können und auf verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion Angriffspunkte für zielgerichtete

Therapien bieten, um Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen zu überwinden. Weitere Studien sind erforderlich, um aufzudecken, welche Patientengruppen von Kombinationstherapien aus konventionellen Zytostatika und zielgerichteten Inhibitoren dieser Signalwege profitieren könnten. Um die Relevanz dieses Signalwegs in der hier vorliegenden Arbeit zu überprüfen, könnte in einem ersten Schritt der p-JNK-Western Blot mit p-ERK- und p-Akt-Antikörpern rehybridisiert werden, um Erkenntnisse über die Aktivierung dieses Signalwegs zu gewinnen. Falls eine Aktivierung der Signalwege nachweisbar ist, könnte weiterführend untersucht werden, ob die mRNA- bzw. Proteinexpression von MUC1-C, GP130, EGFR oder FGFR sich als erhöht erweist und ob deren Inhibition eine Resensitivierung der Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen bewirken kann.

4.7.3 Histondeacetylase-Inhibitoren

Histondeacetylase-Inhibitoren führen zu einer Histon-Hyperacetylierung, was eine Chromatindekondensation zur Folge hat [949]. Dadurch werden unter anderem die Gentranskription und die DNA-Reparatur beeinflusst; es können aber auch ein Zellzyklusarrest und/oder die Apoptose eingeleitet werden [949, 950]. Die Chromatindekondensation bewirkt, dass die DNA für Zytostatika leichter zugänglich wird [950]. In Urothelkarzinomzellen hat sich gezeigt, dass Histondeacetylase-Inhibitoren die Zytotoxizität von Cisplatin [951–953] sowie der häufig in der Kombinationschemotherapie eingesetzten Zytostatika Gemcitabin [953, 954] und Doxorubicin *in vitro* und *in vivo* verstärken [328]. Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A wirkt zudem der Chemotherapie-induzierten Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs entgegen [328]. Neben Histonen sind zahlreiche weitere Proteine Ziele von Histondeacetylase, beispielsweise das Protein Notch3, das Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen vermittelt und dessen Überexpression bei Urothelkarzinom-Patienten mit reduziertem Gesamtüberleben assoziiert ist [955]. *Knockdown* von Notch3 kann Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen resensitivieren [955]. Mittels eines Histondeacetylase-Inhibitors kann die Deacetylierung von Notch3 *in vitro* gehemmt und somit dessen proteasomaler Abbau verstärkt werden [955]. Synergistische zytotoxische Effekte zwischen Cisplatin und Histondeacetylase-Inhibitoren sind auch auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die von beiden Wirkstoffen angeregt wird, bzw. den Verbrauch von Glutathion zurückzuführen [952, 953]. Insofern könnten Histondeacetylase-Inhibitoren als weitere therapeutische Option zur Resensitivierung Cisplatin-resistenter Urothelkarzinomzellen infrage kommen und sollten in zukünftigen Studien für die Entwicklung zielgerichteter Therapien zur Überwindung erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomen mitberücksichtigt werden. In der hier vorliegenden Arbeit könnte man konkret den zytotoxischen Effekt einer Kombinationstherapie aus Cisplatin mit einem Histondeacetylase-Inhibitor und einer Cisplatin-Monotherapie in den Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen vergleichen.

4.7.4 Androgenrezeptor-Antagonisten

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Cisplatinempfindlichkeit von Urothelkarzinomen ist die Kombination von Cisplatin mit Androgenrezeptor-Antagonisten bei männlichen Patienten, da Urothelkarzinome häufig eine Androgenrezeptor-Überexpression aufweisen [956]. Neben einer Proliferationshemmung und Induktion der Apoptose wurde in den mit dieser Kombination behandelten J-82-Zellen auch eine Reduktion mesenchymaler Marker beobachtet [956], was darauf hindeutet, dass Behandlung mit Androgenrezeptor-Antagonisten der Epithelial-Mesenchymalen Transition von Urothelkarzinomzellen entgegen wirken könnte. Insofern wäre es interessant, die Cisplatin-resistenten J-82^R-Zellen mit Cisplatin und einem Androgenrezeptor-Antagonisten, z.B. Enzalutamid zu behandeln und die zytotoxischen Effekte mit denen einer Cisplatin-Monotherapie zu vergleichen. Zudem wäre nach erfolgter Kombinationstherapie aus Cisplatin und Enzalutamid eine erneute Quantifizierung der E-Cadherin- und Vimentinexpression sinnvoll mit der Fragestellung, ob sich Hinweise auf eine Reversibilität der EMT durch diese Kombinationstherapie ergeben.

4.8 Schlussfolgerungen

Die zahlreichen Mechanismen erworbener Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen sind in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. Welche Resistenzmechanismen die Cisplatinempfindlichkeit von Urothelkarzinomzellen entscheidend beeinträchtigen, hängt nicht nur vom Zelltyp, sondern auch vom Cisplatin-Applikationsschema und der Gesamtdauer der Behandlung ab. Insofern ist es erforderlich, die Art und Dauer der Cisplatinexposition in präklinischen Studien zur Untersuchung von Cisplatin-Resistenzmechanismen möglichst nah an der klinischen Applikation von Cisplatin im Rahmen einer Chemotherapie zu orientieren. In dieser Studie ist es gelungen, durch ein pulsatile Expositionsschema Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen zu selektionieren, was im Hinblick auf zukünftige Studien mit Urothelkarzinomzellen zur Erforschung von Cisplatinresistenz bedeutsam sein könnte. Aus den Unterschieden der Resistenzmechanismen in Abhängigkeit vom Selektionsschema lässt sich schlussfolgern, dass onkologische Patienten nicht nur aufgrund der genetischen Heterogenität der Urothelkarzinome unterschiedliche Resistenzmechanismen gegenüber Cisplatin entwickeln, sondern auch aufgrund notwendiger Abweichungen vom Standard-Therapieschema, z.B. bei unerwünschten Nebenwirkungen bzw. Normalgewebstoxizität oder bei verlängerten Therapiepausen.

Es gibt bislang keine zuverlässigen Methoden, um das Ansprechen von Urothelkarzinomen auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie vorherzusagen. Bei der Klassifizierung und Risikostratifizierung für die Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen können möglicherweise Marker der Epithelial-Mesenchymalen

Transition hilfreich sein. Die erworbene Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomzellen geht mit EMT einher. EMT scheint weitgehend unabhängig von den verwendeten Zelllinien und dem Selektionsschema während der Resistenzentwicklung aufzutreten. Insofern ist weitere Forschung auf diesem Gebiet unbedingt erforderlich, um zu klären, ob sich hieraus Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien ergeben, die in einem größeren Patientenkollektiv bei Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomen anwendbar sind und weniger von der individuellen Tumorbilologie abhängen.

Im Fokus dieser Arbeit stehen Resistenzmechanismen mit Bezug zur DNA-Schadensantwort. Diesbezüglich hat sich insbesondere die Zellzyklusregulation in den Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen als relevant erwiesen. In beiden Cisplatin-resistenten Zelllinien zeigte sich ein verstärkter G₂/M-Arrest nach Cisplatinexposition. Einhergehend war die Inhibition der Checkpointkinase 1 in den Cisplatin-resistenten Zellen effektiver als in den Cisplatin-sensitiven Ursprungszellen. Während Checkpointkinase-Inhibitoren in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten, ist die klinische Wirksamkeit in den untersuchten Tumorentitäten bislang hinter den Erwartungen zurückgeblieben, wobei bei Urothelkarzinom-Patienten noch keine systematische klinische Studie durchgeführt wurde. Bei der klinischen Etablierung von CHK1-Inhibitoren sollte ein besonderes Augenmerk auf die Auswahl geeigneter Patientenkollektive gelegt werden, da Tumoren mit p53-Mutation, p21-Mutation und c-Myc-Amplifikation gegenüber CHK1-Inhibitoren besonders sensitiv sind.

Konkrete Hinweise auf die Relevanz von Cisplatin-Resistenzmechanismen, die auf einer veränderten Expression von DNA-Reparaturfaktoren beruhen, haben sich in dieser Arbeit nicht ergeben. Die meisten Resistenzmechanismen mit Bezug zur Apoptose scheinen ebenfalls nicht relevant für die erworbene Cisplatinresistenz unter einem pulsatilen Selektionsschema zu sein. Überraschenderweise war jedoch die Expression von XAF1 in beiden Cisplatin-resistenten Zelllinien signifikant hochreguliert, was zunächst paradox imponiert. Die bislang nur vage charakterisierte Funktion von XAF1 als Zellzyklusregulator, der durch Aktivierung der CHK1 einen Zellzyklusarrest in der G₂-Phase vermittelt, könnte den Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von XAF1 und der erworbenen Cisplatinresistenz erklären. Diese Hypothese wird durch den verstärkten G₂-Arrest und die erhöhte Wirksamkeit von CHK1-Inhibitoren in den Cisplatin-resistenten Urothelkarzinomzellen untermauert. Um hieraus in Zukunft ggf. therapeutische Konsequenzen ableiten zu können, ist zunächst ein detaillierteres Verständnis der Funktion von XAF1 als Zellzyklusregulator unerlässlich.

In den mesenchymalen J-82^R-Zellen zeigte sich im Gegensatz zu den epithelialeren RT-112^R-Zellen eine Hochregulierung der antioxidativen Enzyme HMOX1 und GSTM1. Ob die Hochregulierung antioxidativer Enzyme in Cisplatin-resistenten Zellen mit dem Grad der Epithelial-Mesenchymalen Transition korreliert, sollte künftig weiter untersucht werden. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Zellzyklusregulation als Resistenzmechanismus und der Hochregulierung antioxidativer

Enzyme, da p21 zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors NRF2 durch Behinderung von dessen Interaktion mit KEAP1 beiträgt. Darüber hinaus haben sich in den letzten Jahren weitere Cisplatin-Resistenzmechanismen in Urothelkarzinomzellen als relevant erwiesen, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Insbesondere Autophagie-Inhibitoren, Modulatoren des Raf/MEK/ERK- bzw. PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs und Histondeacetylase-Inhibitoren scheinen vielversprechende Kandidaten für die Überwindung erworbener Cisplatinresistenz zu sein und sollten in künftige präklinische Studien zur Cisplatinresistenz von Urothelkarzinomen mit einbezogen werden.

Für viele der Faktoren, die Cisplatinresistenz vermitteln, gibt es spezifische Inhibitoren bzw. die Möglichkeit zur Beeinflussung von deren Expression mittels RNA-Interferenz. Bei der Entwicklung neuer pharmakologischer Inhibitoren bzw. deren klinischer Etablierung muss ein besonderes Augenmerk auf die Normalgewebstoxizität dieser Substanzen gelegt werden, die im klinischen Setting zu dosislimitierenden unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Für Substanzen, die für eine Kombinationstherapie mit Cisplatin vorgesehen sind, muss insbesondere auf Nephro-, Neuro- und Hämatotoxizität geachtet werden, da synergistische adverse Effekte die therapeutischen Möglichkeiten ansonsten erheblich einschränken können.

Da die Mechanismen erworbener Cisplatinresistenz in Abhängigkeit vom Zelltyp, Cisplatin-Expositionsschema und Genetik der Tumorzellen erheblich variieren, könnte sich eine individuelle Analyse der Tumorbiologie bei Patienten, die nicht auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie ansprechen, am ehesten als zielführend erweisen. Um diese Optionen zukünftig auch im klinischen Alltag auszuschöpfen und die Prognose von Urothelkarzinom-Patienten mit erworbener Cisplatinresistenz signifikant zu verbessern, scheint eine individuelle Analyse und zielgerichtete, personalisierte Tumorthherapie bei Patienten mit erworbener Cisplatinresistenz erforderlich zu sein.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] FERLAY, J. ; SOERJOMATARAM, I. ; DIKSHIT, R. ; ESER, S. ; MATHERS, C. ; REBELO, M. ; PARKIN, D. M. ; FORMAN, D. ; BRAY, F. : *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. In: *International Journal of Cancer* 136 (2015), S. E359-386
- [2] JEMAL, A. ; BRAY, F. ; CENTER, M. M. ; FERLAY, J. ; WARD, E. ; FORMAN, D. : *Global cancer statistics*. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2011), S. 69–90
- [3] FAJKOVIC, H. ; HALPERN, J. A. ; CHA, E. K. ; BAHADORI, A. ; CHROMECKI, T. F. ; KARAKIEWICZ, P. I. ; BREINL, E. ; MERSEBURGER, A. S. ; SHARIAT, S. F. : *Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis*. In: *World Journal of Urology* 29 (2011), S. 457–463
- [4] ANTONI, S. ; FERLAY, J. ; SOERJOMATARAM, I. ; ZNAOR, A. ; JEMAL, A. ; BRAY, F. : *Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends*. In: *European Urology* 71 (2017), S. 96–108
- [5] FREEDMAN, N. D. ; SILVERMAN, D. T. ; HOLLENBECK, A. R. ; SCHATZKIN, A. ; ABNET, C. C. : *Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women*. In: *Journal of the American Medical Association* 306 (2011), S. 737–745
- [6] BURGER, M. ; CATTO, J. W. F. ; DALBAGNI, G. ; GROSSMAN H. B. ; HERR, H. ; KARAKIEWICZ, P. ; KASSOUF, W. ; KLEMENEY, L. A. ; LA VECCHIA, C. ; SHARIAT, S. ; LOTAN, Y. : *Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer*. In: *European Urology* 63 (2013), S. 234–241
- [7] GIESEN, Y. ; PFLAUMBAUM, W. : *Aromatische Amine: Eine Arbeitshilfe in Berufskrankheiten-Feststellungsverfahren*. 5. aktualisierte Auflage. In: BK-Report 1/2019 der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung e.V., Berlin 2019
URL: <https://publikationen.dguv.de/widgets/pdf/download/article/3520>
(abgerufen am 06.03.2023)
- [8] ÄRZTLICHER SACHVERSTÄNDIGENBEIRAT „BERUFSKRANKHEITEN“ BEIM BUNDESMINISTERIUM FÜR ARBEIT UND SOZIALES: *Wissenschaftliche Begründung für die Berufskrankheit "Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Harnwege durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe bei Nachweis der Einwirkung einer kumulativen Dosis von mindestens 80 Benzo(a)pyren-Jahren [$\mu\text{g}/\text{m}^3 \times \text{Jahre}$]"*, 2016.
URL: https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Berufskrankheiten/pdf/Begruendung-Blasenkrebs-PAK.pdf?__blob=publicationFile&v=6
(abgerufen am 06.03.2023)
- [9] PARKIN, D. M. ; SITAS, F. ; CHIRENJE, M. ; STEIN, L. ; ABRATT, R. ; WABINGA, H. : *Part I: Cancer in Indigenous Africans-burden, distribution, and trends*. In: *The Lancet Oncology* 9 (2008), S. 683–692
- [10] FERNÁNDEZ, M. I. ; LÓPEZ, J. F. ; VIVALDI, B. ; COZ, F. : *Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure*. In: *The Journal of Urology* 187 (2012), S. 856–861
- [11] GUI-ZHONG, L. ; LI-BO, M. : *Bladder cancer in individuals with spinal cord injuries: a meta-analysis*. In: *Spinal Cord* 55 (2017), S. 341–345

- [12] KORKMAZ, A. ; TOPAL, T. ; OTER, S. : *Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation*. In: *Cell Biology and Toxicology* 23 (2007), S. 303–312
- [13] CHATURVEDI, A. K. ; ENGELS, E. A. ; GILBERT, E. S. ; CHEN, B. E. ; STORM, H. ; LYNCH, C. F. ; HALL, P. ; LANGMARK, F. ; PUKKALA, E. ; KAIJSER, M. ; ANDERSSON, M. ; FOSSÅ, S. D. ; JOENSUU, H. ; BOICE, J. D. ; KLEINERMAN, R. A. ; TRAVIS, L. B. : *Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk*. In: *Journal of the National Cancer Institute* 99 (2007), S. 1634–1643
- [14] GU, J. ; LIANG, D. ; WANG, Y. ; LU, C. ; WU, X. : *Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians*. In: *Mutation Research* 581 (2005), S. 97–104
- [15] YU, C. ; HEQUN, C. ; LONGFEI, L. ; LONG, W. ; ZHI, C. ; FENG, Z. ; JINBO, C. ; CHAO, L. ; XIONGBING, Z. : *GSTM1 and GSTT1 polymorphisms are associated with increased bladder cancer risk: Evidence from updated meta-analysis*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 3246–3258
- [16] YURGELUN, M. B. ; HAMPEL, H. : *Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Cancer Prevention*. In: *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 38 (2018), S. 101–109
- [17] MØLLER, P. ; SEPPÄLÄ, T. T. ; BERNSTEIN, I. ; HOLINSKI-FEDER, E. ; SALA, P. ; GARETH, E. D. ; LINDBLOM, A. ; MACRAE, F. ; BLANCO, I. ; SIJMONS, R. H. ; JEFFRIES, J. ; VASEN, H. F. A. ; BURN, J. ; NAKKEN, S. ; HOVIG, E. ; RØDLAND, E. A. ; THARMARATNAM, K. ; DE VOS TOT NEDERVEEN CAPPEL, W. H. ; HILL, J. ; WIJNEN, J. T. ; JENKINS, M. A. ; GREEN, K. ; LALLOO, F. ; SUNDE, L. ; MINTS, M. ; BERTARIO, L. ; PINEDA, M. ; NAVARRO, M. ; MORAK, M. ; RENKONEN-SINISALO, L. ; VALENTIN, M. D. ; FRAYLING, I. M. ; PLAZZER, J.-P. ; PYLVANAINEN, K. ; GENUARDI, M. ; MECKLIN, J.-P. ; MOESLEIN, G. ; SAMPSON, J. R. ; CAPELLA, G. : *Cancer risk and survival in path_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database*. In: *Gut* 67 (2018), S. 1306–1316
- [18] ROYCE, T. J. ; LIN, C. C. ; GRAY, P. J. ; SHIPLEY, W. U. ; JEMAL, A. ; EFSTATHIOU, J. A. : *Clinical characteristics and outcomes of nonurothelial cell carcinoma of the bladder: Results from the National Cancer Data Base*. In: *Urologic Oncology* 36 (2018), S. 78.e1-78.e12
- [19] WELSCH, U. : *Sobotta Lehrbuch Histologie : Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. 2. Auflage, 2. Nachdruck. München: Urban & Fischer, Elsevier, 2009
- [20] JOST, S. P. ; GOSLING, J. A. ; DIXON, J. S. : *The morphology of normal human bladder urothelium*. In: *Journal of Anatomy* 167 (1989), S. 103–115
- [21] JONES, J. C. R. : *Hemidesmosomes in bladder epithelial cells*. In: *Urology* 57 (2001), Supplement 1, S. 103
- [22] KHANDELWAL, P. ; ABRAHAM, S.N. ; APODACA, G. : *Cell biology and physiology of the uroepithelium*. In: *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 297 (2009), S. F1477-F1501
- [23] APODACA, G. : *The uroepithelium: not just a passive barrier*. In: *Traffic* 5 (2004), S. 117–128
- [24] LÜLLMANN-RAUCH, R. : *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen*. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Thieme, 2009

- [25] TRUSCHEL, S. T. ; WANG, E. ; RUIZ, W. G. ; LEUNG, S.-M. ; ROJAS, R. ; LAVELLE, J. ; ZEIDEL, Mark ; STOFFER, D. ; APODACA, G. : *Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells*. In: *Molecular Biology of the Cell* 13 (2002), S. 830–846
- [26] WU, X.-R. ; KONG, X.-P. ; PELLICER, A. ; KREIBICH, G. ; SUN, T.-T. : *Uroplakins in urothelial biology, function, and disease*. In: *Kidney International* 75 (2009), S. 1153–1165
- [27] ACHARYA, P. ; BECKEL, J. ; RUIZ, W. G. ; WANG, E. ; ROJAS, R. ; BIRDER, L. ; APODACA, G. : *Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium*. In: *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 287 (2004), S. F305-F318
- [28] MATUSZEWSKI, M. ; TUPIKOWSKI, K. ; DOŁOWY, Ł. ; SZYMAŃSKA, B. ; DEMBOWSKI, J. ; ZDROJOWY, R. : *Uroplakins and their potential applications in urology*. In: *Central European Journal of Urology* 69 (2016), S. 252–257
- [29] APODACA, G. ; BALESTREIRE, E. ; BIRDER, L. A. : *The uroepithelial-associated sensory web*. In: *Kidney International* 72 (2007), S. 1057–1064
- [30] MCCONKEY, D. J. ; CHOI, W. ; MARQUIS, L. ; MARTIN, F. ; WILLIAMS, M. B. ; SHAH, J. ; SVATEK, R. ; DAS, A. ; ADAM, L. ; KAMAT, A. ; SIEFKER-RADTKE, A. ; DINNEY, C. : *Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer*. In: *Cancer Metastasis Reviews* 28 (2009), S. 335–344
- [31] NIETO, M. A. ; HUANG, R. Y.-J. ; JACKSON, R. A. ; THIERY, J. P. : *EMT: 2016*. In: *Cell* 166 (2016), S. 21–45
- [32] THIERY, J. P. ; ACLOQUE, H. ; HUANG, R. Y.-J. ; NIETO, M. A. : *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. In: *Cell* 139 (2009), S. 871–890
- [33] GARG, M. : *Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer*. In: *Cancer Metastasis Reviews* 34 (2015), S. 691–701
- [34] MORENO-BUENO, G. ; PEINADO, H. ; MOLINA, P. ; OLMEDA, D. ; CUBILLO, E. ; SANTOS, V. ; PALACIOS, J. ; PORTILLO, F. ; CANO, A. : *The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition*. In: *Nature Protocols* 4 (2009), S. 1591–1613
- [35] BÖCKER, W. ; DENK, H. ; HEITZ, P. U. ; MOCH, H. : *Lehrbuch Pathologie*. 4. Auflage. München: Urban & Fischer, Elsevier, 2008
- [36] ZHAO, J. ; DONG, D. ; SUN, L. ; ZHANG, G. ; SUN, L. : *Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer*. In: *Official Journal of the Brazilian Society of Urology* 40 (2014), S. 179–189
- [37] TRAN, M. N. ; CHOI, W. ; WSZOLEK, M. F. ; NAVAI, N. ; LEE, I.-L. C. ; NITTI, G. ; WEN, S. ; FLORES, E. R. ; SIEFKER-RADTKE, A. ; CZERNIAK, B. ; DINNEY, C. ; BARTON, M. ; MCCONKEY, D. J. : *The p63 protein isoform ΔNp63α inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), S. 3275–3288
- [38] SKOWRON, M. A. ; NIEGISCHE, G. ; FRITZ, G. ; ARENT, T. ; VAN ROERMUND, J. G. H. ; ROMANO, A. ; ALBERS, P. ; SCHULZ, W. A. ; HOFFMANN, M. J. : *Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34 (2015), Art.-Nr. 144

- [39] LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE DER ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN E.V. (AWMF), DEUTSCHEN KREBSGESELLSCHAFT E.V. (DKG) UND STIFTUNG DEUTSCHE KREBSHILFE (DKH): *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0*. AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL (2020)
URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf
(abgerufen am 06.03.2023)
- [40] NIEDERHUBER, J. E. ; ARMITAGE, J. O. ; DOROSHOW, J. H. ; KASTAN, M. B. TEPPER, J. E. ; ABELOFF, M. D. : *Abeloff's Clinical Oncology E-Book*. Sixth edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2020
- [41] TURCO, P. ; HOUSSAMI, N. ; BULGARESI, P. ; TRONI, G. M. ; GALANTI, L. ; CARIAGGI, M. P. ; CIFARELLI, P. ; CROCCETTI, E. ; CIATTO, S. : *Is conventional urinary cytology still reliable for diagnosis of primary bladder carcinoma? Accuracy based on data linkage of a consecutive clinical series and cancer registry*. In: *Acta Cytologica* 55 (2011), S. 193–196
- [42] BABJUK, M. (Chair), BURGER B. (Vice-chair), COMPÉRAT, E. ; GONTERO, P. ; MOSTAFID, A. H. ; PALOU, J. ; VAN RHIJN, B. W. G. ; ROUPRÊT, M. ; SHARIAT, S. F. ; SYLVESTER, R. ; ZIGEUNER, R. : *EAU Guidelines on Non muscle Invasive Bladder Cancer 2020 (TaT1 and CIS)*. Presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2020
- [43] DE WIT, M. ; RETZ, M. M. ; RÖDEL, C. ; GSCHWEND, J. E. : *Diagnostik und Therapie bei Patienten mit Harnblasenkarzinom*. In: *Deutsches Ärzteblatt* 118 (2021), S. 169-176
- [44] PANER, G. P. ; STADLER, W. M. ; HANSEL, D. E. ; MONTIRONI, R. ; LIN, D. W. ; AMIN, M. B. : *Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers*. In: *European Urology* 73 (2018), S. 560–569
- [45] WITJES, J. A. (Chair) ; BRUINS, H. M. ; CATHOMAS, R. ; COMPÉRAT, E. M. ; COWAN, N. C. ; GAKIS, G. ; HERNÁNDEZ, V. ; LORCH, A. ; RIBAL, M. J. (Vice-chair) ; THALMANN, G. N. ; VAN DER HEIJDEN, A. G. ; VESKIMÄE, E. : *EAU Guidelines on Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer 2020*. Presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2020
- [46] HOWLADER, N. ; NOONE, A. M. ; KRAPCHO, M. ; MILLER, D. ; BREST, A. ; YU, M. ; RUHL, J. ; TATALOVICH, Z. ; MARIOTTO, A. ; LEWIS, D. R. ; CHEN, H. S. ; FEUER, E. J. ; CRONIN, K. A. : *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Cancer Statistics Review, 1975-2017*. National Cancer Institute (2020).
URL: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2017/results_merged/sect_27_urinary_bladder.pdf (abgerufen am 06.03.2023)
- [47] YOUNG, J. L. ; ROFFERS, S. D. ; RIES, L. A. G. ; FRITZ, A. G. ; HURLBUT, A. A. : *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Summary Staging Manual - 2000: Codes and Coding Instructions*. National Cancer Institute (2001).
URL: <https://seer.cancer.gov/tools/ssm/ssm2000/urinary.pdf> (abgerufen am 06.03.2023)
- [48] MATULEWICZ, R. S. ; STEINBERG, G. D. : *Non-muscle-invasive Bladder Cancer: Overview and Contemporary Treatment Landscape of Neoadjuvant Chemoablative Therapies*. In: *Reviews in Urology* 22 (2020), S. 43–51
- [49] LARSEN, E. S. ; JOENSEN, U. N. ; POULSEN, A. M. ; GOLETTI, D. ; JOHANSEN, I. S. : *Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer: a review of immunological aspects, clinical effects*

- and BCG infections. In: *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 128 (2020), S. 92–103
- [50] DEGEORGE, K. C. ; HOLT, H. R. ; HODGES, S. C. : *Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment*. In: *American Family Physician* 96 (2017), S. 507–514
- [51] VON DER MAASE, H. ; SENGELOV, L. ; ROBERTS, J. T. ; RICCI, S. ; DOGLIOTTI, L. ; OLIVER, T. ; MOORE, M. J. ; ZIMMERMANN, A. ; ARNING, M. : *Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005), S. 4602–4608
- [52] SCHÖFFSKI, P. ; DUNST, J. ; HÖLTL, W. ; SCHMOLL, H.-J. : Harnblasenkarzinom. In: SCHMOLL, H.-J. ; HÖFFKEN, K. ; POSSINGER, K. (Hrsg.) : *Kompendium Internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, S. 6258–6270
- [53] MASSARI, F. ; SANTONI, M. ; CICCARESE, C. ; BRUNELLI, M. ; CONTI, A. ; SANTINI, D. ; MONTIRONI, R. ; CASCINU, S. ; TORTORA, G. : *Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: Implications for future strategies*. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 96 (2015), S. 81–90
- [54] BELLMUNT, J. ; PONS, F. ; ORSOLA, A. : *Molecular determinants of response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy*. In: *Current Opinion in Urology* 23 (2013), S. 466–471
- [55] DRAYTON, R. M. ; CATTO, J. W. F. : *Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer*. In: *Expert Review of Anticancer Therapy* 12 (2012), S. 271–281
- [56] DASARI, S. ; TCHOUNWOU, P. B. : *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. In: *European Journal of Pharmacology* 740 (2014), S. 364–378
- [57] LAGUNA, M. P. ; ALBERS P. ; ALGABA, F. ; BOKEMEYER, C. ; BOORMANS, J. L. ; FISCHER, S. ; FIZAZI, K. ; GREMMELS, H. ; LEÃO, R. ; NICOL, D. ; NICOLAI, N. ; OLDENBURG, J., TANDSTAD, T. : *EAU Guidelines on Testicular Cancer 2020. Presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, 2020*.
- [58] HEROLD, G. : *Innere Medizin*. Köln: Herold, Gerd, 2020
- [59] MARTH, C. ; LANDONI, F. ; MAHNER, S. ; MCCORMACK, M. ; GONZALEZ-MARTIN, A. ; COLOMBO, N. : *Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. In: *Annals of Oncology* 28 (2017), Supplement 4, S. iv72-iv83
- [60] MISAGHI, A. ; GOLDIN, A. ; AWAD, M. ; KULIDJIAN, A. A. : *Osteosarcoma: a comprehensive review*. In: *Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie Journal* 4 (2018), Art.-Nr. 12
- [61] MACHIELS, J.-P. ; RENÉ LEEMANS, C. ; GOLUSINSKI, W. ; GRAU, C. ; LICITRA, L. ; GREGOIRE, V. : *Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx : EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. In: *Annals of Oncology* 31 (2020), S. 1462–1475
- [62] PABLA, N. ; DONG, Z. : *Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies*. In: *Kidney International* 73 (2008), S. 994–1007
- [63] LANGER, T. ; AM ZEHNHOFF-DINNESEN, A. ; RADTKE, S. ; MEITERT, J. ; ZOLK, O. : *Understanding platinum-induced ototoxicity*. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 34 (2013), S. 458–469

- [64] KANAT, O. ; ERTAS, H. ; CANER, B. : *Platinum-induced neurotoxicity: A review of possible mechanisms*. In: *World Journal of Clinical Oncology* 8 (2017), S. 329–335
- [65] PERCIE DU SERT, N. ; RUDD, J. A. ; APFEL, C. C. ; ANDREWS, P. L. R. : *Cisplatin-induced emesis: systematic review and meta-analysis of the ferret model and the effects of 5-HT₃ receptor antagonists*. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 67 (2011), S. 667–686
- [66] BARABAS, K. ; MILNER, R. ; LURIE, D. ; ADIN, C. : *Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications*. In: *Veterinary and Comparative Oncology* 6 (2008), S. 1–18
- [67] OUN, R. ; MOUSSA, Y. E. ; WHEATE, N. J. : *The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists*. In: *Dalton Transactions* 47 (2018), S. 6645–6653
- [68] HARTMANN, J. T. ; LIPP, H.-P. : *Toxicity of platinum compounds*. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 4 (2003), S. 889–901
- [69] RABIK, C. A. ; DOLAN, M. E. : *Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents*. In: *Cancer Treatment Reviews* 33 (2007), S. 9–23
- [70] DI FRANCESCO, A. M. ; RUGGIERO, A. ; RICCARDI, R. : *Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (2002), S. 1914–1927
- [71] CHANEY, S. G. ; CAMPBELL, S. L. ; BASSETT, E. ; WU, Y. : *Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts*. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 53 (2005), S. 3–11
- [72] ZDRAVESKI, Z. Z. ; MELLO, J. A. ; FARINELLI, C. K. ; ESSIGMANN, J. M. ; MARINUS, M. G. : *MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 1255–1260
- [73] STORDAL, B. ; PAVLAKIS, N. ; DAVEY, R. : *Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review*. In: *Cancer Treatment Reviews* 33 (2007), S. 347–357
- [74] STAFF, N. P. ; CAVALETTI, G. ; ISLAM, B. ; LUSTBERG, M. ; PSIMARAS, D. ; TAMBURIN, S. : *Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment*. In: *Journal of the Peripheral Nervous System* 24 (2019), Supplement 2, S. S26-S39
- [75] WANG, D. ; LIPPARD, S. J. : *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005), S. 307–320
- [76] COHEN, S. M. ; LIPPARD, S. J. : *Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy*. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 67 (2001), S. 93–130
- [77] GALLUZZI, L. ; VITALE, I. ; MICHELS, J. ; BRENNER, C. ; SZABADKAI, G. ; HAREL-BELLAN, A. ; CASTEDO, M. ; KROEMER, G. : *Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future*. In: *Cell Death & Disease* 5 (2014), Art-Nr. e1257
- [78] COCETTA, V. ; RAGAZZI, E. ; MONTOPOLI, M. : *Mitochondrial Involvement in Cisplatin Resistance*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2019), Art.-Nr. 3384
- [79] MARQUES, M. P. M. ; GIANOLIO, D. ; CIBIN, G. ; TOMKINSON, J. ; PARKER, S. F. ; VALERO, R. ; PEDRO LOPES, R. ; BATISTA DE CARVALHO, L. A. E. : *A molecular view of cisplatin's mode of action: interplay with DNA bases and acquired resistance*. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (2015), S. 5155–5171

- [80] FUERTES, M. A. ; ALONSO, C. ; PÉREZ, J. M. : *Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance*. In: *Chemical Reviews* 103 (2003), S. 645–662
- [81] JAMIESON, E. R. ; LIPPARD, S. J. : *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts*. In: *Chemical Reviews* 99 (1999), S. 2467–2498
- [82] KELLAND, L. : *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. In: *Nature Reviews Cancer* 7 (2007), S. 573–584
- [83] FICHTINGER-SHEPMAN, A. M. ; VAN OOSTEROM, A. T. ; LOHMAN, P. H. M. ; BERENDS, F. : *cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum(II)*. In: *Cancer Research* 47 (1987), S. 3000–3004
- [84] JORDAN, P. ; CARMO-FONSECA, M. : *Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (2000), S. 1229–1235
- [85] ROOS, W. P. ; KAINA, B. : *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. In: *Cancer Letters* 332 (2013), S. 237–248
- [86] GARG, M. ; KANOJIA, D. ; SETH, A. ; KUMAR, R. ; GUPTA, A. ; SUROLIA, A. ; SURI, A. : *Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion*. In: *European Journal of Cancer* 46 (2010), S. 207–215
- [87] CASARES, C. ; RAMÍREZ-CAMACHO, R. ; TRINIDAD, A. ; ROLDÁN, A. ; JORGE, E. ; GARCÍA-BERROCAL, J. R. : *Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models*. In: *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 269 (2012), S. 2455–2459
- [88] SHETH, S. ; MUKHERJEA, D. ; RYBAK, L. P. ; RAMKUMAR, V. : *Mechanisms of Cisplatin-induced Ototoxicity and Otoprotection*. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (2017), Art.-Nr. 338
- [89] RYBAK, L. P. ; HUSAIN, K. ; MORRIS, C. ; WHITWORTH, C. ; SOMANI, S. : *Effect of Protective Agents Against Cisplatin Ototoxicity*. In: *The American Journal of Otology* 21 (2000), S. 513–520
- [90] SADOWITZ, P. D. ; HUBBARD, B. A. ; DABROWIAK, J. C. ; GOODISMAN, J. ; TACKA, K. A. ; AKTAS, M. K. ; CUNNINGHAM, M. J. ; DUBOWY, R. L. ; SOUID, A.-K. : *Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs*. In: *Drug Metabolism and Disposition* 30 (2002), S. 183–190
- [91] RASSOW, J. ; HAUSER, K. ; NETZKER, R. ; DEUTZMANN, R. : *Duale Reihe Biochemie. 2., aktualisierte Auflage*. Stuttgart : Thieme, 2008
- [92] MARULLO, R. ; WERNER, E. ; DEGTYAREVA, N. ; MOORE, B. ; ALTAVILLA, G. ; RAMALINGAM, S. S. ; DOETSCH, P. W. : *Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions*. In: *PLoS One* 8 (2013), Art.-Nr. e81162
- [93] ZAIDIEH, T. ; SMITH, J. R. ; BALL, K. E. ; AN, Q. : *ROS as a novel indicator to predict anticancer drug efficacy*. In: *BMC Cancer* 19 (2019), Art.-Nr. 1224

- [94] REDZA-DUTORDOIR, M. ; AVERILL-BATES, D. A. : *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1863 (2016), S. 2977–2992
- [95] CHEN, Q. ; LESNEFSKY, E. J. : *Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 40 (2006), S. 976–982
- [96] CIRCU, M. L. ; AW, T. Y. : *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 48 (2010), S. 749–762
- [97] MOLLINEDO, F. ; GAJATE, C. : *Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy*. In: *Journal of Lipid Research* 61 (2020), S. 611–635
- [98] USHIO-FUKAI, M. : *Localizing NADPH oxidase-derived ROS*. In: *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* (2006), Art.-Nr. re8
- [99] BEDARD, K. ; KRAUSE, K.-H. : *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. In: *Physiological Reviews* 87 (2007), S. 245–313
- [100] SINHA, K. ; DAS, J. ; PAL, P. B. ; SIL, P. C. : *Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis*. In: *Archives of Toxicology* 87 (2013), S. 1157–1180
- [101] COOKE, M. S. ; EVANS, M. D. ; DIZDAROGLU, M. ; LUNEC, J. : *Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease*. In: *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (2003), S. 1195–1214
- [102] FORTINI, P. ; PASCUCCI, B. ; PARLANTI, E. ; D'ERRICO, M. ; SIMONELLI, V. ; DOGLIOTTI, E. : *8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways*. In: *Mutation Research* 531 (2003), S. 127–139
- [103] BIRBEN, E. ; SAHINER, U. M. ; SACKESSEN, C. ; ERZURUM, S. ; KALAYCI, O. : *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. In: *World Allergy Organization Journal* 5 (2012), S. 9–19
- [104] HARPER, J. W. ; ELLEDGE, S. J. : *The DNA damage response: ten years after*. In: *Molecular Cell* 28 (2007), S. 739–745
- [105] BLACKFORD, A. N. ; JACKSON, S. P. : *ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response*. In: *Molecular Cell* 66 (2017), S. 801–817
- [106] HERNANDEZ-SEGURA, A. ; NEHME, J. ; DEMARIA, M. : *Hallmarks of Cellular Senescence*. In: *Trends in Cell Biology* 28 (2018), S. 436–453
- [107] BEGLEY, T. J. ; SAMSON, L. D. : *Network responses to DNA damaging agents*. In: *DNA Repair* 3 (2004), S. 1123–1132
- [108] ABRAHAM, R. T. : *PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways*. In: *DNA Repair* 3 (2004), S. 883–887
- [109] BAKKENIST, C. J., KASTAN, M. B. : *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. In: *Nature* 421 (2003), S. 499–506

- [110] MARÉCHAL, A. ; ZOU, L. : *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2013), Art.-Nr. a012716
- [111] ZHOU, Y. ; LEE, J.-H. ; JIANG, W. ; CROWE, J. L. ; ZHA, S. ; PAULL, T. T. : *Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM*. In: *Molecular Cell* 65 (2017), S. 91–104
- [112] SHILOH, Y. ; ZIV, Y. : *The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2013), S. 197–210
- [113] STRACKER, T. H. ; THEUNISSEN, J.-W. F. ; MORALES, M. ; PETRINI, J. H. J. : *The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together*. In: *DNA Repair* 3 (2004), S. 845–854
- [114] D'AMOURS, D. ; JACKSON, S. P. : *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (2002) , S. 317–327
- [115] HOPFNER, K.-P. ; CRAIG, L. ; MONCALIAN, G. ; ZINKEL, R. A. ; USUI, T. ; OWENK, B. A. L. ; KARCHER, A. ; HENDERSON, B. ; BODMER, J.-L. ; McMURRYK, C. T. ; CARNEY, J. P. ; PETRINI, J. H. J. ; TAINER, J. A. : *The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair*. In: *Nature* 418 (2002), S. 562–566
- [116] BIAN, L. ; MENG, Y. ; ZHANG, M. ; LI, D. : *MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment*. In: *Molecular Cancer* 18 (2019), Art.-Nr. 169
- [117] LEE, J.-H. ; PAULL, T. T. : *Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex*. In: *Science* 304 (2004), S. 93–96
- [118] SALDIVAR, J. C. ; CORTEZ, D. ; CIMPRICH, K. A. : *The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (2017), S. 622–636
- [119] WOLD, M. S. : *Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism*. In: *Annual Review of Biochemistry* 66 (1997), S. 61–92
- [120] BYUN, T. S. ; PACEK, M. ; YEE, M. ; WALTER, J. C. ; CIMPRICH, K. A. : *Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint*. In: *Genes & Development* 19 (2005), S. 1040–1052
- [121] ZOU, L. ; ELLEDGE, S. J. : *Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes*. In: *Science* 300 (2003), S. 1542–1548
- [122] CASPARI, T. ; HOFMANN, K. ; DAHLEN, M. ; KANTE-SMOLER, G. ; LINDSAY, H. D. ; SUNNERHAGEN, P. ; PAPADIMITRIOU, K. ; CARR, A. M. : *Characterization of Schizosaccharomyces pombe Hus1: a PCNA-Related Protein That Associates with Rad1 and Rad9*. In: *Molecular and Cellular Biology* 74 (2000), S. 1254–1262
- [123] CHOE, K. N. ; MOLDOVAN, G.-L. : *Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork*. In: *Molecular Cell* 65 (2017), S. 380–392
- [124] PARRILLA-CASTELLAR, E. R. ; ARLANDER, S. J. H. ; KARNITZ, L. : *Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex*. In: *DNA Repair* 3 (2004), S. 1009–1014

- [125] BASS, T. E. ; LUZWICK, J. W. ; KAVANAUGH, G. ; CARROLL, C. ; DUNGRAWALA, H. ; GLICK, G. G. ; FELDKAMP, M. D. ; PUTNEY, R. ; CHAZIN, W. J. ; CORTEZ, D. : *ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity*. In: *Nature Cell Biology* 18 (2016), S. 1185–1195
- [126] SHILOH, Y. : *The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape*. In: *Trends in Biochemical Sciences* 31 (2006), S. 402–410
- [127] CECCALDI, R. ; SARANGI, P. ; D'ANDREA, A. D. : *The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (2016), S. 337–349
- [128] GOTTLIEB, T. M. ; JACKSON, S. P. : *The DNA-Dependent Protein Kinase: Requirement for DNA ends and Association with Ku-Antigen*. In: *Cell* 72 (1993), S. 131–142
- [129] WALKER, J. R. ; CORPINA, R. A. ; GOLDBERG, J. : *Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair*. In: *Nature* 412 (2001), S. 607–614
- [130] SAND-DEJMEK, J. ; ADELMANT, G. ; SOBHIAN, B. ; CALKINS, A. S. ; MARTO, J. ; IGLEHART, D. J. ; LAZARO, J.-B. : *Concordant and opposite roles of DNA-PK and the "facilitator of chromatin transcription" (FACT) in DNA repair, apoptosis and necrosis after cisplatin*. In: *Molecular Cancer* 10 (2011), Art.-Nr. 74
- [131] CHEN, B. P. C. ; CHAN, D. W. ; KOBAYASHI, J. ; BURMA, S. ; ASAITHAMBY, A. ; MOROTOMI-YANO, K. ; BOTVINICK, E. ; QIN, J. ; CHEN, David J. : *Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), S. 14709–14715
- [132] JETTE, N. ; LEES-MILLER, S. P. : *The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis*. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 117 (2015), S. 194–205
- [133] GOODARZI, A. A. ; YU, Y. ; RIBALLO, E. ; DOUGLAS, P. ; WALKER, S. A. ; YE, R. ; HÄRER, C. ; MARCHETTI, C. ; MORRICE, N. ; JEGGO, P. A. ; LEES-MILLER, S. P. : *DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity*. In: *The EMBO Journal* 25 (2006), S. 3880–3889
- [134] BURMA, S. ; CHEN, B. P. ; MURPHY, M. ; KURIMASA, A. ; CHEN, D. J. : *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), S. 42462–42467
- [135] ROGAKOU, E. P. ; PILCH, D. R. ; ORR, A. H. ; IVANOVA, V. S. ; BONNER, W. M. : *DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), S. 5858–5868
- [136] WARD, I. M. ; CHEN, J. : *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), S. 47759–47762
- [137] ROGAKOU, E. P. ; BOON, C. ; REDON, C. ; BONNER, W. M. : *Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo*. In: *The Journal of Cell Biology* 146 (1999), S. 905–915
- [138] POPP, H. D. ; BRENDEL, S. ; HOFMANN, W.-K. ; FABARIUS, A. : *Immunofluorescence Microscopy of γ H2AX and 53BP1 for Analyzing the Formation and Repair of DNA Double-strand Breaks*. In: *Journal of Visualized Experiments* 129 (2017), Art.-Nr. e56617

- [139] SEDELNIKOVA, O. A. ; ROGAKOU, E. P. ; PANYUTINB, I. G. ; BONNER, W. M. : *Quantitative Detection of 125IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with γ H2AX Antibody*. In: *Radiation Research* 158 (2002), S. 486–492
- [140] FERNANDEZ-CAPETILLO, O. ; LEE, A. ; NUSSENZWEIG, M. ; NUSSENZWEIG, A. : *H2AX: the histone guardian of the genome*. In: *DNA Repair* 3 (2004), S. 959–967
- [141] JUNGMICHEL, S. ; STUCKI, M. : *MDC1: The art of keeping things in focus*. In: *Chromosoma* 119 (2010), S. 337–349
- [142] CHAPMAN, J. R. ; JACKSON, S. P. : *Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage*. In: *EMBO Reports* 9 (2008), S. 795–801
- [143] LOU, Z. ; MINTER-DYKHOUSE, K. ; FRANCO, S. ; GOSTISSA, M. ; RIVERA, M. A. ; CELESTE, A. ; MANIS, J. P. ; VAN DEURSEN, J. ; NUSSENZWEIG, A. ; PAULL, T. T. ; ALT, F. W. ; CHEN, J. : *MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals*. In: *Molecular Cell* 21 (2006), S. 187–200
- [144] MAILAND, N. ; BEKKER-JENSEN, S. ; FAUSTRUP, H. ; MELANDER, F. ; BARTEK, J. ; LUKAS, C. ; LUKAS, J. : *RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins*. In: *Cell* 131 (2007), S. 887–900
- [145] FRADET-TURCOTTE, A. ; CANNY, M. D. ; ESCRIBANO-DÍAZ, C. ; ORTHWEIN, A. ; LEUNG, C. C. Y. ; HUANG, H. ; LANDRY, M.-C. ; KITEVSKI-LEBLANC, J. ; NOORDERMEER, S. M. ; SICHERI, F. ; DUROCHER, D. : *53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark*. In: *Nature* 499 (2013), S. 50–54
- [146] WANG, B. ; ELLEDGE, S. J. : *Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, S. 20759–20763
- [147] WANG, B. ; MATSUOKA, S. ; CARPENTER, P. B. ; ELLEDGE, S. J. : *53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint*. In: *Science* 298 (2002), S. 1435–1438
- [148] SCHULTZ, L. B. ; CHEHAB, N. H. ; MALIKZAY, A. ; HALAZONETIS, T. D. : *p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks*. In: *The Journal of Cell Biology* 151 (2000), S. 1381–1390
- [149] PANIER, S. ; BOULTON, S. J. : *Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2014), S. 7–18
- [150] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, M. ; MOHAMMADZADEH, A. ; YOUSEFI, B. ; MIHANFAR, A. ; KARIMIAN, A. ; MAJIDINIA, M. : *53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer*. In: *DNA Repair* 73 (2019), S. 110–119
- [151] HER, J. ; RAY, C. ; ALTSHULER, J. ; ZHENG, H. ; BUNTINGA, S. : *53BP1 Mediates ATR-Chk1 Signaling and Protects Replication Forks under Conditions of Replication Stress*. In: *Molecular and Cellular Biology* 38 (2018), S. 1–17
- [152] CUELLA-MARTIN, R. ; OLIVEIRA, C. ; LOCKSTONE, H. E. ; SNELLENBERG, S. ; GROLMUSOVA, N. ; CHAPMAN, J. R. : *53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms*. In: *Molecular Cell* 64 (2016), S. 51–64

- [153] MEZA, J. E. ; BRZOVIC, P. S. ; KING, M.-C. ; KLEVIT, R. E. : *Mapping the Functional Domains of BRCA1: Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 247 (1999), S. 5659–5665
- [154] IRMINGER-FINGER, I. ; JEFFORD, C. E. : *Is there more to BARD1 than BRCA1?* In: *Nature Reviews Cancer* 6 (2006), S. 382–391
- [155] ESCRIBANO-DÍAZ, C. ; ORTHWEIN, A. ; FRADET-TURCOTTE, A. ; XING, M. ; YOUNG, J. T. F. ; TKÁČ, J. ; COOK, M. A. ; ROSEBROCK, A. P. ; MUNRO, M. ; CANNY, M. D. ; XU, D. ; DUROCHER, D. : *A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice*. In: *Molecular Cell* 49 (2013), S. 872–883
- [156] YARDEN, R. I. ; METSUYANIM, S. ; PICKHOLTZ, I. ; SHABBEER, S. ; TELLIO, H. ; PAPA, M. Z. : *BRCA1-dependent Chk1 phosphorylation triggers partial chromatin disassociation of phosphorylated Chk1 and facilitates S-phase cell cycle arrest*. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012), S. 1761–1769
- [157] YU, X. ; CHEN, J. : *DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains*. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), S. 9478–9486
- [158] YOSHIDA, K. ; MIKI, Y. : *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. In: *Cancer Science* 95 (2004), S. 866–871
- [159] CHIBA, N. ; PARVIN, J. D. : *The BRCA1 and BARD1 Association with the RNA Polymerase II Holoenzyme*. In: *Cancer Research* 62 (2002), S. 4222–4228
- [160] STARITA, L. M. ; MACHIDA, Y. ; SANKARAN, S. ; ELIAS, J. E. ; GRIFFIN, K. ; SCHLEGEL, B. P. ; GYGI, S. P. ; PARVIN, J. D. : *BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number*. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), S. 8457–8466
- [161] ERTYCH, N. ; STOLZ, A. ; VALERIUS, O. ; BRAUS, G. H. ; BASTIANS, H. : *CHK2-BRCA1 tumor-suppressor axis restrains oncogenic Aurora-A kinase to ensure proper mitotic microtubule assembly*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (2016), S. 1817–1822
- [162] YOGOSAWA, S. ; YOSHIDA, K. : *Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis*. In: *Cancer Science* 109 (2018), S. 3376–3382
- [163] SHIEH, S. Y. ; IKEDA, M. ; TAYA, Y. ; PRIVES, C. : *DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2*. In: *Cell* 91 (1997), S. 325–334
- [164] PIETENPOL, J. A. ; STEWART, Z. A. : *Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis*. In: *Toxicology* 181-182 (2002), S. 475–481
- [165] RYAN, K. M. ; PHILLIPS, A. C. ; VOUSDEN, K. H. : *Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein*. In: *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2001), S. 332–337
- [166] EL-DEIRY, W. S. : *Regulation of p53 downstream genes*. In: *Seminars in Cancer Biology* 8 (1998), S. 345–357
- [167] CHRISTMANN, M. ; KAINA, B. : *Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation*. In: *Nucleic Acids Research* 41 (2013), S. 8403–8420

- [168] SHIVAKUMAR, C. V. ; BROWN, D. R. ; DEB, S. ; DEB, S. P. : *Wild-Type Human p53 Transactivates the Human Proliferating Cell Nuclear Antigen Promoter*. In: *Molecular and Cellular Biology* 15 (1995), S. 6785–6793
- [169] MIYASHITA, T. ; REED, J. C. : *Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene*. In: *Cell* 80 (1995), S. 293–299
- [170] ODA, E. ; OHKI, R. ; MURASAWA, H. ; NEMOTO, J. ; SHIBUE, T. ; YAMASHITA, T. ; TOKINO, T. ; TANIGUCHI, T. ; TANAKA, N. : *Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis*. In: *Science* 288 (2000), S. 1053–1058
- [171] NAKANO, K. ; VOUSDEN, K. H. : *PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53*. In: *Molecular Cell* 7 (2001), S. 683–694
- [172] HO, T. ; TAN, B. X. ; LANE, D. : *How the Other Half Lives: What p53 Does When It Is Not Being a Transcription Factor*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2019), Art.-Nr. 13
- [173] ROOS, W. P. ; KAINA, B. : *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. In: *Trends in Molecular Medicine* 12 (2006), S. 440–450
- [174] MATT, S. ; HOFMANN, T. G. : *The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (2016) S. 2829–2850
- [175] FOLLIS, A. V. ; LLAMBI, F. ; MERRITT, P. ; CHIPUK, J. E. ; GREEN, D. R. ; KRIWACKI, R. W. : *Pin1-Induced Proline Isomerization in Cytosolic p53 Mediates BAX Activation and Apoptosis*. In: *Molecular Cell* 59 (2015), S. 677–684
- [176] D'ORAZI, G. ; CECCHINELLI, B. ; BRUNO, T. ; MANNI, I. ; HIGASHIMOTO, Y. ; SAITO, S. ; GOSTISSA, M. ; COEN, S. ; MARCHETTI, A. ; DEL SAL, G. ; PIAGGIO, G. ; FANCIULLI, M. ; APPELLA, E. ; SODDU, S. : *Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis*. In: *Nature Cell Biology* 4 (2002), S. 11–19
- [177] WINTER, M. ; SOMBROEK, D. ; DAUTH, I. ; MOEHLENBRINK, J. ; SCHEUERMANN, K. ; CRONE, J. ; HOFMANN, T. G. : *Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR*. In: *Nature Cell Biology* 10 (2008), S. 812–824
- [178] DI STEFANO, V. ; RINALDO, C. ; SACCHI, A. ; SODDU, S. ; D'ORAZI, G. : *Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis*. In: *Experimental Cell Research* 293 (2004), S. 311–320
- [179] PITOLLI, C. ; WANG, Y. ; MANCINI, M. ; SHI, Y. ; MELINO, G. ; AMELIO, I. : *Do Mutations Turn p53 into an Oncogene?* In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2019), Art.-Nr. 6421
- [180] MUELLER, H. ; EPPENBERGER, U. : *The dual role of mutant p53 protein in chemosensitivity of human cancers*. In: *Anticancer Research* 16 (1996), S. 3845–3848
- [181] TUNG, M.-C. ; LIN, P.-L. ; WANG, Y.-C. ; HE, T.-Y. ; LEE, M.-C. ; YEH, S.-D. ; CHEN, C.-Y. ; LEE, H. : *Mutant p53 confers chemoresistance in non-small cell lung cancer by upregulating Nrf2*. In: *Oncotarget* 6 (2015), S. 41692–41705
- [182] XUE, D. ; ZHOU, X. ; QIU, J. : *Emerging role of NRF2 in ROS-mediated tumor chemoresistance*. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 131 (2020), Art.-Nr. 110676

- [183] NISHIYAMA, H. ; WATANABE, J. ; OGAWA, O. : *p53 and chemosensitivity in bladder cancer*. In: *International Journal of Clinical Oncology* 13 (2008), S. 282–286
- [184] NIEDNER, H. ; CHRISTEN, R. ; LIN, X. ; KONDO, A. ; HOWELL, S. B. : *Identification of Genes That Mediate Sensitivity to Cisplatin*. In: *Molecular Pharmacology* 60 (2001), S. 1153–1160
- [185] HIENZT, K. ; MOHR, A. ; BHAKTA-GUHA, D. ; EFFERTH, T. : *The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 8921–8946
- [186] BURGESS, A. ; CHIA, K. M. ; HAUPT, S. ; THOMAS, D. ; HAUPT, Y. ; LIM, E. : *Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies*. In: *Frontiers in Oncology* 6 (2016), Art.-Nr. 7
- [187] SARKIS, A. S. ; BAJORIN, D. F. ; REUTER, V. E. ; HERR, H. W. ; NETTO, G. ; ZHANG, Z.-F. ; SCHULTZ, P. K. ; CORDON-CARDO, C. ; SCHER, H. I. : *Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC*. In: *Journal of Clinical Oncology* 13 (1995), S. 1384–1390
- [188] ESRIG D. ; ELMAJIAN D. ; GROSHEN S. ; FREEMAN J. A. ; STEIN J. P. ; CHEN S.-C. ; NICHOLS P. W. ; SKINNER D. G. ; JONES P. A. ; C. R. J. : *Accumulation of Nuclear p53 and Tumor Progression in Bladder Cancer*. In: *The New England Journal of Medicine* 331 (1994), S. 1259-1264
- [189] BERGHOLZ, J. ; XIAO, Z.-X. : *Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression*. In: *Cancer Microenvironment* 5 (2012), S. 311–322
- [190] MELINO, G. : *p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53*. In: *Cell Death and Differentiation* 18 (2011), S. 1487–1499
- [191] CHEN, Y. ; PENG, Y. ; FAN, S. ; LI, Y. ; XIAO, Z.-X. ; LI, C. : *A double dealing tale of p63: an oncogene or a tumor suppressor*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (2018), S. 965–973
- [192] GESSNER, O. ; SCHILLING, T. ; LORENZ, K. ; SCHULZE SCHLEITHOFF, E. ; KOCH, A. ; SCHULZEBERGMAMEN, H. ; LENA, A. M. ; CANDI, E. ; TERRINONI, A. ; CATANI, M. V. ; OREN, M. ; MELINO, G. ; KRAMMER, P. H. ; STREMMEL, W. ; MÜLLER, M. : *TAp63a induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria*. In: *The EMBO Journal* 24 (2005), S. 2458–2471
- [193] WESTFALL, M. D. ; MAYS, D. J. ; SNIJEK, J. C. ; PIETENPOL, J. A. : *The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations*. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (2003), S. 2264–2276
- [194] SUH, E.-K. ; YANG, A. ; KETTENBACH, A. ; BAMBERGER, C. ; MICHAELIS, A. H. ; ZHU, Z. ; ELVIN, J. A. ; BRONSON, R. T. ; CRUM, C. P. ; MCKEON, F. : *p63 protects the female germ line during meiotic arrest*. In: *Nature* 444 (2006), S. 624–628
- [195] SETHI, I. ; ROMANO, R.-A. ; GLUCK, C. ; SMALLEY, K. ; VOJTESEK, B. ; BUCK, M. J. ; SINHA, S. : *A global analysis of the complex landscape of isoforms and regulatory networks of p63 in human cells and tissues*. In: *BMC Genomics* 16 (2015), Art.-Nr. 584
- [196] SOARES, E. ; ZHOU, H. : *Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* (2018), S. 1179–1190

- [197] CARROLL, D. K. ; CARROLL, J. S. ; LEONG, C.-O. ; CHENG, F. ; BROWN, M. ; MILLS, A. A. ; BRUGGE, J. S. ; ELLISEN, L. W. : *p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells*. In: *Nature Cell Biology* 8 (2006), S. 551–561
- [198] SENOO, M. ; PINTO, F. ; CRUM, C. P. ; MCKEON, F. : *p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia*. In: *Cell* 129 (2007), S. 523–536
- [199] STACY, A. J. ; CRAIG, M. P. ; SAKARAM, S. ; KADAKIA, M. : *$\Delta Np63\alpha$ and microRNAs: leveraging the epithelial-mesenchymal transition*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 2114–2129
- [200] KOGA, F. ; KAWAKAMI, S. ; FUJII, Y. ; SAITO, K. ; OHTSUKA, Y. ; IWAI, A. ; ANDO, N. ; TAKIZAWA, T. ; KAGEYAMA, Y. ; KIHARA, K. : *Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder*. In: *Cancer Research* 9 (2003), S. 5501–5507
- [201] URIST, M. J. ; DI COMO, C. J. ; LU, M.-L. ; CHARYTONOWICZ, E. ; VERBEL, D. ; CRUM, C. P. ; INCE, T. A. ; MCKEON, F. D. ; CORDON-CARDO, C. : *Loss of p63 Expression Is Associated with Tumor Progression in Bladder Cancer*. In: *The American Journal of Pathology* 161 (2002), S. 1199–1206
- [202] FUKUSHIMA, H. ; KOGA, F. ; KAWAKAMI, S. ; FUJII, Y. ; YOSHIDA, S. ; RATOVITSKI, E. ; TRINK, B. ; KIHARA, K. : *Loss of DeltaNp63alpha promotes invasion of urothelial carcinomas via N-cadherin/Src homology and collagen/extracellular signal-regulated kinase pathway*. In: *Cancer Research* 69 (2009), S. 9263–9270
- [203] ADORNO, M. ; CORDENONSI, M. ; MONTAGNER, M. ; DUPONT, S. ; WONG, C. ; HANN, B. ; SOLARI, A. ; BOBISSE, S. ; RONDINA, M. B. ; GUZZARDO, V. ; PARENTI, A. R. ; ROSATO, A. ; BICCIATO, S. ; BALMAIN, A. ; PICCOLO, S. : *A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis*. In: *Cell* 137 (2009), S. 87–98
- [204] HUANG, Y. ; SEN, T. ; NAGPAL, J. ; UPADHYAY, S. ; TRINK, B. ; RATOVITSKI, E. ; SIDRANSKY, D. : *ATM kinase is a master switch for the Delta Np63 alpha phosphorylation/degradation in human head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage*. In: *Cell Cycle* 7 (2008), S. 2846–2855
- [205] LI, Y. ; ZHOU, Z. ; CHEN, C. : *WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets p63 transcription factor for ubiquitin-mediated proteasomal degradation and regulates apoptosis*. In: *Cell Death and Differentiation* 15 (2008), S. 1941–1951
- [206] BRETZ, A. C. ; GITTLER, M. P. ; CHARLES, J. P. ; GREMKE, N. ; ECKHARDT, I. ; MERNBERGER, M. ; MANDIC, R. ; THOMALE, J. ; NIST, A. ; WANZEL, M. ; STIEWE, T. : *$\Delta Np63$ activates the Fanconi anemia DNA repair pathway and limits the efficacy of cisplatin treatment in squamous cell carcinoma*. In: *Nucleic Acids Research* 44 (2016), S. 3204–3218
- [207] WU, G. ; OSADA, M. ; GUO, Z. ; FOMENKOV, A. ; BEGUM, S. ; ZHAO, M. ; UPADHYAY, S. ; XING, M. ; WU, F. ; MOON, C. ; WESTRA, W. H. ; KOCH, W. M. ; MANTOVANI, R. ; CALIFANO, J. A. ; RATOVITSKI, E. ; SIDRANSKY, D. ; TRINK, B. : *DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer*. In: *Cancer Research* 65 (2005), S. 758–766
- [208] LEONG, C.-O. ; VIDNOVIC, N. ; DE YOUNG, M. P. ; SGROI, D. ; ELLISEN, L. W. : *The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers*. In: *The Journal of Clinical Investigation* 117 (2007), S. 1370–1380

- [209] SEN, T. ; SEN, N. ; BRAIT, M. ; BEGUM, S. ; CHATTERJEE, A. ; HOQUE, M. O. ; RATOVITSKI, E. ; SIDRANSKY, D. : *DeltaNp63alpha confers tumor cell resistance to cisplatin through the AKT1 transcriptional regulation*. In: *Cancer Research* 71 (2011), S. 1167–1176
- [210] YOON, M.-K. ; HA, J.-H. ; LEE, M.-S. ; CHI, S.-W. : *Structure and apoptotic function of p73*. In: *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 48 (2015), S. 81–90
- [211] ALLOCATI, N. ; DI ILIO, C. ; DE LAURENZI, V. : *p63/p73 in the control of cell cycle and cell death*. In: *Experimental Cell Research* 318 (2012), S. 1285–1290
- [212] MELINO, G. : *p73, the "assistant" guardian of the genome?* In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010 (2003), S. 9–15
- [213] LEVY, D. ; ADAMOVICH, Y. ; REUVEN, N. ; SHAUL, Y. : *Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage*. In: *Molecular Cell* 29 (2008), S. 350–361
- [214] BOHIO, A. A. ; WANG, R. ; ZENG, X. ; BA, X. : *c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of DNA damage response proteins and implications in important cellular functions (Review)*. In: *Molecular Medicine Reports* 22 (2020), S. 612–619
- [215] YOSHIDA, K. ; YAMAGUCHI, T. ; NATSUME, T. ; KUFU, D. ; MIKI, Y. : *JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage*. In: *Nature Cell Biology* 7 (2005), S. 278–285
- [216] GONG, J. G. ; COSTANZO, A. ; YANG, H. Q. ; MELINO, G. ; KAELIN, W. G. ; LEVRERO, M. ; WANG, J. Y. : *The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage*. In: *Nature* 399 (1999), S. 806–809
- [217] KARIN, M. ; BEN-NERIAH, Y. : *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity*. In: *Annual Review of Immunology* 18 (2000), S. 621–663
- [218] WU, Z.-H. ; SHI, Y. ; TIBBETTS, R. S. ; MIYAMOTO, S. : *Molecular Linkage Between the Kinase ATM and NF-kB Signaling in Response to Genotoxic Stimuli*. In: *Science* 108 (2003), S. 1141–1146
- [219] KARIN, M. ; LIN, A. : *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. In: *Nature Immunology* 3 (2002), S. 221–227
- [220] JANSSENS, S. ; TSCHOPP, J. : *Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response*. In: *Cell Death and Differentiation* 13 (2006), S. 773–784
- [221] ABBAS, T. ; DUTTA, A. : *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. In: *Nature Reviews Cancer* 9 (2009), S. 400–414
- [222] KARIMIAN, A. ; AHMADI, Y. ; YOUSEFI, B. : *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. In: *DNA Repair* 42 (2016), S. 63–71
- [223] WAGA, S. ; HANNON, G. J. ; BEACH, D. ; STILLMAN, B. : *The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA*. In: *Nature* 369 (1994), S. 574–578
- [224] KREIS, N.-N. ; LOUWEN, F. ; YUAN, J. : *The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy*. In: *Cancers* 11 (2019), Art.-Nr. 1220

- [225] CHILD, E. S. ; MANN, D. J. : *The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability*. In: *Cell Cycle* 5 (2006), S. 1313–1319
- [226] MATSUOKA, S. ; HUANG, M. ; ELLEDGE, S. J. : *Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase*. In: *Science* 282 (1998), S. 1893–1897
- [227] CICCIA, A. ; ELLEDGE, S. J. : *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. In: *Molecular Cell* 40 (2010), S. 179–204
- [228] DI D'ADDA FAGAGNA, F. : *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. In: *Nature Reviews Cancer* 8 (2008), S. 512–522
- [229] REINHARDT, H. C. ; YAFFE, M. B. : *Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2*. In: *Current Opinion in Cell biology* 21 (2009), S. 245–255
- [230] CHAO, H. X. ; POOVEY, C. E. ; PRIVETTE, A. A. ; GRANT, G. D. ; CHAO, H. Y. ; COOK, J. G. ; PURVIS, J. E. : *Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle*. In: *Cell Systems* 5 (2017), 445-459
- [231] ENDICOTT, J. A. ; NOBLE, M. E. M. ; TUCKER, J. A. : *Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition*. In: *Current Opinion in Structural Biology* 9 (1999), S. 738–744
- [232] MALUMBRES, M. ; BARBACID, M. : *Mammalian cyclin-dependent kinases*. In: *Trends in Biochemical Sciences* 30 (2005), S. 630–641
- [233] TESSEMA, M. ; LEHMANN, U. ; KREIPE, H. : *Cell cycle and no end*. In: *Virchows Archiv* 444 (2004), S. 313–323
- [234] ROCHE, B. ; ARCANGIOLI, B. ; MARTIENSSSEN, R. : *Transcriptional reprogramming in cellular quiescence*. In: *RNA Biology* 14 (2017), S. 843–853
- [235] DE GREGORI, J. ; KOWALIK, T. ; NEVINS, J. R. : *Cellular Targets for Activation by the E2F1 Transcription Factor Include DNA Synthesis- and G1/S-Regulatory Genes*. In: *Molecular and Cellular Biology* 15 (1995), S. 4215–4224
- [236] GIACINTI, C. ; GIORDANO, A. : *RB and cell cycle progression*. In: *Oncogene* 25 (2006), S. 5220–5227
- [237] SHERR, C. J. : *G1 Phase Progression: Cycling on Cue*. In: *Cell* 79 (1994), S. 551–555
- [238] LUNDBERG, A. S. ; WEINBERG, R. A. : *Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes*. In: *Molecular and Cellular Biology* 18 (1998), S. 753–761
- [239] MOLINARI, M.: *Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer*. In: *Cell Proliferation* 33 (2000), S. 261–274
- [240] SHERR, C. J. ; ROBERTS, J. M. : *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. In: *Genes & Development* 13 (1999), S. 1501–1512
- [241] HARPER, J. W. ; ELLEDGE, S. J. ; KEYOMARSI, K. ; DYNLACHT, B. ; TSAI, L.-H. ; ZHANG, P. ; DOBROWOLSKI, S. ; BAI, C. ; CONNELL-CROWLEY, L. ; SWINDELL, E. ; FOX, M. P. ; WEI, N. : *Inhibition of Cyclin-dependent Kinases by p21*. In: *Molecular Biology of the Cell* 6 (1995), S. 387–400

- [242] MAILAND, N. ; FALCK, J. ; LUKAS, C. ; SYLJUÅSEN, R. G. ; WELCKER, M. ; BARTEK, J. ; LUKAS, J. : *Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage*. In: *Science* 288 (2000), S. 1425–1429
- [243] SHEN, T. ; HUANG, S. : *The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis*. In: *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 12 (2012), S. 631–639
- [244] RAY, D. ; KIYOKAWA, H. : *CDC25A levels determine the balance of proliferation and checkpoint response*. In: *Cell Cycle* 6 (2007), S. 3039–3042
- [245] AGAMI, R. ; BERNARDS, R. : *Distinct Initiation and Maintenance Mechanisms Cooperate to Induce G1 Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage*. In: *Cell* 102 (2000), S. 55–66
- [246] SANTRA, M. K. ; WAJAPYEYEE, N. ; GREEN, M. R. : *F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage*. In: *Nature* 459 (2009), S. 722–725
- [247] YAM, C. H. ; FUNG, T. K. ; POON, R. Y. C. : *Cyclin A in cell cycle control and cancer*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (2002), S. 1317–1326
- [248] HWANG, H. C. ; CLURMAN, B. E. : *Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles*. In: *Oncogene* 24 (2005), S. 2776–2786
- [249] WANG, H. ; SHI, L. Z. ; WONG, C. C. L. ; HAN, X. ; HWANG, P. Y.-H. ; TRUONG, L. N. ; ZHU, Q. ; SHAO, Z. ; CHEN, D. J. ; BERNS, M. W. ; YATES, J. R. ; CHEN, L. ; WU, X. : *The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair*. In: *PLoS Genetics* 9 (2013), Art.-Nr. e1003277
- [250] TOMIMATSU, N. ; MUKHERJEE, B. ; CATHERINE HARDEBECK, M. ; ILCHEVA, M. ; VANESSA CAMACHO, C. ; LOUISE HARRIS, J. ; PORTEUS, M. ; LLORENTE, B. ; KHANNA, K. K. ; BURMA, S. : *Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice*. In: *Nature Communications* 5 (2014), Art.-Nr. 3561
- [251] MYERS, J. S. ; ZHAO, R. ; XU, X. ; HAM, A.-J. L. ; CORTEZ, D. : *Cyclin-dependent kinase 2 dependent phosphorylation of ATRIP regulates the G2-M checkpoint response to DNA damage*. In: *Cancer Research* 67 (2007), S. 6685–6690
- [252] XU, N. ; LIBERTINI, S. ; BLACK, E. J. ; LAO, Y. ; HEGARAT, N. ; WALKER, M. ; GILLESPIE, D. A. : *Cdk-mediated phosphorylation of Chk1 is required for efficient activation and full checkpoint proficiency in response to DNA damage*. In: *Oncogene* 31 (2012), S. 1086–1094
- [253] JAZAYERI, A. ; FALCK, J. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J. ; SMITH, G. C. M. ; LUKAS, J. ; JACKSON, S. P. : *ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks*. In: *Nature Cell Biology* 8 (2006), S. 37–45
- [254] ABBAS, T. ; SIVAPRASAD, U. ; TERAI, K. ; AMADOR, V. ; PAGANO, M. ; DUTTA, A. : *PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex*. In: *Genes & Development* 22 (2008), S. 2496–2506
- [255] SHALTIEL, I. A. ; KRENNING, L. ; BRUINSMA, W. ; MEDEMA, R. H. : *The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle*. In: *Journal of Cell Science* 128 (2015), S. 607–620
- [256] ELBÆK, C. R. ; PETROSIUS, V. ; SØRENSEN, C. S. : *WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry*. In: *Mutation Research* 819-820 (2020), Art.-Nr. 111694

- [257] PORTER, L. A. ; DONOGHUE, D. J. : *Cyclin B1 and CDK1: Nuclear localization and upstream regulators*. In: *Progress in Cell Cycle Research* 5 (2003), S. 335–347
- [258] LINDQVIST, A. ; RODRÍGUEZ-BRAVO, V. ; MEDEMA, R. H. : *The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network*. In: *The Journal of Cell Biology* 185 (2009), S. 193–202
- [259] CHAE, H.-D. ; KIM, J. ; SHIN, D. Y. : *NF-Y binds to both G1- and G2-specific cyclin promoters; a possible role in linking CDK2/Cyclin A to CDK1/Cyclin B*. In: *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 44 (2011), S. 553–557
- [260] YANG, J. ; BARDES, E. S. G. ; MOORE, J. D. ; BRENNAN, J. ; POWERS, M. A. ; KORNBLUTH, S. : *Control of Cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1*. In: *Genes & Development* 12 (1998), S. 2131–2143
- [261] STARK, G. R. ; TAYLOR, W. R. : *Control of the G2/M Transition*. In: *Molecular Biotechnology* 32 (2006), S. 227–248
- [262] SCHMIDT, M. ; ROHE, A. ; PLATZER, C. ; NAJJAR, A. ; ERDMANN, F. ; SIPPL, W. : *Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases*. In: *Molecules* 22 (2017), Art.-Nr. 2045
- [263] DRAETTA, G. ; ECKSTEIN, J. : *Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1332 (1997), S. M53–M63
- [264] BROWN, E. J. ; BALTIMORE, D. : *Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance*. In: *Genes & Development* 17 (2003), S. 615–628
- [265] BUNZ, F. ; DUTRIAUX, A. ; LENGAUER, C. ; WALMAN, T. ; ZHOU, S. ; BROWN, J. P. ; SEDIVY, J. M. ; KINZLER, K. W. ; VOGELSTEIN, B. : *Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage*. In: *Science* 282 (1998), S. 1497–1501
- [266] CUEVAS, B. D. ; ABELL, A. N. ; JOHNSON, G. L. : *Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration*. In: *Oncogene* 26 (2007), S. 3159–3171
- [267] MORRISON, D. K. : *MAP kinase pathways*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2012), Art.-Nr. a011254
- [268] CARGNELLO, M. ; ROUX, P. P. : *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (2011), S. 50–83
- [269] GUO, Y.-J. ; PAN, W.-W. ; LIU, S.-B. ; SHEN, Z.-F. ; XU, Y. ; HU, L.-L. : *ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis*. In: *Experimental and Therapeutic Medicine* 19 (2020), S. 1997–2007
- [270] BROZOVIC, A. ; OSMAK, M. : *Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance*. In: *Cancer Letters* 251 (2007), S. 1–16
- [271] ZEKE, A. ; MISHEVA, M. ; REMÉNYI, A. ; BOGOYEVITCH, M. A. : *JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (2016), S. 793–835

- [272] URANO, F. ; WANG, X. ; BERLOTTI, A. ; ZHANG, Y. ; CHUNG, P. ; HARDING, H. P. ; RON, D. : *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. In: *Science* 287 (2000), S. 664–666
- [273] WESTON, C. R. ; DAVIS, R. J. : *The JNK signal transduction pathway*. In: *Current Opinion in Cell Biology* 19 (2007), S. 142–149
- [274] MUKHOPADHYAY, H. ; LEE, N. Y. : *Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer*. In: *Oncogene* 39 (2020), S. 1402–1413
- [275] BROZOVIC, A. ; FRITZ, G. ; CHRISTMANN, M. ; ZISOWSKY, J. ; JAEHDE, U. ; OSMAK, M. ; KAINA, B. : *Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance*. In: *International Journal of Cancer* 112 (2004), S. 974–985
- [276] BITON, S. ; ASHKENAZI, A. : *NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling*. In: *Cell* 145 (2011), S. 92–103
- [277] PICCO, V. ; PAGÈS, G. : *Linking JNK Activity to the DNA Damage Response*. In: *Genes & Cancer* 4 (2013), S. 360–368
- [278] YAN, D. ; AN, G. Y. ; KUO, M. T. : *C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin*. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (2016), S. 2013–2019
- [279] WAGNER, E. F. ; NEBREDÀ, A. R. : *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. In: *Nature Reviews Cancer* 9 (2009), S. 537–549
- [280] KARIN, M. ; LIU, Z.-G. ; ZANDI, E. : *AP-1 function and regulation*. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (1997), S. 240–246
- [281] BODE, A. M. ; DONG, Z. : *The functional contrariety of JNK*. In: *Molecular Carcinogenesis* 46 (2007), S. 591–598
- [282] HAYAKAWA, J. ; MITTAL, S. ; WANG, Y. ; KORKMAZ, K. S. ; ADAMSON, E. ; ENGLISH, C. ; OHMACHI, M. ; MCCLELLAND, M. ; MERCOLA, D. : *Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress*. In: *Molecular Cell* 16 (2004), S. 521–535
- [283] DHANASEKARAN, D. N. ; REDDY, E. P. : *JNK signaling in apoptosis*. In: *Oncogene* 27 (2008), S. 6245–6251
- [284] FENG, X. ; LIU, H. ; ZHANG, Z. ; GU, Y. ; QIU, H. ; HE, Z. : *Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36 (2017), Art.-Nr. 123
- [285] DENG, Y. ; REN, X. ; YANG, L. ; LIN, Y. ; WU, X. : *A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis*. In: *Cell* 115 (2003), S. 61–70
- [286] SANCHEZ-PEREZ, I. ; MURGUIA, J. R. ; PERONA, R. : *Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death*. In: *Oncogene* 16 (1998), S. 533–540
- [287] VENTURA, J.-J. ; HÜBNER, A. ; ZHANG, C. ; FLAVELL, R. A. ; SHOKAT, K. M. ; DAVIS, R. J. : *Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK*. In: *Molecular Cell* 21 (2006), S. 701–710

- [288] LIU, Y. ; GOROSPE, M. ; YANG, C. ; HOLBROOK, N. J. : *Role of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase during the Cellular Response to Genotoxic Stress: Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase Activity and AP-1-dependent Gene Activation*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), S. 8377-8380
- [289] ROOS, W. P. ; THOMAS, A. D. ; KAINA, B. : *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology*. In: *Nature Reviews Cancer* 16 (2016), S. 20–33
- [290] LU, C. ; ZHU, F. ; CHO, Y.-Y. ; TANG, F. ; ZYKOVA, T. ; MA, W. ; BODE, A. M. ; DONG, Z. : *Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3*. In: *Molecular Cell* 23 (2006), S. 121–132
- [291] DE FERAUDY, S. ; REVET, I. ; BEZROOKOVE, V. ; FEENEY, L. ; CLEAVER, J. E. : *A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), S. 6870–6875
- [292] LI, F. ; MENG, L. ; ZHOU, J. ; XING, H. ; WANG, S. ; XU, G. ; ZHU, H. ; WANG, B. ; CHEN, G. ; LU, Y.-P. ; MA, D. : *Reversing chemoresistance in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells: a role of c-Jun NH2-terminal kinase 1*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (2005), S. 1070–1077
- [293] WANG, Z. ; XU, J. ; ZHOU, J.-Y. ; LIU, Y. ; WU, G. S. : *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance*. In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 8870–8877
- [294] WU, Q. ; WU, W. ; FU, Bi. ; SHI, L. ; WANG, X. ; KUCA, K. : *JNK signaling in cancer cell survival*. In: *Medicinal Research Reviews* 39 (2019), S. 2082–2104
- [295] WU, Q. ; WU, W. ; JACEVIC, V. ; FRANCA, T. C. C. ; WANG, X. ; KUCA, K. : *Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer*. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35 (2020), S. 574–583
- [296] ONO, K. ; HAN, J. : *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. In: *Cellular Signalling* 12 (2000), S. 1–13
- [297] ZARUBIN, T. ; HAN, J. : *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. In: *Cell Research* 15 (2005), S. 11–18
- [298] CUADRADO, A. ; NEBREDA, A. R. : *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. In: *The Biochemical Journal* 429 (2010), S. 403–417
- [299] RAMAN, M. ; EARNEST, S. ; ZHANG, K. ; ZHAO, Y. ; COBB, M. H. : *TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage*. In: *The EMBO Journal* 26 (2007), S. 2005–2014
- [300] REINHARDT, H. C. ; ASLANIAN, A. S. ; LEES, J. A. ; YAFFE, M. B. : *p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage*. In: *Cancer Cell* 11 (2007), S. 175–189
- [301] MARTÍNEZ-LIMÓN, A. ; JOAQUIN, M. ; CABALLERO, M. ; POSAS, F. ; DE NADAL, E. : *The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020), Art.-Nr. 1913

- [302] JOAQUIN, M. ; DE NADAL, E. ; POSAS, F. : *An RB insensitive to CDK regulation*. In: *Molecular & Cellular Oncology* 4 (2017), Art.-Nr. e1268242
- [303] HO, K.-K. ; MCGUIRE, V. A. ; KOO, C.-Y. ; MUIR, K. W. ; DE OLANO, N. ; MAIFOSHIE, E. ; KELLY, D. J. ; MCGOVERN, U. B. ; MONTEIRO, L. J. ; GOMES, A. R. ; NEBRED, A. R. ; CAMPBELL, D. G. ; ARTHUR, J. S. C. ; LAM, E. W-F : *Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2012), S. 1545–1555
- [304] DIJKERS, P. F. ; MEDEMA, R. H. ; LAMMERS, J. W. ; KOENDERMAN, L. ; COFFER, P. J. : *Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1*. In: *Current Biology* 10 (2000), S. 1201–1204
- [305] YOU, H. ; PELLEGRINI, M. ; TSUCHIHARA, K. ; YAMAMOTO, K. ; HACKER, G. ; ERLACHER, M. ; VILLUNGER, A. ; MAK, T. W. : *FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal*. In: *The Journal of Experimental Medicine* 203 (2006), S. 1657–1663
- [306] BRUNET, A. ; BONNI, A. ; ZIGMOND, M. J. ; LIN, M. Z. ; JUO, P. ; HU, L. S. ; ANDERSON, M. J. ; ARDEN, K. C. ; BLENIS, J. ; GREENBERG, M. E. : *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. In: *Cell* 96 (1999), S. 857–868
- [307] BULAVIN, D. V. ; SAITO, S. ; HOLLANDER, M. C. ; SAKAGUCHI, K. ; ANDERSON, C. W. ; APPELLA, E. ; FORNACE, A. J. : *Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation*. In: *The EMBO Journal* 18 (1999), S. 6845–6854
- [308] DOLADO, I. ; SWAT, A. ; AJENJO, N. ; DE VITA, G. ; CUADRADO, A. ; NEBRED, A. R. : *p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis*. In: *Cancer Cell* 11 (2007), S. 191–205
- [309] IGEA, A. ; NEBRED, A. R. : *The Stress Kinase p38alpha as a Target for Cancer Therapy*. In: *Cancer Research* 75 (2015), S. 3997–4002
- [310] CURTIS, M. ; KENNY, H. A. ; ASHCROFT, B. ; MUKHERJEE, A. ; JOHNSON, A. ; ZHANG, Y. ; HELOU, Y. ; BATLLE, R. ; LIU, X. ; GUTIERREZ, N. ; GAO, X. ; YAMADA, S. D. ; LASTRA, R. ; MONTAG, A. ; AHSAN, N. ; LOCASALE, J. W. ; SALOMON, A. R. ; NEBRED, A. R. ; LENGVEL, E. : *Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis*. In: *Cell Metabolism* 29 (2019), S. 141-155
- [311] KUMAR, B. ; KOUL, S. ; PETERSEN, J. ; KHANDRIKA, L. ; HWA, J. S. ; MEACHAM, R. B. ; WILSON, S. ; KOUL, H. K. : *p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity*. In: *Cancer Research* 70 (2010), S. 832–841
- [312] PEREIRA, L. ; IGEA, A. ; CANOVAS, B. ; DOLADO, I. ; NEBRED, A. R. : *Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK*. In: *EMBO Molecular Medicine* 5 (2013), S. 1759–1774
- [313] ROY, S. ; ROY, S. ; ANUJA, K. ; THAKUR, S. ; AKHTER, Y. ; PADHI, S. ; BANERJEE, B. : *p38 Mitogen-activated protein kinase modulates cisplatin resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma cells*. In: *Archives of Oral Biology* 122 (2021), Art.-Nr. 104981

- [314] MANSOURI, A. ; RIDGWAY, L. D. ; KORAPATI, A. L. ; ZHANG, Q. ; TIAN, L. ; WANG, Y. ; SIDDIK, Z. H. ; MILLS, G. B. ; CLARET, F. X. : *Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 19245–19256
- [315] WORTZEL, I. ; SEGER, R. : *The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles*. In: *Genes & Cancer* 2 (2011), S. 195–209
- [316] THEIN, K. Z. ; BITER, A. B. ; HONG, D. S. : *Therapeutics Targeting Mutant KRAS*. In: *Annual Review of Medicine* 72 (2021), S. 349–364
- [317] OXFORD, G. ; THEODORESCU, D. : *Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility*. In: *Cancer Letters* 189 (2003), S. 117–128
- [318] EBLEN, S. T. : *Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes*. In: *Advances in Cancer Research* 138 (2018), S. 99–142
- [319] YANG, J.-Y. ; ZONG, C. S. ; XIA, W. ; YAMAGUCHI, H. ; DING, Q. ; XIE, X. ; LANG, J.-Y. ; LAI, C.-C. ; CHANG, C. ; HUANG, W.-C. ; HUANG, H. ; KUO, H.-P. ; LEE, D.-F. ; LI, L.-Y. ; LIEN, H.-C. ; CHENG, X. ; CHANG, K.-J. ; HSIAO, C.-D. ; TSAI, F.-J. ; TSAI, C.-H. ; SAHIN, A. A. ; MULLER, W. J. ; MILLS, G. B. ; YU, D. ; HORTOBAGYI, G. N. ; HUNG, M.-C. : *ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation*. In: *Nature Cell Biology* 10 (2008), S. 138–148
- [320] WEI, F. ; YAN, J. ; TANG, D. : *Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response - a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy*. In: *Current Medicinal Chemistry* 18 (2011), S. 5476–5482
- [321] REZATABAR, S. ; KARIMIAN, A. ; RAMESHKANIA, V. ; PARSIAN, H. ; MAJIDINIA, M. ; KOPI, T. A. ; BISHAYEE, A. ; SADEGHINIA, A. ; YOUSEFI, M. ; MONIRIALAMDARI, M. ; YOUSEFI, B. : *RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression*. In: *Journal of Cellular Physiology* (2019), S. 14951-14965
- [322] PLOTNIKOV, A. ; ZEHORAI, E. ; PROCACCIA, S. ; SEGER, R. : *The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813 (2011), S. 1619–1633
- [323] ZHUANG, S. ; SCHNELLMANN, R. G. : *A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase*. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319 (2006), S. 991–997
- [324] PERSONS, D. L. ; YAZLOVITSKAYA, E. M. ; PELLING, J. C. : *Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), S. 35778–35785
- [325] KIM, Y. K. ; KIM, H. J. ; KWON, C. H. ; KIM, J. H. ; WOO, J. S. ; JUNG, J. S. ; KIM, J. M. : *Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells*. In: *Journal of Applied Toxicology* 25 (2005), S. 374–382
- [326] SHERIDAN, C. ; BRUMATTI, G. ; ELGENDY, M. ; BRUNET, M. ; MARTIN, S. J. : *An ERK-dependent pathway to Noxa expression regulates apoptosis by platinum-based chemotherapeutic drugs*. In: *Oncogene* 29 (2010), S. 6428–6441

- [327] LI, X. ; HE, S. ; TIAN, Y. ; WEISS, R. M. ; MARTIN, D. T. : *Synergistic inhibition of GP130 and ERK signaling blocks chemoresistant bladder cancer cell growth*. In: *Cellular Signalling* 63 (2019), Art.-Nr. 109381
- [328] LIN, W.-C. ; HSU, F.-S. ; KUO, K.-L. ; LIU, S.-H. ; SHUN, C.-T. ; SHI, C.-S. ; CHANG, H.-C. ; TSAI, Y.-C. ; LIN, M.-C. ; WU, J.-T. ; KUO, Y. ; CHOW, P.-M. ; LIAO, S.-M. ; YANG, S.-P. ; HONG, J.-Y. ; HUANG, K.-H. : *Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, induces synergistic cytotoxicity with chemotherapy via suppression of Raf/MEK/ERK pathway in urothelial carcinoma*. In: *Journal of Molecular Medicine* 96 (2018), S. 1307–1318
- [329] ZAMBLE, D. B. ; MU, D. ; REARDON, J. T. ; SANCAR, A. ; LIPPARD, S. J. : *Repair of Cisplatin–DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease*. In: *Biochemistry* 35 (1996), S. 10004–10013
- [330] CHRISTMANN, M. ; TOMICIC, M. T. ; ROOS, W. P. ; KAINA, B. : *Mechanisms of human DNA repair: An update*. In: *Toxicology* 193 (2003), S. 3–34
- [331] SPIVAK, G. : *Nucleotide excision repair in humans*. In: *DNA Repair* 36 (2015), S. 13–18
- [332] HANAWALT, P. C. ; SPIVAK, G. : *Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2008), S. 958–970
- [333] SARKER, A. H. ; TSUTAKAWA, S. E. ; KOSTEK, S. ; NG, C. ; SHIN, D. S. ; PERIS, M. ; CAMPEAU, E. ; TAINER, J. A. ; NOGALES, E. ; COOPER, P. K. : *Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome*. In: *Molecular Cell* 20 (2005), S. 187–198
- [334] VAN DER WEEGEN, Y. ; GOLAN-BERMAN, H. ; MEVISSSEN, T. E. T. ; APELT, K. ; GONZÁLEZ-PRIETO, R. ; GOEDHART, J. ; HEILBRUN, E. E. ; VERTEGAAL, A. C. O. ; VAN DEN HEUVEL, D. ; WALTER, J. C. ; ADAR, S. ; LUIJSTERBURG, M. S. : *The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II*. In: *Nature Communications* 11 (2020), Art.-Nr. 2104
- [335] MU, H. ; GEACINTOV, N. E. ; BROYDE, S. ; YEO, J.-E. ; SCHÄRER, O. D. : *Molecular basis for damage recognition and verification by XPC-RAD23B and TFIIH in nucleotide excision repair*. In: *DNA Repair* 71 (2018), S. 33–42
- [336] KOKIC, G. ; CHERNEV, A. ; TEGUNOV, D. ; DIENEMANN, C. ; URLAUB, H. ; CRAMER, P. : *Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair*. In: *Nature Communications* 10 (2019), Art.-Nr. 2885
- [337] SUGITANI, N. ; SIVLEY, R. M. ; P., K. E. ; CAPRA, J. A. ; CHAZIN, W. J. : *XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair*. In: *DNA Repair* 44 (2016), S. 123–135
- [338] MISSURA, M. ; BUTERIN, T. ; HINDGES, R. ; HÜBSCHER, U. ; KASPÁRKOVÁ, J. ; BRABEC, V. ; NAEGELI, H. : *Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair*. In: *The EMBO Journal* 20 (2001), S. 3554–3564
- [339] GILLET, L. C. J. ; SCHÄRER, O. D. : *Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair*. In: *Chemical Reviews* 106 (2006), S. 253–276
- [340] FAGBEMI, A. F. ; ORELLI, B. ; SCHÄRER, O. D. : *Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair*. In: *DNA Repair* 10 (2011), S. 722–729
- [341] SCHÄRER, O. D. : *Nucleotide excision repair in eukaryotes*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2013), Art.-Nr. a012609

- [342] FURUTA, T. ; UEDA, T. ; AUNE, G. ; SARASIN, A. ; KRAEMER, K. H. ; POMMIER, Y. : *Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells*. In: *Cancer Research* 62 (2002), S. 4899–4902
- [343] FERRY, K. V. ; HAMILTON, T. C. ; JOHNSON, S. W. : *Increased Nucleotide Excision Repair in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells*. In: *Biochemical Pharmacology* 60 (2000), 1305–1313
- [344] ROCHA, C. R. R. ; SILVA, M. M. ; QUINET, A. ; CABRAL-NETO, J. B. ; MENCK, C. F. M. : *DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship*. In: *Clinics* 73 (2018), Supplement 1, Art.-Nr. e478s
- [345] BOWDEN, N. A. : *Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy?* In: *Cancer Letters* 346 (2014), S. 163–171
- [346] ALTAHA, R. ; LIANG, X. ; YU, J. J. ; REED, E. : *Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance*. In: *International Journal of Molecular Medicine* 14 (2004), S. 959–970
- [347] DUAN, M. ; ULIBARRI, J. ; LIU, K. J. ; MAO, P. : *Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020), Art.-Nr. 9248
- [348] ARORA, S. ; KOTHANDAPANI, A. ; TILLISON, K. ; KALMAN-MALTESE, V. ; PATRICK, S. M. : *Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells*. In: *DNA Repair* 9 (2010), S. 745–753
- [349] UEDA, S. ; SHIRABE, K. ; MORITA, K. ; UMEDA, K. ; KAYASHIMA, H. ; UCHIYAMA, H. ; SOEJIMA, Y. ; TAKETOMI, A. ; MAEHARA, Y. : *Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma*. In: *Annals of Surgical Oncology* 18 (2011), S. 1204–1211
- [350] LI, W. ; MELTON, D. W. : *Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance*. In: *Oncogene* 31 (2012), S. 2412–2422
- [351] TORII, Y. ; KATO, R. ; MINAMI, Y. ; HASEGAWA, K. ; FUJII, T. ; UDAGAWA, Y. : *ERCC1 expression and chemosensitivity in uterine cervical adenocarcinoma cells*. In: *Anticancer Research* 34 (2014), S. 107–115
- [352] GUO, W. ; ZHAO, Y.-P. ; JIANG, Y.-G. ; WANG, R.-W. ; HONG, L. ; FAN, D.-M. : *Upregulation of ZNRD1 enhances cisplatin resistance in human esophageal cancer cells by regulation of ERCC1 and Bcl-2*. In: *Tumor Biology* 29 (2008), S. 188–194
- [353] USANOVA, S. ; PIÉÉ-STAFFA, A. ; SIED, U. ; THOMALE, J. ; SCHNEIDER, A. ; KAINA, B. ; KÖBERLE, B. : *Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression*. In: *Molecular Cancer* 9 (2010), S. 248–258
- [354] WU, Y. ; JIN, D. ; WANG, X. ; DU, J. ; DI, W. ; AN, J. ; SHAO, C. ; GUO, J. : *UBE2C Induces Cisplatin Resistance via ZEB1/2-Dependent Upregulation of ABCG2 and ERCC1 in NSCLC Cells*. In: *Journal of Oncology* 2019 (2019), Art.-Nr. 8607859
- [355] WYNNE, P. ; NEWTON, C. ; LEDERMANN, J. A. ; OLAITAN, A. ; MOULD, T. A. ; HARTLEY, J. A. : *Enhanced repair of DNA interstrand crosslinking in ovarian cancer cells from patients following treatment with platinum-based chemotherapy*. In: *British Journal of Cancer* 97 (2007), S. 927–933

- [356] XIA, A. ; LI, H. ; LI, R. ; LU, L. ; WU, X. : *Co-treatment with BEZ235 enhances chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin via inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling and downregulation of ERCC1 expression*. In: *Oncology Reports* 40 (2018), S. 2353–2362
- [357] KO, J.-C. ; SU, Y.-J. ; LIN, S.-T. ; JHAN, J.-Y. ; CIOU, S.-C. ; CHENG, C.-M. ; CHIU, Y.-F. ; KUO, Y.-H. ; TSAI, M.-S. ; LIN, Y.-W. : *Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2*. In: *Lung Cancer* 69 (2010), S. 155–164
- [358] DU, P. ; ZHANG, X. ; LIU, H. ; CHEN, L. : *Lentivirus-Mediated RNAi silencing targeting ERCC1 reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell line*. In: *DNA and Cell Biology* 34 (2015), S. 497–502
- [359] URUN, Y. ; LEOW, J. J. ; FAY, A. P. ; ALBIGES, L. ; CHOUERI, T. K. ; BELLMUNT, J. : *ERCC1 as a prognostic factor for survival in patients with advanced urothelial cancer treated with platinum based chemotherapy: A systematic review and meta-analysis*. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 120 (2017), S. 120–126
- [360] LI, S. ; WU, J. ; CHEN, Y. ; TANG, W. ; PENG, Q. ; DENG, Y. ; XIE, L. ; WANG, J. ; HUANG, S. ; LI, R. ; QIN, X. ; ZHAO, J. : *ERCC1 expression levels predict the outcome of platinum-based chemotherapies in advanced bladder cancer: a meta-analysis*. In: *Anticancer Drugs* 25 (2014), S. 106–114
- [361] MONTAZERI, V. ; GHahremani, M. H. ; MONTAZERI, H. ; HASANZAD, M. ; SAFAVI, D. M. ; AYATI, M. ; CHEHRAZI, M. ; AREFI MOGHADDAM, B. ; OSTAD, S. N. : *A Preliminary Study of NER and MMR Pathways Involved in Chemotherapy Response in Bladder Transitional Cell Carcinoma: Impact on progression-free survival*. In: *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 19 (2020), S. 355–365
- [362] KOUTSOUKOS, K. ; ANDRIKOPOULOU, A. ; DEDES, N. ; ZAGOURI, F. ; BAMIAS, A. ; DIMOPOULOS, M.-A. : *Clinical Perspectives of ERCC1 in Bladder Cancer*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020), Art.-Nr. 8829
- [363] KAWASHIMA, A. ; TAKAYAMA, H. ; TSUJIMURA, A. : *A Review of ERCC1 Gene in Bladder Cancer: Implications for Carcinogenesis and Resistance to Chemoradiotherapy*. In: *Advances in Urology* 2012 (2012), Art.-Nr. 812398
- [364] MELLO, J. A. ; ACHARYA, S. ; FISHEL, R. ; ESSIGMANN, J. M. : *The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin*. In: *Chemistry & Biology* 3 (1996), S. 579–589
- [365] HSIEH, P. ; ZHANG, Y. : *The Devil is in the details for DNA mismatch repair*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (2017), S. 3552–3554
- [366] LI, G.-M. : *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. In: *Cell Research* 18 (2008), S. 85–98
- [367] GRADIA, S. ; SUBRAMANIAN, D. ; WILSON, T. ; ACHARYA, S. ; MAKHOV, A. ; GRIFFITH, J. ; FISHEL, R. : *hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA*. In: *Molecular Cell* 3 (1999), S. 255–261
- [368] MARTIN, S. A. ; LORD, C. J. ; ASHWORTH, A. : *Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway*. In: *Clinical Cancer Research* 16 (2010), S. 5107–5113

- [369] KUNKEL, T. A. ; ERIE, D. A. : *Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication*. In: *Annual Review of Genetics* 49 (2015), S. 291–313
- [370] GUPTA, D. ; HEINEN, C. D. : *The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications*. In: *DNA Repair* 78 (2019), S. 60–69
- [371] MARTIN, L. P. ; HAMILTON, T. C. ; SCHILDER, R. J. : *Platinum resistance: the role of DNA repair pathways*. In: *Clinical Cancer Research* 14 (2008), S. 1291–1295
- [372] LIU, Y. ; FANG, Y. ; SHAO, H. ; LINDSEY-BOLTZ, L. ; SANCAR, A. ; MODRICH, P. : *Interactions of human mismatch repair proteins MutS α and MutL α with proteins of the ATR-Chk1 pathway*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2010), S. 5974–5982
- [373] PABLA, N. ; MA, Z. ; MCILHATTON, M. A. ; FISHEL, R. ; DONG, Z. : *hMSH2 recruits ATR to DNA damage sites for activation during DNA damage-induced apoptosis*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), S. 10411–10418
- [374] TOPPING, R. P. ; WILKINSON, J. C. ; SCARPINATO, K. D. : *Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), S. 14029–14039
- [375] SAWANT, A. ; KOTHANDAPANI, A. ; ZHITKOVICH, A. ; SOBOL, R. W. ; PATRICK, S. M. : *Role of mismatch repair proteins in the processing of cisplatin interstrand cross-links*. In: *DNA Repair* 35 (2015), S. 126–136
- [376] PAPOULI, E. ; CEJKA, P. ; JIRICNY, J. : *Dependence of the Cytotoxicity of DNA-Damaging Agents on the Mismatch Repair Status of Human Cells*. In: *Cancer Research* 64 (2004), S. 3391–3394
- [377] AEBI, S. ; KURDI-HAIDAR, B. ; GORDON, R. ; CENNI, B. ; ZHENG, H. ; FINK, D. ; CHRISTEN, R. D. ; BOLAND, C. R. ; KOI, M. ; FISHEL, R. ; HOWELL, S. B. : *Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin*. In: *Cancer Research* 56 (1996), S. 3087–3090
- [378] FINK, D. ; ZHENG, H. ; NEBEL, S. ; NORRIS, P. S. ; AEBI, S. ; LIN, T. P. ; NEHMÉ, A. ; CHRISTEN, R. D. ; HAAS, M. ; MACLEOD, C. L. ; HOWELL, S. B. : *In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair*. In: *Cancer Research* 57 (1997), S. 1841–1845
- [379] GIFFORD, G. ; PAUL, J. ; VASEY, P. A. ; KAYE, S. B. ; BROWN, R. : *The Acquisition of hMLH1 Methylation in Plasma DNA after Chemotherapy Predicts Poor Survival for Ovarian Cancer Patients*. In: *Clinical Cancer Research* 10 (2004), S. 4420–4426
- [380] HSU, H.-S. ; WEN, C.-K. ; TANG, Y.-A. ; LIN, R.-K. ; LI, W.-Y. ; HSU, W.-H. ; WANG, Y.-C. : *Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer*. In: *Clinical Cancer Research* 11 (2005), S. 5410–5416
- [381] KISHI, K. ; DOKI, Y. ; YANO, M. ; YASUDA, T. ; FUJIWARA, Y. ; TAKIGUCHI, S. ; KIM, S. ; HIGUCHI, I. ; MONDEN, M. : *Reduced MLH1 expression after chemotherapy is an indicator for poor prognosis in esophageal cancers*. In: *Clinical Cancer Research* 9 (2003), S. 4368–4375
- [382] JIN, T.-X. ; FURIHATA, M. ; YAMASAKI, I. ; KAMADA, M. ; LIANG, S.-B. ; OHTSUKI, Y. ; SHUIN, T. : *Human mismatch repair gene (hMSH2) product expression in relation to recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder*. In: *Cancer* 85 (1999), S. 478–484

- [383] KASSEM, H. S. ; VARLEY, J. M. ; HAMAM, S. M. ; MARGISON, G. P. : *Immunohistochemical analysis of expression and allelotype of mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in bladder cancer*. In: *British Journal of Cancer* 84 (2001), S. 321–328
- [384] GOODSPEED, A. ; JEAN, A. ; COSTELLO, J. C. : *A Whole-genome CRISPR Screen Identifies a Role of MSH2 in Cisplatin-mediated Cell Death in Muscle-invasive Bladder Cancer*. In: *European Urology* 75 (2019), S. 242–250
- [385] WATERS, L. S. ; MINESINGER, B. K. ; WILTROUT, M. E. ; D'SOUZA, S. ; WOODRUFF, R. V. ; WALKER, G. C. : *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (2009), S. 134–154
- [386] HARACSKA, L. ; PRAKASH, L. ; PRAKASH, S. : *Role of human DNA polymerase κ as an extender in translesion synthesis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), S. 16000–16005
- [387] JOHNSON, R. E. ; PRAKASH, S. ; PRAKASH, L. : *Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, Pol η* . In: *Science* 283 (1999), S. 1001–1005
- [388] JANSEN, J. G. ; TSAALBI-SHTYLIK, A. ; DE WIND, N. : *Roles of mutagenic translesion synthesis in mammalian genome stability, health and disease*. In: *DNA Repair* 29 (2015), S. 56–64
- [389] SALE, J. E. ; LEHMANN, A. R. ; WOODGATE, R. : *γ -family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2012), S. 141–152
- [390] VAISMAN, A. ; MASUTANI, C. ; HANAOKA, F. ; CHANEY, S. G. : *Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η* . In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 4575–4580
- [391] MASUTANI, C. ; KUSUMOTO, R. ; IWAI, S. ; HANAOKA, F. : *Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η* . In: *The EMBO Journal* 19 (2000), S. 3100–3109
- [392] SHACHAR, S. ; ZIV, O. ; AVKIN, S. ; ADAR, S. ; WITTSCHIEBEN, J. ; REIBNER, T. ; CHANEY, S. ; FRIEDBERG, E. C. ; WANG, Z. ; CARELL, T. ; GEACINTOV, N. ; LIVNEH, Z. : *Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals*. In: *The EMBO Journal* 28 (2009), S. 383–393
- [393] SRIVASTAVA, A. K. ; HAN, C. ; ZHAO, R. ; CUI, T. ; DAI, Y. ; MAO, C. ; ZHAO, W. ; ZHANG, X. ; YU, J. ; WANG, Q.-E. : *Enhanced expression of DNA polymerase eta contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (2015), S. 4411–4416
- [394] ZHOU, W. ; CHEN, Y. ; LIU, X. ; CHU, P. ; LORIA, S. ; WANG, Y. ; YEN, Y. ; CHOU, K.-M. : *Expression of DNA translesion synthesis polymerase η in head and neck squamous cell cancer predicts resistance to gemcitabine and cisplatin-based chemotherapy*. In: *PLoS One* 8 (2013), Art.-Nr. e83978
- [395] ZHANG, J. ; SUN, W. ; REN, C. ; KONG, X. ; YAN, W. ; CHEN, X. : *A PolH Transcript with a Short 3'UTR Enhances PolH Expression and Mediates Cisplatin Resistance*. In: *Cancer Research* 79 (2019), S. 3714–3724

- [396] CEPPI, P. ; NOVELLO, S. ; CAMBIERI, A. ; LONGO, M. ; MONICA, V. ; LO IACONO, M. ; GIAJ-LEVRA, M. ; SAVIOZZI, S. ; VOLANTE, M. ; PAPOTTI, M. ; SCAGLIOTTI, G. : *Polymerase η mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy*. In: *Clinical Cancer Research* 15 (2009), S. 1039–1045
- [397] NILFOROUSHAN, A. ; FURRER, A. ; WYSS, L. A. ; VAN LOON, B. ; STURLA, S. J. : *Nucleotides with altered hydrogen bonding capacities impede human DNA polymerase η by reducing synthesis in the presence of the major cisplatin DNA adduct*. In: *Journal of the American Chemical Society* 137 (2015), S. 4728–4734
- [398] LI, X.-Q. ; REN, J. ; CHEN, P. ; CHEN, Y. ; WU, M. ; WU, Y. ; CHEN, K. ; LI, J. : *Co-inhibition of Pol η and ATR sensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells to cisplatin by impeding DNA damage repair*. In: *Acta Pharmacologica Sinica* 39 (2018), S. 1359–1372
- [399] RÄSCHLE, M. ; KNIPSCHER, P. ; ENOIU, M. ; ANGELOV, T. ; SUN, J. ; GRIFFITH, J. D. ; ELLENBERGER, T. E. ; SCHÄRER, O. D. ; WALTER, J. C. : *Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair*. In: *Cell* 134 (2008), S. 969–980
- [400] WRIGHT, W. D. ; SHAH, S. S. ; HEYER, W.-D. : *Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 293 (2018), S. 10524–10535
- [401] SHIBATA, A. : *Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks*. In: *Mutation Research* 803-805 (2017), S. 51–55
- [402] RANJHA, L. ; HOWARD, S. M. ; CEJKA, P. : *Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes*. In: *Chromosoma* 127 (2018), S. 187–214
- [403] SYMINGTON, L. S. : *Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes*. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 51 (2016), S. 195–212
- [404] KASS, E. M. ; JASIN, M. : *Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways*. In: *FEBS Letters* 584 (2010), S. 3703–3708
- [405] ANAND, R. ; RANJHA, L. ; CANNAVO, E. ; CEJKA, P. : *Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection*. In: *Molecular Cell* 64 (2016), S. 940–9500
- [406] MAKHARASHVILI, N. ; PAULL, T. T. : *CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism*. In: *DNA Repair* 32 (2015), S. 75–81
- [407] PRAKASH, R. ; ZHANG, Y. ; FENG, W. ; JASIN, M. : *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (2015), Art.-Nr. a016600
- [408] BUNTING, S. F. ; CALLÉN, E. ; WONG, N. ; CHEN, H.-T. ; POLATO, F. ; GUNN, A. ; BOTHMER, A. ; FELDHAHN, N. ; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. ; CAO, L. ; XU, X. ; DENG, C.-X. ; FINKEL, T. ; NUSSENZWEIG, M. ; STARK, J. M. ; NUSSENZWEIG, A. : *53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks*. In: *Cell* 141 (2010), S. 243–25
- [409] ZHANG, F. ; MA, J. ; WU, J. ; YE, L. ; CAI, H. ; XIA, B. ; YU, X. : *PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response*. In: *Current Biology* 19 (2009), S. 524–529

- [410] ZHAO, W. ; STEINFELD, J. B. ; LIANG, F. ; CHEN, X. ; MARANON, D. G. ; JIAN MA, C. ; KWON, Y. ; RAO, T. ; WANG, W. ; SHENG, C. ; SONG, X. ; DENG, Y. ; JIMENEZ-SAINZ, J. ; LU, L. ; JENSEN, R. B. ; XIONG, Y. ; KUPFER, G. M. ; WIESE, C. ; GREENE, E. C. ; SUNG, P. : *BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing*. In: *Nature* 550 (2017), S. 360–365
- [411] DESHPANDE, R. A. ; LEE, J.-H. ; ARORA, S. ; PAULL, T. T. : *Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts*. In: *Molecular Cell* 64 (2016), S. 593–606
- [412] GARCIA, V. ; PHELPS, S. E. L. ; GRAY, S. ; NEALE, M. J. : *Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1*. In: *Nature* 479 (2011), S. 241–244
- [413] RUFF, P. ; DONNIANNI, R. A. ; GLANCY, E. ; OH, J. ; SYMINGTON, L. S. : *RPA Stabilization of Single-Stranded DNA Is Critical for Break-Induced Replication*. In: *Cell Reports* 17 (2016), S. 3359–3368
- [414] HEYER, W.-D. ; EHMSSEN, K. T. ; LIU, J. : *Regulation of homologous recombination in eukaryotes*. In: *Annual Review of Genetics* 44 (2010), S. 113–139
- [415] IRA, G. ; PELLICOLI, A. ; BALIJA, A. ; WANG, X. ; FIORANI, S. ; CAROTENUTO, W. ; LIBERI, G. ; BRESSAN, D. ; WAN, L. ; HOLLINGSWORTH, N. M. ; HABER, J. E. ; FOIANI, M. : *DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1*. In: *Nature* 431 (2004), S. 1011–1017
- [416] LI, X. ; HEYER, W.-D. : *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. In: *Cell Research* 18 (2008), S. 99–113
- [417] JENSEN, R. B. ; CARREIRA, A. ; KOWALCZYKOWSKI, S. C. : *Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination*. In: *Nature* 467 (2010), S. 678–683
- [418] ORTHWEIN, A. ; NOORDERMEER, S. M. ; WILSON, M. D. ; LANDRY, S. ; ENCHEV, R. I. ; SHERKER, A. ; MUNRO, M. ; PINDER, J. ; SALSMAN, J. ; DELLAIRE, G. ; XIA, B. ; PETER, M. ; DUROCHER, D. : *A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells*. In: *Nature* 528 (2015), S. 422–426
- [419] CARREIRA, A. ; HILARIO, J. ; AMITANI, I. ; BASKIN, R. J. ; SHIVJI, M. K. K. ; VENKITARAMAN, A. R. ; KOWALCZYKOWSKI, S. C. : *The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51*. In: *Cell* 136 (2009), S. 1032–1043
- [420] SAN FILIPPO, J. ; SUNG, P. ; KLEIN, H. : *Mechanism of eukaryotic homologous recombination*. In: *Annual Review of Biochemistry* 77 (2008), S. 229–257
- [421] RENKAWITZ, J. ; LADEMANN, C. A. ; JENTSCH, S. : *Mechanisms and principles of homology search during recombination*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2014), S. 369–383
- [422] LI, X. ; STITH, C. M. ; BURGERS, P. M. ; HEYER, W.-D. : *PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta*. In: *Molecular Cell* 36 (2009), S. 704–713
- [423] MORRICAL, S. W. : *DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (2015), Art.-Nr. a016444

- [424] SAKOFSKY, C. J. ; MALKOVA, A. : *Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences*. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52 (2017), S. 395–413
- [425] LIBERI, G. ; FOIANI, M. : *The double life of Holliday junctions*. In: *Cell Research* 20 (2010), S. 611–613
- [426] GOETZ, J. D.-M. ; MOTYCKA, T. A. ; HAN, M. ; JASIN, M. ; TOMKINSON, A. E. : *Reduced repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in a DNA ligase I-deficient human cell line*. In: *DNA Repair* 4 (2005), S. 649–654
- [427] HUSAIN, A. ; HE, G. ; VENKATRAMAN, E. S. ; SPRIGGS, D. R. : *BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II)*. In: *Cancer Research* 58 (1998), S. 1120–1123
- [428] ZHU, Y. ; LIU, Y. ; ZHANG, C. ; CHU, J. ; WU, Y. ; LI, Y. ; LIU, J. ; LI, Q. ; LI, S. ; SHI, Q. ; JIN, L. ; ZHAO, J. ; YIN, D. ; EFRONI, S. ; SU, F. ; YAO, H. ; SONG, E. ; LIU, Q. : *Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1*. In: *Nature Communications* 9 (2018), Art.-Nr. 1595
- [429] TARON, M. ; ROSELL, R. ; FELIP, E. ; MENDEZ, P. ; SOUGLAKOS, J. ; RONCO, M. S. ; QUERALT, C. ; MAJO, J. ; SANCHEZ, J. M. ; SANCHEZ, J. J. ; MAESTRE, J. : *BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer*. In: *Human Molecular Genetics* 13 (2004), S. 2443–2449
- [430] FONT, A. ; TARON, M. ; GAGO, J. L. ; COSTA, C. ; SÁNCHEZ, J. J. ; CARRATO, C. ; MORA, M. ; CELIZ, P. ; PEREZ, L. ; RODRÍGUEZ, D. ; GIMENEZ-CAPITAN, A. ; QUIROGA, V. ; BENLLOCH, S. ; IBARZ, L. ; ROSELL, R. : *BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer*. In: *Annals of Oncology* 22 (2011), S. 139–144
- [431] HE, X. ; XIAO, X. ; DONG, L. ; WAN, N. ; ZHOU, Z. ; DENG, H. ; ZHANG, X. : *MiR-218 regulates cisplatin chemosensitivity in breast cancer by targeting BRCA1*. In: *Tumor Biology* 36 (2015), S. 2065–2075
- [432] HORIUCHI, A. ; WANG, C. ; KIKUCHI, N. ; OSADA, R. ; NIKAIDO, T. ; KONISHI, I. : *BRCA1 Expression is an Important Biomarker for Chemosensitivity: Suppression of BRCA1 Increases the Apoptosis via Up-regulation of p53 and p21 During Cisplatin Treatment in Ovarian Cancer Cells*. In: *Biomarker Insights* 1 (2007), S. 49–59
- [433] CHEN, P. ; LI, J. ; CHEN, Y.-C. ; QIAN, H. ; CHEN, Y. ; SU, J.-Y. ; WU, M. ; LAN, T. : *The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells*. In: *Cellular Oncology* 39 (2016), S. 511–522
- [434] ANTONIOU, A. ; PHAROAH, P. D. P. ; NAROD, S. ; RISCH, H. A. ; EYFJORD, J. E. ; HOPPER, J. L. ; LOMAN, N. ; OLSSON, H. ; JOHANSSON, O. ; BORG, A. ; PASINI, B. ; RADICE, P. ; MANOUKIAN, S. ; ECCLES, D. M. ; TANG, N. ; OLAH, E. ; ANTON-CULVER, H. ; WARNER, E. ; LUBINSKI, J. ; GRONWALD, J. ; GORSKI, B. ; TULINIUS, H. ; THORLACIUS, S. ; EEROLA, H. ; NEVANLINNA, H. ; SYRJÄKOSKI, K. ; KALLIONIEMI, O-P ; THOMPSON, D. ; EVANS, C. ; PETO, J. ; LALLOO, F. ; EVANS, D. G. ; EASTON, D. F. : *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. In: *American Journal of Human Genetics* 72 (2003), S. 1117–1130

- [435] NAROD, S. A. ; FOULKES, W. D. : *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. In: *Nature Reviews Cancer* 4 (2004), S. 665–676
- [436] BHATTACHARYYA, A. ; EAR, U. S. ; KOLLER, B. H. ; WEICHELBAUM, R. R. ; BISHOP, D. K. : *The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), S. 23899–23903
- [437] DHILLON, K. K. ; SWISHER, E. M. ; TANIGUCHI, T. : *Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance*. In: *Cancer Science* 102 (2011), S. 663–669
- [438] SWISHER, E. M. ; SAKAI, W. ; KARLAN, B. Y. ; WURZ, K. ; URBAN, N. ; TANIGUCHI, T. : *Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance*. In: *Cancer Research* 68 (2008), S. 2581–2586
- [439] SAKAI, W. ; SWISHER, E. M. ; KARLAN, B. Y. ; AGARWAL, M. K. ; HIGGINS, J. ; FRIEDMAN, C. ; VILLEGAS, E. ; JACQUEMONT, C. ; FARRUGIA, D. J. ; COUCH, F. J. ; URBAN, N. ; TANIGUCHI, T. : *Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers*. In: *Nature* 451 (2008), S. 1116–1120
- [440] WANG, Y. ; BERNHARDY, A. J. ; CRUZ, C. ; KRAIS, J. J. ; NACSON, J. ; NICOLAS, E. ; PERI, S. ; VAN DER GULDEN, H. ; VAN DER HEIJDEN, I. ; O'BRIEN, S. W. ; ZHANG, Y. ; HARRELL, M. I. ; JOHNSON, S. F. ; CANDIDO DOS REIS, F. J. ; PHAROAH, P. D. P. ; KARLAN, B. ; GOURLEY, C. ; LAMBRECHTS, D. ; CHENEVIX-TRENCH, G. ; OLSSON, H. ; BENITEZ, J. J. ; GREENE, M. H. ; GORE, M. ; NUSSBAUM, R. ; SADETZKI, S. ; GAYTHER, S. A. ; KJAER, S. K. ; D'ANDREA, A. D. ; SHAPIRO, G. I. ; WIEST, D. L. ; CONNOLLY, D. C. ; DALY, M. B. ; SWISHER, E. M. ; BOUWMAN, P. ; JONKERS, J. ; BALMAÑA, J. ; SERRA, V. ; JOHNSON, N. : *The BRCA1-Δ11q Alternative Splice Isoform Bypasses Germline Mutations and Promotes Therapeutic Resistance to PARP Inhibition and Cisplatin*. In: *Cancer Research* 76 (2016), S. 2778–2790
- [441] SUN, P. ; LI, Y. ; CHAO, X. ; LI, J. ; LUO, R. ; LI, M. ; HE, J. : *Clinical characteristics and prognostic implications of BRCA-associated tumors in males: a pan-tumor survey*. In: *BMC Cancer* 20 (2020), Art.-Nr. 994
- [442] SULLIVAN, M. R. ; BERNSTEIN, K. A. : *RAD-ical New Insights into RAD51 Regulation*. In: *Genes* 9 (2018), Art.-Nr. 629
- [443] SOMYAJIT, K. ; SAXENA, S. ; BABU, S. ; MISHRA, A. ; NAGARAJU, G. : *Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart*. In: *Nucleic Acids Research* 43 (2015), S. 9835–9855
- [444] HENRY-MOWATT, J. ; JACKSON, D. ; MASSON, J.-Y. ; JOHNSON, P. A. ; CLEMENTS, P. M. ; BENSON, F. E. ; THOMPSON, L. H. ; TAKEDA, S. ; WEST, S. C. ; CALDECOTT, K. W. : *XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes*. In: *Molecular Cell* 11 (2003), S. 1109–1117
- [445] RAAPHORST, G. P. ; LI, L. F. ; YANG, D. P. : *Evaluation of adaptive responses to cisplatin in normal and mutant cell lines with mutations in recombination repair pathways*. In: *Anticancer Research* 26 (2006), S. 1183–1187
- [446] TAKATA, M. ; SASAKI, M. S. ; TACHIIRI, S. ; FUKUSHIMA, T. ; SONODA, E. ; SCHILD, D. ; THOMPSON, L. H. ; TAKEDA, S. : *Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout*

- mutants of the five Rad51 paralogs*. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (2001), S. 2858–2866
- [447] XU, Z.-Y. ; LOIGNON, M. ; HAN, F.-Y. ; PANASCI, L. ; ALOYZ, R. : *Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis*. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314 (2005), S. 495–505
- [448] CONNELL, P. P. ; SIDDIQUI, N. ; HOFFMAN, S. ; KUANG, A. ; KHATIPOV, E. -A. ; WEICHELBAUM, R. R. ; BISHOP, Douglas K. : *A hot spot for RAD51C interactions revealed by a peptide that sensitizes cells to cisplatin*. In: *Cancer Research* 64 (2004), S. 3002–3005
- [449] MA, Q. ; ZHAO, Y. ; WANG, S. ; ZHANG, X. ; ZHANG, J. ; DU, M. ; LI, L. ; ZHANG, Y. : *Genetic polymorphisms of XRCC3 Thr241Met (C18067T, rs861539) and bladder cancer risk: a meta-analysis of 18 research studies*. In: *Tumor Biology* 35 (2014), S. 1473–1480
- [450] PENG, Q. ; MO, C. ; TANG, W. ; CHEN, Z. ; LI, R. ; ZHAI, L. ; YANG, S. ; WU, J. ; SUI, J. ; LI, S. ; QIN, X. : *DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and bladder cancer risk: a meta-analysis*. In: *Tumor Biology* 35 (2014), S. 1933–1944
- [451] CHANG, H. H. Y. ; PANNUNZIO, N. R. ; ADACHI, N. ; LIEBER, M. R. : *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (2017), S. 495–506
- [452] RAMSDEN, D. A. ; GELLERT, M. : *Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks*. In: *The EMBO Journal* 17 (1998), S. 609–614
- [453] GU, J. ; LI, S. ; ZHANG, X. ; WANG, L.-C. ; NIEWOLIK, D. ; SCHWARZ, K. ; LEGERSKI, R. J. ; ZANDI, E. ; LIEBER, M. R. : *DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis*. In: *DNA Repair* 9 (2010), S. 429–437
- [454] MA, Y. ; PANNICKE, U. ; LIEBER, M. R. : *Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination*. In: *Cell* 108 (2002), S. 781–794
- [455] BERNSTEIN, N. K. ; WILLIAMS, R. S. ; RAKOVSKY, M. L. ; CUI, D. ; GREEN, R. ; KARIMI-BUSHERI, F. ; MANI, R. S. ; GALICIA, S. ; KOCH, C. A. ; CASS, C. E. ; DUROCHER, D. ; WEINFELD, M. ; GLOVER, J. N. M. : *The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase*. In: *Molecular Cell* 17 (2005), S. 657–670
- [456] DAVIS, A. J. ; CHEN, D. J. : *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. In: *Translational Cancer Research* 2 (2013), S. 130–143
- [457] ANDRES, S. N. ; VERGNES, A. ; RISTIC, D. ; WYMAN, C. ; MODESTI, M. ; JUNOP, M. : *A human XRCC4-XLF complex bridges DNA*. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), S. 1868–1878
- [458] OCHI, T. ; BLACKFORD, A. N. ; COATES, J. ; JHUJH, S. ; MEHMOOD, S. ; TAMURA, N. ; TRAVERS, J. ; WU, Q. ; DRAVIAM, V. M. ; ROBINSON, C. V. ; BLUNDELL, T. L. ; JACKSON, S. P. : *PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair*. In: *Science* 347 (2015), S. 185–188

- [459] WU, P.-Y. ; FRIT, P. ; MEESALA, S. ; DAUVILLIER, S. ; MODESTI, M. ; ANDRES, S. N. ; HUANG, Y. ; SEKIGUCHI, J. ; CALSOU, P. ; SALLES, B. ; JUNOP, M. S. : *Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4*. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (2009), S. 3163–3172
- [460] SINHA, S. ; VILLARREAL, D. ; SHIM, E. Y. ; LEE, S. E. : *Risky business: Microhomology-mediated end joining*. In: *Mutation Research* 788 (2016), S. 17–24
- [461] SEOL, J.-H. ; SHIM, E. Y. ; LEE, S. E. : *Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly*. In: *Mutation Research* 809 (2018), S. 81–87
- [462] WANG, H. ; XU, X. : *Microhomology-mediated end joining: new players join the team*. In: *Cell & Bioscience* 7 (2017), Art.-Nr. 6
- [463] BLACK, S. J. ; KASHKINA, E. ; KENT, T. ; POMERANTZ, R. T. : *DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine*. In: *Genes* 7 (2016), Art.-Nr. 67
- [464] SHARMA, S. ; JAVADEKAR, S. M. ; PANDEY, M. ; SRIVASTAVA, M. ; KUMARI, R. ; RAGHAVAN, S. C. : *Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining*. In: *Cell Death & Disease* 6 (2015), Art.-Nr. e1697
- [465] CECCALDI, R. ; LIU, J. C. ; AMUNUGAMA, R. ; HAJDU, I. ; PRIMACK, B. ; PETALCORIN, M. I. R. ; O'CONNOR, K. W. ; KONSTANTINOPOULOS, P. A. ; ELLEDGE, S. J. ; BOULTON, S. J. ; YUSUFZAI, T. ; D'ANDREA, A. D. : *Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair*. In: *Nature* 518 (2015), S. 258–262
- [466] SFEIR, A. ; SYMINGTON, L. S. : *Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway?* In: *Trends in Biochemical Sciences* 40 (2015), S. 701–714
- [467] ROSENBERG, P. S. ; GREENE, M. H. ; ALTER, B. P. : *Cancer incidence in persons with Fanconi anemia*. In: *Blood* 101 (2003), S. 822–826
- [468] ZHANG, J. ; DEWAR, J. M. ; BUDZOWSKA, M. ; MOTNENKO, A. ; COHN, M. A. ; WALTER, J. C. : *DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence*. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (2015), S. 242–247
- [469] LONG, D. T. ; JOUKOV, V. ; BUDZOWSKA, M. ; WALTER, J. C. : *BRCA1 promotes unloading of the CMG helicase from a stalled DNA replication fork*. In: *Molecular Cell* 56 (2014), S. 174–185
- [470] SINGH, T. R. ; ALI, A. M. ; PARAMASIVAM, M. ; PRADHAN, A. ; WAHENGAM, K. ; SEIDMAN, M. M. ; MEETEI, A. R. : *ATR-dependent phosphorylation of FANCM at serine 1045 is essential for FANCM functions*. In: *Cancer Research* 73 (2013), S. 4300–4310
- [471] WANG, W. : *Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins*. In: *Nature Reviews Genetics* 8 (2007), S. 735–748
- [472] TANIGUCHI, T. ; XU, B. ; KIM, S.-T. ; KASTAN, M. B. ; GARCIA-HIGUERA, I. ; ANDREASSEN, P. R. ; GREGORY, R. C. ; LANE, W. S. ; D'ANDREA, A. D. : *Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways*. In: *Cell* 109 (2002), S. 459–472
- [473] MEETEI, A. R. ; DE WINTER, J. P. ; MEDHURST, A. L. ; WALLISCH, M. ; WAISFISZ, Q. ; VAN DE VRUGT, H. J. ; OOSTRA, A. B. ; YAN, Z. ; LING, C. ; BISHOP, C. E. ; HOATLIN, M. E. ; JOENJE, H. ; WANG, W. : *A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia*. In: *Nature Genetics* 35 (2003), S. 165–170

- [474] ISHIAI, M. ; KITAO, H. ; SMOGORZEWSKA, A. ; TOMIDA, J. ; KINOMURA, A. ; UCHIDA, E. ; SABERI, A. ; KINOSHITA, E. ; KINOSHITA-KIKUTA, E. ; KOIKE, T. ; TASHIRO, S. ; ELLEDGE, S. J. ; TAKATA, M. : *FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway*. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (2008), S. 1138–1146
- [475] ANDREASSEN, P. R. ; D'ANDREA, A. D. ; TANIGUCHI, T. : *ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response*. In: *Genes & Development* 18 (2004), S. 1958–1963
- [476] SMOGORZEWSKA, A. ; MATSUOKA, S. ; VINCIGUERRA, P. ; McDONALD, E. R. ; HUROV, K. E. ; LUO, J. ; BALLIF, B. A. ; GYGI, S. P. ; HOFMANN, K. ; D'ANDREA, A. D. ; ELLEDGE, S. J. : *Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair*. In: *Cell* 129 (2007), S. 289–301
- [477] TAN, W. ; VAN TWEST, S. ; MURPHY, V. J. ; DEANS, A. J. : *ATR-Mediated FANCI Phosphorylation Regulates Both Ubiquitination and Deubiquitination of FANCD2*. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (2020), Art.-Nr. 2
- [478] MCNEIL, E. M. ; MELTON, D. W. : *DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy*. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), S. 9990–10004
- [479] BUDZOWSKA, M. ; GRAHAM, T. G. W. ; SOBECK, A. ; WAGA, S. ; WALTER, J. C. : *Regulation of the Rev1-pol ζ complex during bypass of a DNA interstrand cross-link*. In: *The EMBO Journal* 34 (2015), S. 1971–1985
- [480] KNIPSCHER, P. ; RÄSCHLE, M. ; SMOGORZEWSKA, A. ; ENOIU, M. ; HO, T. V. ; SCHÄRER, O. D. ; ELLEDGE, S. J. ; WALTER, J. C. : *The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair*. In: *Science* 326 (2009), S. 1698-1701
- [481] RAY CHAUDHURI, A. ; NUSSENZWEIG, A. : *The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (2017), S. 610–621
- [482] ZHANG, C. X. ; CHANG, P. V. ; LIPPARD, S. J. : *Identification of nuclear proteins that interact with platinum-modified DNA by photoaffinity labeling*. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), S. 6536–6537
- [483] OLAUSSEN, K. A. ; ADAM, J. ; VANHECKE, E. ; VIELH, P. ; PIRKER, R. ; FRIBOULET, L. ; POPPER, H. ; ROBIN, A. ; COMMO, F. ; THOMALE, J. ; KAYITALIRE, L. ; FILIPITS, M. ; LE CHEVALIER, T. ; ANDRÉ, F. ; BRAMBILLA, E. ; SORIA, J.-C. : *PARP1 impact on DNA repair of platinum adducts: preclinical and clinical read-outs*. In: *Lung Cancer* 80 (2013), S. 216–222
- [484] POIRIER, G. G. ; DE MURCIA, G. ; JONGSTRA-BILEN, J. ; NIEDERGANG, C. ; MANDEL, P. : *Poly(ADP-ribose)ylation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (1982), S. 3423–3427
- [485] PASCAL, J. M. : *The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage*. In: *DNA Repair* 71 (2018), S. 177–182
- [486] KRIETSCH, J. ; ROULEAU, M. ; PIC, É. ; ETHIER, C. ; DAWSON, T. M. ; DAWSON, V. L. ; MASSON, J.-Y. ; POIRIER, G. G. ; GAGNÉ, J.-P. : *Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins*. In: *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2013), S. 1066–1087

- [487] HAINCE, J.-F. ; KOZLOV, S. ; DAWSON, V. L. ; DAWSON, T. M. ; HENDZEL, M. J. ; LAVIN, M. F. ; POIRIER, G. G. : *Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), S. 16441–16453
- [488] HAINCE, J.-F. ; McDONALD, D. ; RODRIGUE, A. ; DÉRY, U. ; MASSON, J.-Y. ; HENDZEL, M. J. ; POIRIER, G. G. : *PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), S. 1197–1208
- [489] KING, B. S. ; COOPER, K. L. ; LIU, K. J. ; HUDSON, L. G. : *Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2012), S. 39824–39833
- [490] LI, M. ; YU, X. : *Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation.* In: *Cancer Cell* 23 (2013), S. 693–704
- [491] RUSCETTI, T. ; LEHNERT, B. E. ; HALBROOK, J. ; LE TRONG, H. ; HOEKSTRA, M. F. ; CHEN, D. J. ; PETERSON, S. R. : *Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), S. 14461–14467
- [492] LUIJSTERBURG, M. S. ; DE KRIJGER, Inge ; WIEGANT, W. W. ; SHAH, R. G. ; SMEENK, G. ; DE GROOT, A. J. L. ; PINES, A. ; VERTEGAAL, A. C. O. ; JACOBS, J. J. L. ; SHAH, G. M. ; VAN ATTIKUM, H. : *PARP1 Links CHD2-Mediated Chromatin Expansion and H3.3 Deposition to DNA Repair by Non-homologous End-Joining.* In: *Molecular Cell* 61 (2016), S. 547–562
- [493] BRYANT, H. E. ; PETERMANN, E. ; SCHULTZ, N. ; JEMTH, A.-S. ; LOSEVA, O. ; ISSAEVA, N. ; JOHANSSON, F. ; FERNANDEZ, S. ; MCGLYNN, P. ; HELLEDAY, T. : *PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination.* In: *The EMBO Journal* 28 (2009), S. 2601–2615
- [494] BRYANT, H. E. ; SCHULTZ, N. ; THOMAS, H. D. ; PARKER, K. M. ; FLOWER, D. ; LOPEZ, E. ; KYLE, S. ; MEUTH, M. ; CURTIN, N. J. ; HELLEDAY, T. : *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.* In: *Nature* 434 (2005), S. 913–917
- [495] FARMER, H. ; MCCABE, N. ; LORD, C. J. ; TUTT, A. N. J. ; JOHNSON, D. A. ; RICHARDSON, T. B. ; SANTAROSA, M. ; DILLON, K. J. ; HICKSON, I. ; KNIGHTS, C. ; MARTIN, N. M. B. ; JACKSON, S. P. ; SMITH, G. C. M. ; ASHWORTH, A. : *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* In: *Nature* 434 (2005), S. 917–921
- [496] HELLEDAY, T. : *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings.* In: *Molecular Oncology* 5 (2011), S. 387–393
- [497] ROSE, M. ; BURGESS, J. T. ; O'BYRNE, K. ; RICHARD, D. J. ; BOLDESON, E. : *PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance.* In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (2020), Art.-Nr. 564601
- [498] KIM, G. ; ISON, G. ; MCKEE, A. E. ; ZHANG, H. ; TANG, S. ; GWISE, T. ; SRIDHARA, R. ; LEE, E. ; TZOU, A. ; PHILIP, R. ; CHIU, H.-J. ; RICKS, T. K. ; PALMBY, T. ; RUSSELL, A. M. ; LADOUCEUR, G. ; PFUMA, E. ; LI, H. ; ZHAO, L. ; LIU, Q. ; VENUGOPAL, R. ; IBRAHIM, A. ; PAZDUR, R. : *FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced*

Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. In: *Clinical Cancer Research* 21 (2015), S. 4257–4261

- [499] FONG, P. C. ; BOSS, D. S. ; YAP, T. A. ; TUTT, A. ; WU, P. ; MERGUI-ROELVINK, M. ; MORTIMER, P. ; SWAISLAND, H. ; LAU, A. ; O'CONNOR, M. J. ; ASHWORTH, A. ; CARMICHAEL, J. ; KAYE, S. B. ; SCHELLENS, J. H. M. ; DE BONO, J. S. : *Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers*. In: *The New England Journal of Medicine* 361 (2009), S. 123-134
- [500] MCQUADE, R. M. ; STOJANOVSKA, V. ; BORNSTEIN, J. C. ; NURGALI, K. : *PARP inhibition in platinum-based chemotherapy: Chemopotentiation and neuroprotection*. In: *Pharmacological Research* 137 (2018), S. 104–113
- [501] D'ARCY, M. S. : *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. In: *Cell Biology International* 43 (2019), S. 582–592
- [502] ELMORE, S. : *Apoptosis: a review of programmed cell death*. In: *Toxicologic Pathology* 35 (2007), S. 495–516
- [503] SCHULER, M. ; GREEN, D. R. : *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. In: *Biochemical Society Transactions* 29 (2001), S. 684–688
- [504] GARRIDO, C. ; GALLUZZI, L. ; BRUNET, M. A. ; PUIG, P.-E. ; DIDELOT, C. ; KROEMER, G. : *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. In: *Cell Death and Differentiation* 13 (2006), S. 1423–1433
- [505] CORY, S. ; ADAMS, J. M. : *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. In: *Nature Reviews Cancer* 2 (2002), S. 647–656
- [506] KALKAVAN, H. ; GREEN, D. R. : *MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business*. In: *Cell Death and Differentiation* 25 (2018), S. 46–55
- [507] SHAMAS-DIN, A. ; KALE, J. ; LEBER, B. ; ANDREWS, D. W. : *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2013), Art.-Nr. a008714
- [508] KALE, J. ; OSTERLUND, E. J. ; ANDREWS, D. W. : *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. In: *Cell Death and Differentiation* 25 (2018), S. 65–80
- [509] LI, P. ; NIJHAWAN, D. ; BUDIARDJO, I. ; SRINIVASULA, S. M. ; AHMAD, M. ; ALNEMRI, E. S. ; WANG, X. : *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. In: *Cell* 91 (1997), S. 479–489
- [510] WÜRSTLE, M. L. ; LAUSSMANN, M. A. ; REHM, M. : *The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome*. In: *Experimental Cell Research* 318 (2012), S. 1213–1220
- [511] DU, C. ; FANG, M. ; LI, Y. ; LI, L. ; WANG, X. : *Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition*. In: *Cell* 102 (2000), S. 33–42
- [512] VAN LOO, G. ; VAN GURP, M. ; DEPUYDT, B. ; SRINIVASULA, S. M. ; RODRIQUEZ, I. ; ALNEMRI, E. S. ; GEVAERT, K. ; VANDEKERCKHOVE, J. ; DECLERCQ, W. ; VANDENABEELE, P. : *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity*. In: *Cell Death and Differentiation* 9 (2002), S. 20–26

- [513] DEVERAUX, Q. L. ; ROY, N. ; STENNICKE, H. R. ; VAN ARSDALE, T. ; ZHOU, Q. ; SRINIVASULA, S. M. ; ALNEMRI, E. S. ; SALVESEN, G. S. ; REED, J. C. : *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. In: *The EMBO Journal* 17 (1998), S. 2215–2223
- [514] DEVERAUX, Q. L. ; TAKAHASHI, R. ; SALVESEN, G. S. ; REED, J. C. : *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. In: *Nature* 388 (1997), S. 300–304
- [515] JOST, P. J. ; VUCIC, D. : *Regulation of Cell Death and Immunity by XIAP*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12 (2020), Art.-Nr. a036426
- [516] MORRISH, E. ; BRUMATTI, G. ; SILKE, J. : *Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics*. In: *Cells* 9 (2020), Art.-Nr. 406
- [517] HETZ, C. : *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2012), S. 89–102
- [518] SZEGEZDI, E. ; LOGUE, S. E. ; GORMAN, A. M. ; SAMALI, A. : *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. In: *EMBO Reports* 7 (2006), S. 880–885
- [519] MANDIC, A. ; HANSSON, J. ; LINDER, S. ; SHOSHAN, M. C. : *Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 9100–9106
- [520] RON, D. ; WALTER, P. : *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (2007), S. 519–529
- [521] TABAS, I. ; RON, D. : *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. In: *Nature Cell Biology* 13 (2011), S. 184–190
- [522] KREBS, J. ; AGELLON, L. B. ; MICHALAK, M. : *Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460 (2015), S. 114–121
- [523] NAKAGAWA, T. ; YUAN, J. : *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis*. In: *The Journal of Cell Biology* 150 (2000), S. 887–894
- [524] MORISHIMA, N. ; NAKANISHI, K. ; TAKENOUCHE, H. ; SHIBATA, T. ; YASUHIKO, Y. : *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 34287–34294
- [525] MOMENI, H. R. : *Role of calpain in apoptosis*. In: *Cell Journal* 13 (2011), S. 65–72
- [526] PINTON, P. ; GIORGI, C. ; SIVIERO, R. ; ZECCHINI, E. ; RIZZUTO, R. : *Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis*. In: *Oncogene* 27 (2008), S. 6407–6418
- [527] HAYASHI, T. ; RIZZUTO, R. ; HAJNOCZKY, G. ; SU, T.-P. : *MAM: more than just a housekeeper*. In: *Trends in Cell Biology* 19 (2009), S. 81–88
- [528] BAINES, C. P. ; GUTIÉRREZ-AGUILAR, M. : *The still uncertain identity of the channel-forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore*. In: *Cell Calcium* 73 (2018), S. 121–130

- [529] ICHAS, F. ; MAZAT, J. P. : *From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state.* In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1366 (1998), S. 33–50
- [530] DI LISA, F. ; BERNARDI, P. : *A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition.* In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46 (2009), S. 775–780
- [531] XU, L. ; XIE, Q. ; QI, L. ; WANG, C. ; XU, N. ; LIU, W. ; YU, Y. ; LI, S. ; XU, Y. : *Bcl-2 overexpression reduces cisplatin cytotoxicity by decreasing ER-mitochondrial Ca²⁺ signaling in SKOV3 cells.* In: *Oncology Reports* 39 (2018), S. 985–992
- [532] RONG, Y.-P. ; BULTYNCK, G. ; AROMOLARAN, A. S. ; ZHONG, F. ; PARYS, J. B. ; DE SMEDT, H. ; MIGNERY, G. A. ; RODERICK, H. L. ; BOOTMAN, M. D. ; DISTELHORST, C. W. : *The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), S. 14397–14402
- [533] ARBEL, N. ; SHOSHAN-BARMATZ, V. : *Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2010), S. 6053–6062
- [534] AKL, H. ; VERVLOESSEM, T. ; KIVILUOTO, S. ; BITTREMIEUX, M. ; PARYS, J. B. ; DE SMEDT, H. ; BULTYNCK, G. : *A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum.* In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843 (2014), S. 2240–2252
- [535] HAMADA, K. ; MIKOSHIBA, K. : *IP3 Receptor Plasticity Underlying Diverse Functions.* In: *Annual Review of Physiology* 82 (2020), S. 151–176
- [536] SZADO, T. ; VANDERHEYDEN, V. ; PARYS, J. B. ; DE SMEDT, H. ; RIETDORF, K. ; KOTELEVETS, L. ; CHASTRE, E. ; KHAN, F. ; LANDEGREN, U. ; SÖDERBERG, O. ; BOOTMAN, M. D. ; RODERICK, H. L. : *Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), S. 2427–2432
- [537] REINA, S. ; DE PINTO, V. : *Anti-Cancer Compounds Targeted to VDAC: Potential and Perspectives.* In: *Current Medicinal Chemistry* 24 (2017), S. 4447–4469
- [538] TAJEDDINE, N. ; GALLUZZI, L. ; KEPP, O. ; HANGEN, E. ; MORSELLI, E. ; SENOVILLA, L. ; ARAUJO, N. ; PINNA, G. ; LAROCLETTE, N. ; ZAMZAMI, N. ; MODJTAHEDI, N. ; HAREL-BELLAN, A. ; KROEMER, G. : *Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death.* In: *Oncogene* 27 (2008), S. 4221–4232
- [539] PISTRITTO, G. ; TRISCIUOGLIO, D. ; CECI, C. ; GARUFI, A. ; D'ORAZI, G. : *Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies.* In: *Ageing* 8 (2016), S. 603–619
- [540] HEINRICH, P. C. ; KOCH, H.-G. ; BRIX, J. : *Apoptose – Der programmierte Zelltod.* In: HEINRICH, P. C. ; MÜLLER, M. ; GRAEVE, L. (Hrsg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg : Springer, 2014, S. 633–637

- [541] KISCHKEL, F. C. ; HELLBARDT, S. ; BEHRMANN, I. ; GERMER, M. ; PAWLITA, M. ; KRAMMER, P. H. ; PETER, M. E. : *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. In: *The EMBO Journal* 14 (1995), S. 5579–5588
- [542] WARING, P. ; MÜLLBACHER, A. : *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology*. In: *Immunology and Cell Biology* 77 (1999), S. 312–317
- [543] KRUYT, F. A. E. : *TRAIL and cancer therapy*. In: *Cancer Letters* 263 (2008), S. 14–25
- [544] OIKONOMOU, E. ; PINTZAS, A. : *The TRAIL of oncogenes to apoptosis*. In: *BioFactors* 39 (2013), S. 343–354
- [545] HUANG, K. ; O'NEILL, K. L. ; LI, J. ; ZHOU, W. ; HAN, N. ; PANG, X. ; WU, W. ; STRUBLE, L. ; BORGSTAHL, G. ; LIU, Z. ; ZHANG, L. ; LUO, X. : *BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis*. In: *Cell Research* 29 (2019), S. 942–952
- [546] SCAFFIDI, C. ; FULDA, S. ; SRINIVASAN, A. ; FRIESEN, C. ; LI, F. ; TOMASELLI, K. J. ; DEBATIN, K.-M. ; KRAMMER, P. H. ; PETER, M. E. : *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. In: *The EMBO Journal* 17 (1998), S. 1675–1687
- [547] JOST, P. J. ; GRABOW, S. ; GRAY, D. ; MCKENZIE, M. D. ; NACHBUR, U. ; HUANG, D. C. S. ; BOUILLET, P. ; THOMAS, H. E. ; BORNER, C. ; SILKE, J. ; STRASSER, A. ; KAUFMANN, T. : *XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis*. In: *Nature* 460 (2009), S. 1035–1039
- [548] SAKAHIRA, H. ; ENARI, M. ; NAGATA, S. : *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. In: *Nature* 391 (1998), S. 96–99
- [549] BANO, D. ; PREHN, J. H. M. : *Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer*. In: *EBioMedicine* 30 (2018), S. 29–37
- [550] IGNEY, F. H. ; KRAMMER, P. H. : *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. In: *Nature Reviews Cancer* 2 (2002), S. 277–288
- [551] BRATTON, D. L. ; FADOK, V. A. ; RICHTER, D. A. ; KAILEY, J. M. ; GUTHRIE, L. A. ; HENSON, P. M. : *Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), S. 26159–26165
- [552] SCHENK, R. L. ; STRASSER, A. ; DEWSON, G. : *BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (2017), S. 459–469
- [553] DEMPKE, W. ; VOIGT, W. ; GROTHEY, A. ; HILL, B. T. ; SCHMOLL, H. J. : *Cisplatin resistance and oncogenes-a review*. In: *Anti-Cancer Drugs* 11 (2000), S. 225–236
- [554] GALLUZZI, L. ; SENOVILLA, L. ; VITALE, I. ; MICHELS, J. ; MARTINS, I. ; KEPP, O. ; CASTEDO, M. ; KROEMER, G. : *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. In: *Oncogene* 31 (2012), S. 1869–1883
- [555] PARK, S. B. ; LEE, J. H. ; JEONG, W. W. ; KIM, Y. H. ; CHA, H. J. ; JOE, Y. ; CHUNG, H. T. ; CHO, W. J. ; DO, J. W. ; LEE, B. J. ; PARK, J. W. ; KO, B. K. : *TTP mediates cisplatin-induced apoptosis of head and neck cancer cells by down-regulating the expression of Bcl-2*. In: *Journal of Chemotherapy* 27 (2015), S. 174–180

- [556] YU, L. ; WANG, Z. : *Difference in expression of Bcl-2 and Bcl-xl genes in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines*. In: *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Sciences* 24 (2004), S. 151–153
- [557] PARK, S. A. ; PARK, H. J. ; LEE, B. I. ; AHN, Y. H. ; KIM, S. U. ; CHOI, K. S. : *Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated p53 accumulation in B104 cells*. In: *Molecular Brain Research* 93 (2001), S. 18–26
- [558] MANO, Y. ; KIKUCHI, Y. ; YAMAMOTO, K. ; KITA, T. ; HIRATA, J. ; TODE, T. ; ISHII, K. ; NAGATA, I. : *Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer*. In: *European Journal of Cancer* 35 (1999), S. 1214–1219
- [559] MICHAUD, W. A. ; NICHOLS, A. C. ; MROZ, E. A. ; FAQUIN, W. C. ; CLARK, J. R. ; BEGUM, S. ; WESTRA, W. H. ; WADA, H. ; BUSSE, P. M. ; ELLISEN, L. W. ; ROCCO, J. W. : *Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma*. In: *Clinical Cancer Research* 15 (2009), S. 1645–1654
- [560] HAN, J.-Y. ; HONG, E. K. ; CHOI, B. G. ; PARK, J. N. ; KIM, K. W. ; KANG, J. H. ; JIN, J.-Y. ; PARK, S. Y. ; HONG, Y. S. ; LEE, K. S. : *Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. In: *Medical Oncology* 20 (2003), S. 355–362
- [561] LI, J. ; VIALLET, J. ; HAURA, E. B. : *A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61 (2008), S. 525–534
- [562] XIE, Q. ; SU, J. ; JIAO, B. ; SHEN, L. ; MA, L. ; QU, X. ; YU, C. ; JIANG, X. ; XU, Y. ; SUN, L. : *ABT737 reverses cisplatin resistance by regulating ER-mitochondria Ca²⁺ signal transduction in human ovarian cancer cells*. In: *International Journal of Oncology* 49 (2016), S. 2507–2519
- [563] HOU, L. ; WANG, R. ; WEI, H. ; LI, S. ; LIU, L. ; LU, X. ; YU, H. ; LIU, Z. : *ABT737 enhances ovarian cancer cells sensitivity to cisplatin through regulation of mitochondrial fission via Sirt3 activation*. In: *Life Sciences* 232 (2019), Art.-Nr. 116561
- [564] ARISAN, E. D. ; KUTUK, O. ; TEZIL, T. ; BODUR, C. ; TELCI, D. ; BASAGA, H. : *Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells*. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 119 (2010), S. 271–281
- [565] ROUETTE, A. ; PARENT, S. ; GIROUARD, J. ; LEBLANC, V. ; ASSELIN, E. : *Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells*. In: *International Journal of Cancer* 130 (2012), S. 1755–1767
- [566] BRAY, K. ; CHEN, H.-Y. ; KARP, C. M. ; MAY, M. ; GANESAN, S. ; KARANTZA-WADSWORTH, V. ; DI PAOLA, R. S. ; WHITE, E. : *Bcl-2 modulation to activate apoptosis in prostate cancer*. In: *Molecular Cancer Research* 7 (2009), S. 1487–1496
- [567] FAN, Z. ; YU, H. ; CUI, N. ; KONG, X.i ; LIU, X. ; CHANG, Y. ; WU, Y. ; SUN, L. ; WANG, G. : *ABT737 enhances cholangiocarcinoma sensitivity to cisplatin through regulation of mitochondrial dynamics*. In: *Experimental Cell Research* 335 (2015), S. 68–81

- [568] QIU, T. ; ZHOU, L. ; WANG, T. ; XU, J. ; WANG, J. ; CHEN, W. ; ZHOU, X. ; HUANG, Z. ; ZHU, W. ; SHU, Y. ; LIU, P. : *miR-503 regulates the resistance of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting Bcl-2*. In: *International Journal of Molecular Medicine* 32 (2013), S. 593–598
- [569] HUANG, Z. ; LEI, X. ; ZHONG, M. ; ZHU, B. ; TANG, S. ; LIAO, D. : *Bcl-2 small interfering RNA sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cell to cisplatin and diallyl disulfide*. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39 (2007), S. 835–843
- [570] YDE, C. W. ; ISSINGER, O.-G. : *Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D1*. In: *International Journal of Oncology* 29 (2006), S. 1397–1404
- [571] ZHUANG, M. ; SHI, Q. ; ZHANG, X. ; DING, Y. ; SHAN, L. ; SHAN, X. ; QIAN, J. ; ZHOU, X. ; HUANG, Z. ; ZHU, W. ; DING, Y. ; CHENG, W. ; LIU, P. ; SHU, Y. : *Involvement of miR-143 in cisplatin resistance of gastric cancer cells via targeting IGF1R and BCL2*. In: *Tumor Biology* 36 (2015), S. 2737–2745
- [572] YANG, M. ; SHAN, X. ; ZHOU, X. ; QIU, T. ; ZHU, W. ; DING, Y. ; SHU, Y. ; LIU, P. : *miR-1271 regulates cisplatin resistance of human gastric cancer cell lines by targeting IGF1R, IRS1, mTOR, and BCL2*. In: *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 14 (2014), S. 884–891
- [573] KAUSCH, I. ; JIANG, H. ; THODE, B. ; DOEHN, C. ; KRÜGER, S. ; JOCHAM, D. : *Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma*. In: *European Urology* 47 (2005), Nr. 5, S. 703–709
- [574] YUAN, T.-Z. ; ZHANG, H.-H. ; LIN, X.-L. ; YU, J.-X. ; YANG, Q.-X. ; LIANG, Y. ; DENG, J. ; HUANG, L.-J. ; ZHANG, X.-P. : *microRNA-125b reverses the multidrug resistance of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting of Bcl-2*. In: *Molecular Medicine Reports* 15 (2017), S. 2223–2228
- [575] MIYAKE, H. ; HANADA, N. ; NAKAMURA, H. ; KAGAWA, S. ; FUJIWARA, T. ; HARA, I. ; ETO, H. ; GOHJI, K. ; ARAKAWA, S. ; KAMIDONO, S. ; SAYA, H. : *Overexpression of Bcl-2 in bladder cancer cells inhibits apoptosis induced by cisplatin and adenoviral-mediated p53 gene transfer*. In: *Oncogene* 16 (1998), S. 933–943
- [576] CHO, H. J. ; KIM, J. K. ; KIM, K. D. ; YOON, H. K. ; CHO, M.-Y. ; PARK, Y. P. ; JEON, J. H. ; LEE, E. S. ; BYUN, S.-S. ; LIM, H. M. ; SONG, E. Y. ; LIM, J.-S. ; YOON, D.-Y. ; LEE, H. G. ; CHOE, Y.-K. : *Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells*. In: *Cancer Letters* 237 (2006), S. 56–66
- [577] YU, H.-M. ; WANG, T.-C. : *Mechanism of cisplatin resistance in human urothelial carcinoma cells*. In: *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012), S. 1226–1237
- [578] BOLENZ, C. ; BECKER, A. ; TROJAN, L. ; SCHAAF, A. ; CAO, Y. ; WEISS, C. ; ALKEN, P. ; MICHEL, M. S. : *Optimizing chemotherapy for transitional cell carcinoma by application of bcl-2 and bcl-xL antisense oligodeoxynucleotides*. In: *Urologic Oncology* 25 (2007), S. 476–482
- [579] COOKE, P. W. ; JAMES, N. D. ; GANESAN, R. ; BURTON, A. ; YOUNG, L. S. ; WALLACE, D. M. : *Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy*. In: *BJU International* 85 (2000), S. 829–835

- [580] TURKER, P. ; SEGERSTEN, U. ; MALMSTRÖM, P.-U. ; HEMDAN, T. : *Is Bcl-2 a predictive marker of neoadjuvant chemotherapy response in patients with urothelial bladder cancer undergoing radical cystectomy?* In: *Scandinavian Journal of Urology* 53 (2019), S. 45–50
- [581] D'AGUANNO, S. ; DEL BUFALO, D. : *Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer.* In: *Cells* 9 (2020), Art.-Nr. 1287
- [582] LOK, S. W. ; WHITTLE, J. R. ; VAILLANT, F. ; TEH, C. E. ; LO, L. L. ; POLICHENI, A. N. ; BERGIN, A. R. T. ; DESAI, J. ; FTOUNI, S. ; GANDOLFO, L. C. ; LIEW, D. ; LIU, H. K. ; MANN, G. B. ; MOODIE, K. ; MURUGASU, A. ; PAL, B. ; ROBERTS, A. W. ; ROSENTHAL, M. A. ; SHACKLETON, K. ; SILVA, M. J. ; SIOW, Z. R. ; SMYTH, G. K. ; TAYLOR, L. ; TRAVERS, A. ; YEO, B. ; YEUNG, M. M. ; ZIVANOVIC BUJAK, A. ; DAWSON, S.-J. ; GRAY, D. H. D. ; VISVADER, J. E. ; LINDEMAN, G. J. : *A Phase Ib Dose-Escalation and Expansion Study of the BCL2 Inhibitor Venetoclax Combined with Tamoxifen in ER and BCL2-Positive Metastatic Breast Cancer.* In: *Cancer Discovery* 9 (2019), S. 354–369
- [583] LISTON, P. ; FONG, W. G. ; KELLY, N. L. ; TOJI, S. ; MIYAZAKI, T. ; CONTE, D. ; TAMAI, K. ; CRAIG, C. G. ; MCBURNEY, M. W. ; KORNELUK, R. G. : *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.* In: *Nature Cell Biology* 3 (2001), S. 128–133
- [584] FONG, W. G. ; LISTON, P. ; RAJCAN-SEPAROVIC, E. ; ST JEAN, M. ; CRAIG, C. ; KORNELUK, R. G. : *Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines.* In: *Genomics* 70 (2000), S. 113–122
- [585] PLENCHETTE, S. ; CHEUNG, H. H. ; FONG, W. G. ; LACASSE, E. C. ; KORNELUK, R. G. : *The role of XAF1 in cancer.* In: *Current Opinion in Investigational Drugs* 8 (2007), S. 469–476
- [586] LEE, M.-G. ; HUH, J.-S. ; CHUNG, S.-K. ; LEE, J.-H. ; BYUN, D.-S. ; RYU, B.-K. ; KANG, M.-J. ; CHAE, K.-S. ; LEE, S.-J. ; LEE, C.-H. ; KIM, J. I. ; CHANG, S.-G. ; CHI, S.-G. : *Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses.* In: *Oncogene* 25 (2006), S. 5807–5822
- [587] ZHANG, W. ; GUO, Z. ; JIANG, B. ; NIU, L. ; XIA, G. ; WANG, X. ; CHENG, T. ; ZHANG, Y. ; WANG, J. : *Identification of a functional p53 responsive element within the promoter of XAF1 gene in gastrointestinal cancer cells.* In: *International Journal of Oncology* 36 (2010), S. 1031–1037
- [588] ZOU, B. ; CHIM, C. S. ; PANG, R. ; ZENG, H. ; DAI, Y. ; ZHANG, R. ; LAM, C. S. C. ; TAN, V. P. Y. ; HUNG, I. F. N. ; LAN, H. Y. ; WONG, B. C. Y. : *XIAP-associated factor 1 (XAF1), a novel target of p53, enhances p53-mediated apoptosis via post-translational modification.* In: *Molecular Carcinogenesis* 51 (2012), S. 422–432
- [589] LEE, M.-G. ; HAN, J. ; JEONG, S.-I. ; HER, N.-G. ; LEE, J.-H. ; HA, T.-K. ; KANG, M.-J. ; RYU, B.-K. ; CHI, S.-G. : *XAF1 directs apoptotic switch of p53 signaling through activation of HIPK2 and ZNF313.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2014), S. 15532–15537
- [590] WANG, J. ; HE, H. ; YU, L. ; XIA, H. H.-X. ; LIN, M. C. M. ; GU, Qi. ; LI, M. ; ZOU, B. ; AN, X. ; JIANG, B. ; KUNG, H.-F. ; WONG, B. C. Y. : *HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation.* In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), S. 2451–2459

- [591] LEAMAN, D. W. ; CHAWLA-SARKAR, M. ; VYAS, K. ; REHEMAN, M. ; TAMAI, K. ; TOJI, S. ; BORDEN, E. C. : *Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 28504–28511
- [592] STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L. ; VISINTIN, I. P. ; KARASSINA, N. ; LOS, G. ; LISTON, P. ; HALABAN, R. ; FADIEL, A. ; MOR, G. : *XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), S. 13059–13072
- [593] YU, L. F. ; WANG, J. ; ZOU, B. ; LIN, M. C. M. ; WU, Y. L. ; XIA, H. H. X. ; SUN, Y. W. ; GU, Q. ; HE, H. ; LAM, S. K. ; KUNG, H. F. ; WONG, B. C. Y. : *XAF1 mediates apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase pathway in colon cancer*. In: *Cancer* 109 (2007), S. 1996–2003
- [594] QI, R. ; GU, J. ; ZHANG, Z. ; YANG, K. ; LI, B. ; FAN, J. ; WANG, C. ; HE, Z. ; QIAO, L. ; LIN, Z. ; LIU, X. Y. : *Potent antitumor efficacy of XAF1 delivered by conditionally replicative adenovirus vector via caspase-independent apoptosis*. In: *Cancer Gene Therapy* 14 (2007), S. 82–90
- [595] JU, W.-C. ; HUANG, G.-B. ; LUO, X.-Y. ; REN, W.-H. ; ZHENG, D.-Q. ; CHEN, P.-J. ; LOU, Y.-F. ; LI, B. : *X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1 (XAF1) enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin*. In: *Medical Oncology* 31 (2014), Art.-Nr. 273
- [596] MA, B. ; WANG, Y. ; ZHOU, X. ; HUANG, P. ; ZHANG, R. ; LIU, T. ; CUI, C. ; LIU, X. ; WANG, Y. : *Synergistic suppression effect on tumor growth of hepatocellular carcinoma by combining oncolytic adenovirus carrying XAF1 with cisplatin*. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 141 (2015), S. 419–429
- [597] ZHAO, W.-J. ; DENG, B.-Y. ; WANG, X.-M. ; MIAO, Y. ; WANG, J.-N. : *XIAP associated factor 1 (XAF1) represses expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and regulates invasion, cell cycle, apoptosis, and cisplatin sensitivity of ovarian carcinoma cells*. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16 (2015), S. 2453–2458
- [598] WANG, Y.-X. ; MAO, H.-L. ; HAO, Q.-Z. ; WANG, Y. ; YANG, Y.-M. ; SHEN, L. ; HUANG, S.-Y. ; LIU, P.-S. : *Association of expression of XIAP-associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer*. In: *Regulatory Peptides* 178 (2012), S. 36–42
- [599] STRAVOPODIS, D. J. ; KARKOULIS, P. K. ; KONSTANTAKOU, E. G. ; MELACHROINOY, S. ; LAMPIDONIS, A. D. ; ANASTASIOU, D. ; KACHRILAS, S. ; MESSINI-NIKOLAKI, N. ; PAPASSIDERI, I. S. ; ARAVANTINOS, G. ; MARGARITIS, L. H. ; VOUTSINAS, G. E. : *Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines*. In: *International Journal of Oncology* 34 (2009), S. 137–160
- [600] PINHO, M. B. ; COSTAS, F. ; SELLOS, J. ; DIENSTMANN, R. ; ANDRADE, P. B. ; HERCHENHORN, D. ; PEIXOTO, F. A. ; SANTOS, V. O. ; SMALL, I. A. ; GUIMARÃES, D. P. ; FERREIRA, C. G. : *XAF1 mRNA expression improves progression-free and overall survival for patients with advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy*. In: *Urologic Oncology* 27 (2009), S. 382–390
- [601] MARTÍNEZ-GARCÍA, D. ; MANERO-RUPÉREZ, N. ; QUESADA, R. ; KORRODI-GREGÓRIO, L. ; SOTO-CERRATO, V. : *Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer*. In: *Medicinal Research Reviews* 39 (2019), S. 887–909

- [602] ZAFFARONI, N. ; DAIDONE, M. G. : *Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions*. In: *Drug Resistance Updates* 5 (2002), S. 65–72
- [603] WHEATLEY, S. P. ; ALTIERI, D. C. : *Survivin at a glance*. In: *Journal of Cell Science* 132 (2019), Art.-Nr. 223826
- [604] JAISWAL, P. K. ; GOEL, A. ; MITTAL, R. D. : *Survivin: A molecular biomarker in cancer*. In: *The Indian Journal of Medical Research* 141 (2015), S. 389–397
- [605] WARRIER, N. M. ; AGARWAL, P. ; KUMAR, P. : *Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics*. In: *Stem Cell Reviews and Reports* 16 (2020), S. 828–852
- [606] SIDDHARTH, S. ; DAS, S. ; NAYAK, A. ; KUNDU, C. N. : *SURVIVIN as a marker for quiescent-breast cancer stem cells - An intermediate, adherent, pre-requisite phase of breast cancer metastasis*. In: *Clinical & Experimental Metastasis* 33 (2016), S. 661–675
- [607] BOIDOT, R. ; VÉGRAN, F. ; LIZARD-NACOL, S. : *Transcriptional regulation of the survivin gene*. In: *Molecular Biology Reports* 41 (2014), S. 233–240
- [608] GARG, H. ; SURI, P. ; GUPTA, J. C. ; TALWAR, G. P. ; DUBEY, S. : *Survivin: a unique target for tumor therapy*. In: *Cancer Cell International* 16 (2016), Art.-Nr. 49
- [609] LI, F. ; ALJAHDALI, I. ; LING, X. : *Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study?* In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (2019), Art.-Nr. 368
- [610] KELLY, R. J. ; THOMAS, A. ; RAJAN, A. ; CHUN, G. ; LOPEZ-CHAVEZ, A. ; SZABO, E. ; SPENCER, S. ; CARTER, C. A. ; GUHA, U. ; KHOZIN, S. ; POONDRU, S. ; VAN SANT, C. ; KEATING, A. ; STEINBERG, S. M. ; FIGG, W. ; GIACCONE, G. : *A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. In: *Annals of Oncology* 24 (2013), S. 2601–2606
- [611] IKEGUCHI, M. ; LIU, J. ; KAIBARA, N. : *Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment*. In: *Apoptosis* 7 (2002), S. 23–29
- [612] CHEN, L. ; LIANG, L. ; YAN, X. ; LIU, N. ; GONG, L. ; PAN, S. ; LIN, F. ; ZHANG, Q. ; ZHAO, H. ; ZHENG, F. : *Survivin status affects prognosis and chemosensitivity in epithelial ovarian cancer*. In: *International Journal of Gynecological Cancer* 23 (2013), S. 256–263
- [613] NOMURA, T. ; YAMASAKI, M. ; NOMURA, Y. ; MIMATA, H. : *Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells*. In: *Oncology Reports* 14 (2005), S. 993–997
- [614] DONG, H. ; LIU, G. ; JIANG, B. ; GUO, J. ; TAO, G. ; YIU, W. ; ZHOU, J. ; LI, G. : *Overexpression of the Survivin gene in SGC7901 cell resistance to cisplatin*. In: *Oncology Letters* 8 (2014), S. 1953–1956
- [615] KHAN, Z. ; KHAN, A. A. ; PRASAD, G. B. K. S. ; KHAN, N. ; TIWARI, R. P. ; BISEN, P. S. : *Growth inhibition and chemo-radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by survivin-siRNA lentivirus*. In: *Radiotherapy and Oncology* 118 (2016), S. 359–368

- [616] XU, J.-H. ; WANG, A.-X. ; HUANG, H.-Z. ; WANG, J.-G. ; PAN, C.-B. ; ZHANG, B. : *Survivin shRNA induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue*. In: *Oncology Research* 18 (2010), S. 377–385
- [617] YANG, H. ; FU, J-H ; HU, Y. ; HUANG, W-Z ; ZHENG, B. ; WANG, G. ; ZHANG, X. ; WEN, J.: *Influence of siRNA targeting survivin on chemosensitivity of H460/cDDP lung cancer cells*. In: *The Journal of international medical research* 36 (2008), Nr. 4, S. 734–747
- [618] LIU, J. ; WANG, Y. ; JIANG, J. ; KONG, R. ; YANG, Y. ; JI, H. ; SHI, Y. : *Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug-resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA*. In: *Chinese Medical Journal* 123 (2010), S. 2901–2907
- [619] LIU, W. ; ZHU, F. ; JIANG, Y. ; SUN, D. ; YANG, B. ; YAN, H. : *siRNA targeting survivin inhibits the growth and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells*. In: *Oncology Reports* 29 (2013), S. 1183–1188
- [620] TIRRO, E. ; CONSOLI, M. L. ; MASSIMINO, M. ; MANZELLA, L. ; FRASCA, F. ; SCIACCA, L. ; VICARI, L. ; STASSI, G. ; MESSINA, L. ; MESSINA, A. ; VIGNERI, P. : *Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells*. In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 4263–4272
- [621] YU, M. ; XU, B. ; YANG, H. ; XUE, S. ; ZHANG, R. ; ZHANG, H. ; YING, X. ; DAI, Z. : *MicroRNA-218 regulates the chemo-sensitivity of cervical cancer cells through targeting survivin*. In: *Cancer Management and Research* 11 (2019), S. 6511–6519
- [622] JIANG, L. ; LUO, R.-Y. ; YANG, J. ; CHENG, Y.-X. : *Knockdown of survivin contributes to antitumor activity in cisplatin-resistant ovarian cancer cells*. In: *Molecular Medicine Reports* 7 (2013), S. 425–430
- [623] JINGJING, L. ; WANGYUE, W. ; QIAOQIAO, X. ; JIETONG, Y. : *MiR-218 increases sensitivity to cisplatin in esophageal cancer cells via targeting survivin expression*. In: *Open Medicine* 11 (2016), S. 31–35
- [624] ZOU, J. ; GAN, M. ; MAO, N. ; ZHU, X. ; SHI, Q. ; YANG, H. : *Sensitization of osteosarcoma cell line SaOS-2 to chemotherapy by downregulating survivin*. In: *Archives of Medical Research* 41 (2010), S. 162–169
- [625] GAO, J.-Z. ; CHEN, F.-H. ; WANG, L. ; WEI, H. ; MENG, S.-L. : *YM155 inhibits tumor growth and enhances chemosensitivity to cisplatin in osteosarcoma*. In: *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (2015), S. 2062–2069
- [626] MIR, R. ; STANZANI, E. ; MARTINEZ-SOLER, F. ; VILLANUEVA, A. ; VIDAL, A. ; CONDOM, E. ; PONCE, J. ; GIL, J. ; TORTOSA, A. ; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P. : *YM155 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin inducing apoptosis and tumor regression*. In: *Gynecologic Oncology* 132 (2014), S. 211–220
- [627] YU, Y. ; ZHAO, X. ; ZHANG, Y. ; KANG, Y. ; WANG, J. ; LIU, Y. : *Antitumor activity of YM155, a selective survivin suppressant, in combination with cisplatin in hepatoblastoma*. In: *Oncology Reports* 34 (2015), S. 407–414
- [628] KUMAR, B. ; YADAV, A. ; LANG, J. C. ; CIPOLLA, M. J. ; SCHMITT, A. C. ; ARRADAZA, N. ; TEKNOS, T. N. ; KUMAR, P. : *YM155 reverses cisplatin resistance in head and neck cancer by decreasing cytoplasmic survivin levels*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (2012), S. 1988–1998

- [629] LAU, C. K. ; YANG, Z. F. ; LAM, S. P. ; LAM, C. T. ; NGAI, P. ; TAM, K. H. ; POON, R. T.-P. ; FAN, S. T. : *Inhibition of Stat3 activity by YC-1 enhances chemo-sensitivity in hepatocellular carcinoma*. In: *Cancer Biology & Therapy* 6 (2007), S. 1900–1907
- [630] BANERJEE, K. ; RESAT, H. : *Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review*. In: *International Journal of Cancer* 138 (2016), S. 2570–2578
- [631] SANOMACHI, T. ; SUZUKI, S. ; KURAMOTO, K. ; TAKEDA, H. ; SAKAKI, H. ; TOGASHI, K. ; SEINO, S. ; YOSHIOKA, T. ; OKADA, M. ; KITANAKA, C. : *Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents*. In: *Anticancer Research* 37 (2017), S. 6177–6188
- [632] ZHAO, W. ; BAO, P. ; QI, H. ; YOU, H. : *Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells*. In: *Oncology Reports* 23 (2010), S. 279–286
- [633] AKHTAR, M. ; GALLAGHER, L. ; ROHAN, S. : *Survivin: role in diagnosis, prognosis, and treatment of bladder cancer*. In: *Advances in Anatomic Pathology* 13 (2006), S. 122–126
- [634] LIANG, Z. ; XIN, R. ; YU, Y. ; WANG, R. ; WANG, C. ; LIU, X. : *Diagnostic value of urinary survivin as a biomarker for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of published studies*. In: *World Journal of Urology* 36 (2018), S. 1373–1381
- [635] FU, L. ; ZHANG, J. ; LI, L. ; YANG, Y. ; YUAN, Y. : *Diagnostic accuracy of urinary survivin mRNA expression detected by RT-PCR compared with urine cytology in the detection of bladder cancer: A meta-analysis of diagnostic test accuracy in head-to-head studies*. In: *Oncology Letters* 19 (2020), S. 1165–1174
- [636] JEON, C. ; KIM, M. ; KWAK, C. ; KIM, H. H. ; KU, J. H. : *Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis*. In: *PLoS One* 8 (2013), Art.-Nr. e76719
- [637] KRAFFT, U. ; TSCHIRDEWAHN, S. ; HESS, J. ; HARKE, N. N. ; HADASCHIK, B. ; OLAH, C. ; KREGES, S. ; NYIRÁDY, P. ; SZENDRŐI, A. ; SZÜCS, M. ; MÓDOS, O. ; SZÉKELY, E. ; REIS, H. ; SZARVAS, T. : *Validation of survivin and HMGA2 as biomarkers for cisplatin resistance in bladder cancer*. In: *Urologic Oncology* 37 (2019), S. 810.e7–810.e15
- [638] GOU, X. ; YANG, H.-A. ; HE, W.-Y. ; XIOA, M.-C. ; WANG, M. : *Gene silence-induced downregulation of survivin inhibits bladder cancer cells*. In: *Oncology Research* 19 (2011), S. 535–541
- [639] ZHANG, B. ; LU, Z. ; HOU, Y. ; HU, J. ; WANG, C. : *The effects of STAT3 and Survivin silencing on the growth of human bladder carcinoma cells*. In: *Tumour Biology* 35 (2014), S. 5401–5407
- [640] KU, J. H. ; SEO, S. Y. ; KWAK, C. ; KIM, H. H. : *Cytotoxicity and apoptosis by survivin small interfering RNA in bladder cancer cells*. In: *BJU International* 106 (2010), S. 1812–1816
- [641] ZHANG, X. ; ZHANG, Y. ; LIU, X. ; FANG, A. ; LI, P. ; LI, Z. ; LIU, T. ; YANG, Y. M. ; DU, L. ; WANG, C. : *MicroRNA-203 Is a Prognostic Indicator in Bladder Cancer and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin via Apoptosis by Targeting Bcl-w and Survivin*. In: *PLoS One* 10 (2015), Art.-Nr. e0143441
- [642] KUNZE, D. ; ERDMANN, K. ; FROEHNER, M. ; WIRTH, M. P. ; FUESSEL, S. : *Enhanced inhibition of bladder cancer cell growth by simultaneous knockdown of antiapoptotic Bcl-xL and survivin in*

- combination with chemotherapy*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2013), S. 12297–12312
- [643] SKOWRON, M. A. ; MELNIKOVA, M. ; VAN ROERMUND, J. G. H. ; ROMANO, A. ; ALBERS, P. ; THOMALE, J. ; SCHULZ, W. A. ; NIEGISCHE, G. ; HOFFMANN, M. J. : *Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018), Art.-Nr. 590
- [644] FANG, D. ; MALDONADO, E. N. : *VDAC Regulation: A Mitochondrial Target to Stop Cell Proliferation*. In: *Advances in Cancer Research* 138 (2018), S. 41–69
- [645] GONÇALVES, R. P. ; BUZHYSNSKY, N. ; SCHEURING, S. : *Mini review on the structure and supramolecular assembly of VDAC*. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (2008), S. 133–138
- [646] MAZURE, N. M. : *VDAC in cancer*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1858 (2017), S. 665–673
- [647] ABU-HAMAD, S. ; ZAID, H. ; ISRAELSON, A. ; NAHON, E. ; SHOSHAN-BARMATZ, V. : *Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), S. 13482–13490
- [648] AZOULAY-ZOHAR, H. ; ISRAELSON, A. ; ABU-HAMAD, S. ; SHOSHAN-BARMATZ, V. : *In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death*. In: *The Biochemical Journal* 377 (2004), S. 347–355
- [649] KRASNOV, G. S. ; DMITRIEV, A. A. ; LAKUNINA, V. A. ; KIRPIY, A. A. ; KUDRYAVTSEVA, A. V. : *Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy*. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17 (2013), S. 1221–1233
- [650] ANGIOLI, R. ; JANICEK, M. ; SEVIN, B. ; ESTAPE, R. ; AVERETTE, H. ; KOECHLI, O. ; UNTCH, M. ; PENALVER, M. : *Use of lonidamine to potentiate the effect of cisplatin and carboplatin on platinum resistant human ovarian cancer cells*. In: *International Journal of Oncology* 11 (1997), S. 777–780
- [651] WINTZELL, M. ; LÖFSTEDT, L. ; JOHANSSON, J. ; PEDERSEN, A. B. ; FUXE, J. ; SHOSHAN, M. : *Repeated cisplatin treatment can lead to a multiresistant tumor cell population with stem cell features and sensitivity to 3-bromopyruvate*. In: *Cancer Biology & Therapy* 13 (2012), S. 1454–1462
- [652] YANG, Z. ; SCHUMAKER, L. M. ; EGORIN, M. J. ; ZUHOWSKI, E. G. ; GUO, Z. ; CULLEN, K. J. : *Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis*. In: *Clinical Cancer Research* 12 (2006), S. 5817–5825
- [653] SHARAF EL DEIN, O. ; GALLERNE, C. ; BRENNER, C. ; LEMAIRE, C. : *Increased expression of VDAC1 sensitizes carcinoma cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agents*. In: *Biochemical Pharmacology* 83 (2012), S. 1172–1182
- [654] CASTAGNA, A. ; ANTONIOLI, P. ; ASTNER, H. ; HAMDAN, M. ; RIGHETTI, S. C. ; PEREGO, P. ; ZUNINO, F. ; RIGHETTI, P. G. : *A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431*. In: *Proteomics* 4 (2004), S. 3246–3267

- [655] MIURA, N. ; TAKEMORI, N. ; KIKUGAWA, T. ; TANJI, N. ; HIGASHIYAMA, S. ; YOKOYAMA, M. : *Adseverin: a novel cisplatin-resistant marker in the human bladder cancer cell line HT1376 identified by quantitative proteomic analysis*. In: *Molecular Oncology* 6 (2012), S. 311–322
- [656] MŁYNARCZUK-BIAŁY, I. ; ROECKMANN, H. ; KUCKELKORN, U. ; SCHMIDT, B. ; UMBREEN, S. ; GOŁAB, J. ; LUDWIG, A. ; MONTAG, C. ; WIEBUSCH, L. ; HAGEMEIER, C. ; SCHADENDORF, D. ; KLOETZEL, P.-M. ; SEIFERT, U. : *Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells*. In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 7598–7605
- [657] MORETTI, D. ; DEL BELLO, B. ; ALLAVENA, G. ; MAELLARO, E. : *Calpains and cancer: friends or enemies?* In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 564 (2014), S. 26–36
- [658] HOSFIELD, C. M. ; ELCE, J. S. ; DAVIES, P. L. ; JIA, Z. : *Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation*. In: *The EMBO Journal* 18 (1999), S. 6880–6889
- [659] BRECKENRIDGE, D. G. ; GERMAIN, M. ; MATHAI, J. P. ; NGUYEN, M. ; SHORE, G. C. : *Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways*. In: *Oncogene* 22 (2003), S. 8608–8618
- [660] LELOUP, L. ; SHAO, H. ; BAE, Y. H. ; DEASY, B. ; STOLZ, D. ; ROY, P. ; WELLS, A. : *m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2010), S. 33549–33566
- [661] TAN, Y. ; DOURDIN, N. ; WU, C. ; DE VEYRA, T. ; ELCE, J. S. ; GREER, P. A. : *Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), S. 16016–16024
- [662] GAFNI, J. ; CONG, X. ; CHEN, S. F. ; GIBSON, B. W. ; ELLERBY, L. M. : *Calpain-1 cleaves and activates caspase-7*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), S. 25441–25449
- [663] KOBAYASHI, S. ; YAMASHITA, K. ; TAKEOKA, T. ; OHTSUKI, T. ; SUZUKI, Y. ; TAKAHASHI, R. ; YAMAMOTO, K. ; KAUFMANN, S. H. ; UCHIYAMA, T. ; SASADA, M. ; TAKAHASHI, A. : *Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 33968–33977
- [664] WANG, K. K. ; POSMANTUR, R. ; NADIMPALLI, R. ; NATH, R. ; MOHAN, P. ; NIXON, R. A. ; TALANIAN, R. V. ; KEEGAN, M. ; HERZOG, L. ; ALLEN, H. : *Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis*. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 356 (1998), S. 187–196
- [665] WOOD, D. E. ; THOMAS, A. ; DEVI, L. A. ; BERMAN, Y. ; BEAVIS, R. C. ; REED, J. C. ; NEWCOMB, E. W. : *Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis*. In: *Oncogene* 17 (1998), S. 1069–1078
- [666] PANARETAKIS, T. ; POKROVSKAJA, K. ; SHOSHAN, M. C. ; GRANDÉR, D. : *Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 44317–44326
- [667] LIU, L. ; XING, D. ; CHEN, W. R. : *Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis*. In: *International Journal of Cancer* 125 (2009), S. 2757–2766

- [668] WOO, M. G. ; XUE, K. ; LIU, J. ; MCBRIDE, H. ; TSANG, B. K. : *Calpain-mediated processing of p53-associated parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells by promoting p53 subcellular trafficking*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2012), S. 3963–3975
- [669] HILL, J. W. ; HU, J. J. ; EVANS, M. K. : *OGG1 is degraded by calpain following oxidative stress and cisplatin exposure*. In: *DNA Repair* 7 (2008), S. 648–654
- [670] AL-BAHLANI, S. M. ; AL-BULUSHI, K. H. ; AL-ALAWI, Z. M. ; AL-ABRI, N. Y. ; AL-HADIDI, Z. R. ; AL-RAWAHI, S. S. : *Cisplatin Induces Apoptosis Through the Endoplasmic Reticulum-mediated, Calpain 1 Pathway in Triple-negative Breast Cancer Cells*. In: *Clinical Breast Cancer* 17 (2017), S. e103-e112
- [671] ZHANG, Y. ; XU, W. ; NI, P. ; LI, A. ; ZHOU, J. ; XU, S. : *MiR-99a and MiR-491 Regulate Cisplatin Resistance in Human Gastric Cancer Cells by Targeting CAPNS1*. In: *International Journal of Biological Sciences* 12 (2016), S. 1437–1447
- [672] RIOS-DORIA, J. ; DAY, K. C. ; KUEFER, R. ; RASHID, M. G. ; CHINNAIYAN, A. M. ; RUBIN, M. A. ; DAY, M. L. : *The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 1372–1379
- [673] HAN, Y. ; WEINMAN, S. ; BOLDOGH, I. ; WALKER, R. K. ; BRASIER, A. R. : *Tumor Necrosis Factor- α -inducible I κ B α Proteolysis Mediated by Cytosolic m-Calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for Nuclear Factor- κ B activation*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), S. 787–794
- [674] CONACCI-SORRELL, M. ; NGOUENET, C. ; ANDERSON, S. ; BRABLETZ, T. ; EISENMAN, R. N. : *Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival*. In: *Genes & Development* 28 (2014), S. 689–707
- [675] JANSON, V. ; JOHANSSON, A. ; GRANKVIST, K. : *Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance*. In: *Cell Death & Disease* 1 (2010), Art.-Nr. e78
- [676] CHEE, J. L. Y. ; SAIDIN, S. ; LANE, D. P. ; LEONG, S. M. ; NOLL, J. E. ; NEILSEN, P. M. ; PHUA, Y. T. ; GABRA, H. ; LIM, T. M. : *Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9*. In: *Cell Cycle* 12 (2013), S. 278–288
- [677] KUWAHARA, D. ; TSUTSUMI, K. ; OYAKE, D. ; OHTA, T. ; NISHIKAWA, H. ; KOIZUKA, I. : *Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells*. In: *Auris Nasus Larynx* 30 (2003), Supplement, S. 85-88
- [678] MUELLER, T. ; VOIGT, W. ; SIMON, H. ; FRUEHAUF, A. ; BULANKIN, A. ; GROTHEY, A. ; SCHMOLL, H.-J. : *Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer*. In: *Cancer Research* 63 (2003), S. 513–521
- [679] LIU, J. ; UEMATSU, H. ; TSUCHIDA, N. ; IKEDA, M.-A. : *Association of caspase-8 mutation with chemoresistance to cisplatin in HOC313 head and neck squamous cell carcinoma cells*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (2009), S. 989–994
- [680] TOYOZUMI, Y. ; ARIMA, N. ; IZUMARU, S. ; KATO, S. ; MORIMATSU, M. ; NAKASHIMA, T. : *Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human*

- laryngeal squamous cell carcinoma, HEP-2 cells.* In: *International Journal of Oncology* 25 (2004), S. 721–728
- [681] YANG, C. ; KAUSHAL, V. ; HAUN, R. S. ; SETH, R. ; SHAH, S. V. ; KAUSHAL, G. P. : *Transcriptional activation of caspase-6 and -7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity.* In: *Cell Death and Differentiation* 15 (2008), S. 530–544
- [682] CETINTAS, V. B. ; KUCUKASLAN, A. S. ; KOSOVA, B. ; TETIK, A. ; SELVI, N. ; COK, G. ; GUNDUZ, C. ; EROGLU, Z. : *Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines.* In: *Cell Biology International* 36 (2012), S. 261–265
- [683] YANG, X. ; ZHENG, F. ; XING, H. ; GAO, Q. ; WEI, W. ; LU, Y. ; WANG, S. ; ZHOU, J. ; HU, W. ; MA, D. : *Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer.* In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 130 (2004), S. 423–428
- [684] ISHIDA, S. ; LEE, J. ; THIELE, D. J. ; HERSKOWITZ, I. : *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals.* In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), S. 14298–14302
- [685] MORE, S. S. ; AKIL, O. ; IANCULESCU, A. G. ; GEIER, E. G. ; LUSTIG, L. R. ; GIACOMINI, K. M. : *Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity.* In: *The Journal of Neuroscience* 30 (2010), S. 9500–9509
- [686] HOLZER, A. K. ; HOWELL, S. B. : *The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure.* In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 10944–10952
- [687] IVY, K. D. ; KAPLAN, J. H. : *A re-evaluation of the role of hCTR1, the human high-affinity copper transporter, in platinum-drug entry into human cells.* In: *Molecular Pharmacology* 83 (2013), S. 1237–1246
- [688] BOMPIANI, K. M. ; TSAI, C.-Y. ; ACHATZ, F. P. ; LIEBIG, J. K. ; HOWELL, S. B. : *Copper transporters and chaperones CTR1, CTR2, ATOX1, and CCS as determinants of cisplatin sensitivity.* In: *Metallomics* 8 (2016), S. 951–962
- [689] KIM, E. S. ; TANG, X. M. ; PETERSON, D. R. ; KILARI, D. ; CHOW, C.-W. ; FUJIMOTO, J. ; KALHOR, N. ; SWISHER, S. G. ; STEWART, D. J. ; WISTUBA, I. I. ; SIDDIK, Z. H. : *Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer.* In: *Lung Cancer* 85 (2014), S. 88–93
- [690] KILARI, D. ; ICZKOWSKI, K. A. ; PANDYA, C. ; ROBIN, A. J. ; MESSING, E. M. ; GUANCIAL, E. ; KIM, E. S. : *Copper Transporter-CTR1 Expression and Pathological Outcomes in Platinum-treated Muscle-invasive Bladder Cancer Patients.* In: *Anticancer Research* 36 (2016), S. 495–502
- [691] SIDDIK, Z. H. : *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.* In: *Oncogene* 22 (2003), S. 7265–7279
- [692] SAMIMI, G. ; SAFAEI, R. ; KATANO, K. ; ROCHDI, M. ; GOODMAN, M. ; HOLZER, A. K. ; TOMIOKA, M. ; HOWELL, S. B. : *Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells.* In: *Clinical Cancer Research* 10 (2004), S. 4661–4669

- [693] ZHU, S. ; SHANBHAG, V. ; WANG, Y. ; LEE, J. ; PETRIS, M. : *A Role for The ATP7A Copper Transporter in Tumorigenesis and Cisplatin Resistance*. In: *Journal of Cancer* 8 (2017), S. 1952–1958
- [694] CHISHOLM, C. L. ; WANG, H. ; WONG, A. H.-H.; VAZQUEZ-ORTIZ, G. ; CHEN, W. ; XU, X. ; DENG, C.-X. : *Ammonium tetrathiomolybdate treatment targets the copper transporter ATP7A and enhances sensitivity of breast cancer to cisplatin*. In: *Oncotarget* 7 (2016), S. 84439–84452
- [695] LI, Z.-H. ; ZHENG, R. ; CHEN, J.-T. ; JIA, J. ; QIU, M. : *The role of copper transporter ATP7A in platinum-resistance of esophageal squamous cell cancer (ESCC)*. In: *Journal of Cancer* 7 (2016), S. 2085–2092
- [696] YOSHIZAWA, K. ; NOZAKI, S. ; KITAHARA, H. ; OHARA, T. ; KATO, K. ; KAWASHIRI, S. ; YAMAMOTO, E. : *Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines*. In: *Oncology Reports* 18 (2007), S. 987–991
- [697] AIDA, T. ; TAKEBAYASHI, Y. ; SHIMIZU, T. ; OKAMURA, C. ; HIGASIMOTO, Ma. ; KANZAKI, A. ; NAKAYAMA, K. ; TERADA, K. ; SUGIYAMA, T. ; MIYAZAKI, K. ; ITO, K. ; TAKENOSHITA, S. ; YAEGASHI, N. : *Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a prognostic factor in human endometrial carcinoma*. In: *Gynecologic Oncology* 97 (2005), S. 41–45
- [698] NKAYAMA, K. ; TERADA, K. ; OGAWA, K. ; TAKENOSHITA, S. ; NEAMATI, N. ; KANZAKI, A. ; MUTOH, M. ; SUGIYAMA, T. ; ITOH, K. ; MIYAZAKI, K. ; TAKEBAYASHI, Y. : *Prognostic Value of the Cu-Transporting ATPase in Ovarian Carcinoma Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy*. In: *Clinical Cancer Research* 10 (2004), S. 2804–2811
- [699] BORST, P. ; EVERS, R. ; KOOL, M. ; WIJNHOLDS, J. : *A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins*. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (2000), S. 1295–1302
- [700] KOIKE, K. ; KAWABE, T. ; TANAKA, T. ; TOH, S. ; UCHIUMI, T. ; WADA, M. ; AKIYAMA, S. ; ONO, M. ; KUWANO, M. : *A Canalicular Multispecific Organic AnionTransporter (cMOAT) Antisense cDNA Enhances Drug Sensitivity in Human Hepatic Cancer Cells*. In: *Cancer Research* 57 (1997), S. 5475–5479
- [701] LIEDERT, B. ; MATERNA, V. ; SCHADENDORF, D. ; THOMALE, J. ; LAGE, H. : *Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) Is Associated with Decreased Formation of Platinum-DNA Adducts and Decreased G2-Arrest in Melanoma Cells Resistant to Cisplatin*. In: *Journal of Investigative Dermatology* 121 (2003), S. 172–176
- [702] NEYSHABURINEZHAD, N. ; HASHEMI, M. ; RAMEZANI, M. ; ARABZADEH, S. ; BEHRAVAN, J. ; KALALINIA, F. : *The effects of crocetin, extracted from saffron, in chemotherapy against the incidence of multiple drug resistance phenotype*. In: *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 21 (2018), S. 1192–1197
- [703] KORITA, P. V., WAKAI, T. ; SHIRAI, Y. ; MATSUDA, Y. ; SAKATA, J. ; TAKAMURA, M. ; YANO, M. ; SANPEI, A. ; AOYAGI, Y. ; HATAKEYAMA, K. ; AJIOKA, Y. : *Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma*. In: *Oncology Reports* 23 (2010), S. 965-972

- [704] YAMASAKI, M. ; MAKINO, T. ; MASUZAWA, T. ; KUROKAWA, Y. ; MIYATA, H. ; TAKIGUCHI, S. ; NAKAJIMA, K. ; FUJIWARA, Y. ; MATSUURA, N. ; MORI, M. ; DOKI, Y. : *Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma*. In: *British Journal of Cancer* 104 (2011), S. 707–713
- [705] TRACHOOTHAM, D. ; ALEXANDRE, J. ; HUANG, P. : *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* In: *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (2009), S. 579–591
- [706] KANSANEN, E. ; KUOSMANEN, S. M. ; LEINONEN, H. ; LEVONEN, A.-L. : *The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. In: *Redox Biology* 1 (2013), S. 45–49
- [707] TAGUCHI, K. ; MOTOHASHI, H. ; YAMAMOTO, M. : *Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. In: *Genes to Cells* 16 (2011), S. 123–140
- [708] HAYDEN, A. ; DOUGLAS, J. ; SOMMERLAD, M. ; ANDREWS, L. ; GOULD, K. ; HUSSAIN, S. ; THOMAS, G. J. ; PACKHAM, G. ; CRABB, S. J. : *The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer*. In: *Urologic Oncology* 32 (2014), S. 806–814
- [709] SKOWRON, M. A. ; NIEGISCHE, G. ; ALBRECHT, P. ; VAN KOEVERINGE, G. ; ROMANO, A. ; ALBERS, P. ; SCHULZ, W. A. ; HOFFMANN, M. J. : *Various Mechanisms Involve the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like (NRF2) to Achieve Cytoprotection in Long-Term Cisplatin-Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017), Art.-Nr. 1680
- [710] ROH, J.-L. ; KIM, E. H. ; JANG, H. ; SHIN, D. : *Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis*. In: *Redox Biology* 11 (2017), S. 254–262
- [711] HOU, X. ; BAI, X. ; GOU, X. ; ZENG, H. ; XIA, C. ; ZHUANG, W. ; CHEN, X. ; ZHAO, Z. ; HUANG, M. ; JIN, J. : *3',4',5',5',7-pentamethoxyflavone sensitizes Cisplatin-resistant A549 cells to Cisplatin by inhibition of Nrf2 pathway*. In: *Molecules and Cells* 38 (2015), S. 396–401
- [712] WU, S. ; ZHANG, T. ; DU, J. : *Ursolic acid sensitizes cisplatin-resistant HepG2/DDP cells to cisplatin via inhibiting Nrf2/ARE pathway*. In: *Drug Design, Development and Therapy* 10 (2016), S. 3471–3481
- [713] XIA, C. ; BAI, X. ; HOU, X. ; GOU, X. ; WANG, Y. ; ZENG, H. ; HUANG, M. ; JIN, J. : *Cryptotanshinone Reverses Cisplatin Resistance of Human Lung Carcinoma A549 Cells through Down-Regulating Nrf2 Pathway*. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 37 (2015), S. 816–824
- [714] LUBOS, E. ; LOSCALZO, J. ; HANDY, D. E. : *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (2011), S. 1957–1997
- [715] FLOHÉ, L. ; LOSCHEN, G. ; GÜNZLER, W. A. ; EICHELE, E. : *Glutathione Peroxidase, V. The kinetic mechanism*. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 353 (1972), S. 987–999
- [716] SADZUKA, Y. ; SHOJI, T. ; TAKINO, Y. : *Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation*. In: *Biochemical Pharmacology* 43 (1992), S. 1872–1875
- [717] CHEN, B. ; SHEN, Z. ; WU, D. ; XIE, X. ; XU, X. ; LV, L. ; DAI, H. ; CHEN, J. ; GAN, X. : *Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway*. In: *BioMed Research International* (2019), Art.-Nr. 7640547

- [718] GAN, X. ; CHEN, B. ; SHEN, Z. ; LIU, Y. ; LI, H. ; XIE, X. ; XU, X. ; LI, H. ; HUANG, Z. ; CHEN, J. : *High GPX1 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma invasion, migration, proliferation and cisplatin-resistance but can be reduced by vitamin D*. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7 (2014), S. 2530–2540
- [719] HUANG, Z. ; LIU, Y. ; HUANG, Z. ; LI, H. ; GAN, X. ; SHEN, Z. : *1,25-Dihydroxyvitamin D3 alleviates salivary adenoid cystic carcinoma progression by suppressing GPX1 expression through the NF-κB pathway*. In: *International Journal of Oncology* 48 (2016), S. 1271–1279
- [720] SCHULZ, R. ; EMMRICH, T. ; LEMMERHIRT, H. ; LEFFLER, U. ; SYDOW, K. ; HIRT, C. ; KIEFER, T. ; LINK, A. ; BEDNARSKI, P. J. : *Identification of a glutathione peroxidase inhibitor that reverses resistance to anticancer drugs in human B-cell lymphoma cell lines*. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012), S. 6712–6715
- [721] GASCHLER, M. M. ; STOCKWELL, B. R. : *Lipid peroxidation in cell death*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (2017), S. 419–425
- [722] GUO, J. ; XU, B. ; HAN, Q. ; ZHOU, H. ; XIA, Y. ; GONG, C. ; DAI, X. ; LI, Z. ; WU, G. : *Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin*. In: *Cancer Research and Treatment* 50 (2018), S. 445–460
- [723] XIN, L. ; CHE, B. ; ZHAI, B. ; LUO, Q. ; ZHANG, C. ; WANG, J. ; WANG, S. ; FAN, G. ; LIU, Z. ; FENG, J. ; ZHANG, Z. : *1,25-Dihydroxy Vitamin D3 Attenuates the Oxidative Stress-Mediated Inflammation Induced by PM_{2.5} via the p38/NF-κB/NLRP3 Pathway*. In: *Inflammation* 42 (2019), S. 702–713
- [724] BROZOVIC, A. ; AMBRIOVIĆ-RISTOV, A. ; OSMAK, M. : *The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin*. In: *Critical Reviews in Toxicology* 40 (2010), S. 347–359
- [725] KOTOH, S. ; NAITO, S. ; YOKOMIZO, A. ; KOHNO, K. ; KUWANO, M. ; KUMAZAWA, J. : *Enhanced expression of gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione S-transferase genes in cisplatin-resistant bladder cancer cells with multidrug resistance phenotype*. In: *The Journal of Urology* 157 (1997), S. 1054–1058
- [726] WHEELER, H. E. ; GAMAZON, E. R. ; STARK, A. L. ; O'DONNELL, P. H. ; GORSIC, L. K. ; HUANG, R. S. ; COX, N. J. ; DOLAN, M. E. : *Genome-wide meta-analysis identifies variants associated with platinating agent susceptibility across populations*. In: *The Pharmacogenomics Journal* 13 (2013), S. 35–43
- [727] WANG, C.-H. ; WU, H. T. ; CHENG, H. M. ; YEN, T.-J. ; LU, I.-H. ; CHANG, H. C. ; JAO, S.-C. ; SHING, T. K. M. ; LI, W.-S. : *Inhibition of glutathione S-transferase M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells*. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (2011), S. 8574–8581
- [728] CHEN, H. ; WANG, X. ; GOU, S. : *A cisplatin-based platinum(IV) prodrug containing a glutathione s-transferase inhibitor to reverse cisplatin-resistance in non-small cell lung cancer*. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 193 (2019), S. 133–142
- [729] KELLEY, S. L. ; BASU, A. ; TEICHER, B. A. ; HACKER, M. P. ; HAMER, D. H. ; LAZO, J. S. : *Overexpression of Metallothionein Confers Resistance to Anticancer Drugs*. In: *Science* 241 (1988), S. 1813–1815

- [730] BABULA, P. ; MASARIK, M. ; ADAM, V. ; ECKSCHLAGER, T. ; STIBOROVA, M. ; TRNKOVA, L. ; SKUTKOVA, H. ; PROVAZNIK, I. ; HUBALEK, J. ; KIZEK, R. : *Mammalian metallothioneins: properties and functions*. In: *Metallomics* 4 (2012), S. 739–750
- [731] DAVIS, S. R. ; COUSINS, R. J. : *Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function*. In: *The Journal of Nutrition* 130 (2000), S. 1085-1088
- [732] KNIPP, M. : *Metallothioneins and Platinum(II) Anti-Tumor Compounds*. In: *Current Medicinal Chemistry* 16 (2009), S. 522–537
- [733] SMITH, D. J. ; JAGGI, M. ; ZHANG, W. ; GALICH, A. ; DU, C. ; STERRETT, S. P. ; SMITH, L. M. ; BALAJI, K. C. : *Metallothioneins and resistance to cisplatin and radiation in prostate cancer*. In: *Urology* 67 (2006), S. 1341–1347
- [734] SIU, L. L. ; BANERJEE, D. ; KHURANA, R. J. ; PAN, X. ; PFLUEGER, R. ; TANNOCK, I. F. ; MOORE, M. J. : *The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma*. In: *Clinical Cancer Research* 4 (1998), S. 559–565
- [735] LEE, J.-H. ; CHAE, J.-W. ; KIM, J. K. ; KIM, H. J. ; CHUNG, J. Y. ; KIM, Y.-H. : *Inhibition of cisplatin-resistance by RNA interference targeting metallothionein using reducible oligo-peptoplex*. In: *Journal of Controlled Release* 215 (2015), S. 82–90
- [736] WAZA, A. A. ; HAMID, Z. ; ALI, S. ; BHAT, S. A. ; BHAT, M. A. : *A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil*. In: *Inflammation Research* 67 (2018), S. 579–588
- [737] RYTER, S. W. ; ALAM, J. ; CHOI, A. M. K. : *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. In: *Physiological Reviews* 86 (2006), S. 583–650
- [738] MAINES, M. D. ; GIBBS, P. E. M. : *30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (2005), S. 568–577
- [739] FURFARO, A. L. ; TRAVERSO, N. ; DOMENICOTTI, C. ; PIRAS, S. ; MORETTA, L. ; MARINARI, U. M. ; PRONZATO, M. A. ; NITTI, M. : *The Nrf2/HO-1 Axis in Cancer Cell Growth and Chemoresistance*. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016), Art.-Nr. 1958174
- [740] PENG, Y. ; CHEN, Y. ; CHEN, S. ; WANG, J. ; JIANG, C. ; HOU, W. ; XU, C. : *JUND-dependent up-regulation of HMOX1 is associated with cisplatin resistance in muscle-invasive bladder cancer*. In: *Journal of Biochemistry* 168 (2020), S. 73–82
- [741] CESNA, V. ; SUKOVAS, A. ; JASUKAITIENE, A. ; SILKUNIENE, G. ; PASKAUSKAS, S. ; DAMBRAUSKAS, Z. ; GULBINAS, A. : *Stimulated upregulation of HO-1 is associated with inadequate response of gastric and ovarian cancer cell lines to hyperthermia and cisplatin treatment*. In: *Oncology Letters* 18 (2019), S. 1961–1968
- [742] LV, X. ; SONG, D. ; NIU, Y. ; WANG, B. : *Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell cancer Hep-2 cells to cisplatin*. In: *Apoptosis* 21 (2016), S. 489–501
- [743] JEON, W.-K. ; HONG, H.-Y. ; SEO, W.-C. ; LIM, K.-H. ; LEE, H.-Y. ; KIM, W.-J. ; SONG, S.-Y. ; KIM, B.-C. : *Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420 (2012), S. 288–292

- [744] KIM, H.-R. ; KIM, S. ; KIM, E.-J. ; PARK, J.-H. ; YANG, S.-H. ; JEONG, E.-T. ; PARK, C. ; YOUN, M.-J. ; SO, H.-S. ; PARK, R. : *Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin*. In: *Lung Cancer* 60 (2008), S. 47–56
- [745] MERCER, S. E. ; FRIEDMAN, E. : *Mirk/Dyrk 1B : A Multifunctional Dual-Specificity Kinase Involved in Growth Arrest, Differentiation, and Cell Survival*. In: *Cell Biochemistry and Biophysics* 45 (2006), S. 303–315
- [746] DENG, X. ; EWTON, D. Z. ; FRIEDMAN, E. : *Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species*. In: *Cancer Research* 69 (2009), S. 3317–3324
- [747] ZOU, Y. ; EWTON, D. Z. ; DENG, X. ; MERCER, S. E. ; FRIEDMAN, E. : *Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), S. 27790–27798
- [748] HU, J. ; FRIEDMAN, E. : *Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells*. In: *Genes & Cancer* 1 (2010), S. 803–811
- [749] GAO, J. ; YANG, X. ; YIN, P. ; HU, W. ; LIAO, H. ; MIAO, Z. ; PAN, C. ; LI, N. : *The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer*. In: *International Journal of Oncology* 40 (2012), S. 1203–1209
- [750] GAO, J. ; ZHENG, Z. ; RAWAL, B. ; SCHELL, M. J. ; BEPLER, G. ; HAURA, E. B. : *Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells*. In: *Cancer Biology & Therapy* 8 (2009), S. 1671–1679
- [751] EWTON, D. Z. ; HU, J. ; VILENCHIK, M. ; DENG, X. ; LUK, K.-C. ; POLONSKAIA, A. ; HOFFMAN, A. F. ; ZIPF, K. ; BOYLAN, J. F. ; FRIEDMAN, E. A. : *Inactivation of mirk/dyrk1b kinase targets quiescent pancreatic cancer cells*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (2011), S. 2104–2114
- [752] BECKER, W. : *A wake-up call to quiescent cancer cells - potential use of DYRK1B inhibitors in cancer therapy*. In: *The FEBS Journal* 285 (2018), S. 1203–1211
- [753] BASELGA, J. ; SWAIN, S. M. : *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3*. In: *Nature Reviews Cancer* 9 (2009), S. 463–475
- [754] CITRI, A. ; YARDEN, Y. : *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006), S. 505–516
- [755] HEMMINGS, B. A. ; RESTUCCIA, D. F. : *PI3K-PKB/Akt pathway*. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2012), Art.-Nr. a011189
- [756] MANNING, B. D. ; TOKER, A. : *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. In: *Cell* 169 (2017), S. 381–405
- [757] MANNING, B. D. ; CANTLEY, L. C. : *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. In: *Cell* 129 (2007), S. 1261–1274
- [758] MAURER, U. ; CHARVET, C. ; WAGMAN, A. S. ; DEJARDIN, E. ; GREEN, D. R. : *Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1*. In: *Molecular Cell* 21 (2006), S. 749–760

- [759] DIEHL, J. A. ; CHENG, M. ; ROUSSEL, M. F. ; SHERR, C. J. : *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. In: *Genes & Development* 12 (1998), S. 3499–3511
- [760] GUPTA, S. ; KUMAR, M. ; CHAUDHURI, S. ; KUMAR, A. : *The non-canonical nuclear functions of key players of the PI3K-AKT-MTOR pathway*. In: *Journal of Cellular Physiology* 237 (2022), S. 3181–3204
- [761] WEBB, A. E. ; BRUNET, A. : *FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control*. In: *Trends in Biochemical Sciences* 39 (2014), S. 159–169
- [762] VAN DER VOS, K. E. ; COFFER, P. J. : *The Extending Network of FOXO Transcriptional Target Genes*. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (2011), S. 579–592
- [763] INOKI, K. ; LI, Y. ; ZHU, T. ; WU, J. ; GUAN, K.-L. : *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. In: *Nature Cell Biology* 4 (2002), S. 648–657
- [764] SAXTON, R. A. ; SABATINI, D. M. : *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. In: *Cell* 168 (2017), S. 960–976
- [765] MENON, S. ; DIBBLE, C. C. ; TALBOTT, G. ; HOXHAI, G. ; VALVEZAN, A. J. ; TAKAHASHI, H. ; CANTLEY, L. C. ; MANNING, B. D. : *Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome*. In: *Cell* 156 (2014), S. 771–785
- [766] HOWELL, J. J. ; RICOULT, S. J.H. ; BEN-SAHRA, I. ; MANNING, B. D. : *A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism*. In: *Biochemical Society Transactions* 41 (2013), S. 906–912
- [767] ZHOU, B. P. ; LIAO, Y. ; XIA, W. ; SPOHN, B. ; LEE, M.-H. ; HUNG, M.-C. : *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. In: *Nature Cell Biology* 3 (2001), S. 245–252
- [768] DAKS, A. A. ; FEDOROVA, O. A. ; SHUVALOV, O. Y. ; PARFENEV, S. E. ; BARLEV, N. A. : *The Role of ERBB2/HER2 Tyrosine Kinase Receptor in the Regulation of Cell Death*. In: *Biochemistry (Moscow)* 85 (2020), S. 1277–1287
- [769] GUTIERREZ, C. ; SCHIFF, R. : *HER2: biology, detection, and clinical implications*. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135 (2011), S. 55–62
- [770] SCHOLL, S. ; BEUZEBOC, P. ; POUILLART, P. : *Targeting HER2 in other tumor types*. In: *Annals of Oncology* 12, Supplement 1 (2001), S81-S87
- [771] OH, D.-Y. ; BANG, Y.-J. : *HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer*. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* 17 (2020), S. 33–48
- [772] CALIKUSU, Z. ; YILDIRIM, Y. ; AKCALI, Z. ; SAKALLI, H. ; BAL, N. ; UNAL, I. ; OZYILKAN, O. : *The effect of HER2 expression on cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28 (2009), Art.-Nr. 97
- [773] PIETRAS, R. J. ; FENDLY, B. M. ; CHAZIN, V. R. ; PEGRAM, M. D. ; HOWELL, S. B. ; SLAMON, D. J. : *Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells*. In: *Oncogene* 9 (1994), S. 1829–1838
- [774] HUANG, D. ; DUAN, H. ; HUANG, H. ; TONG, X. ; HAN, Y. ; RU, G. ; QU, L. ; SHOU, C. ; ZHAO, Z. : *Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition*. In: *Scientific Reports* 6 (2016), Art.-Nr. 20502

- [775] INOUE, M. ; KOGA, F. ; YOSHIDA, S. ; TAMURA, T. ; FUJII, Y. ; ITO, E. ; KIHARA, K. : *Significance of ERBB2 overexpression in therapeutic resistance and cancer-specific survival in muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiation-based selective bladder-sparing approach*. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 90 (2014), S. 303–311
- [776] OUDARD, S. ; CULINE, S. ; VANO, Y. ; GOLDWASSER, F. ; THÉODORE, C. ; NGUYEN, T. ; VOOG, E. ; BANU, E. ; VIEILLEFOND, A. ; PRIOU, F. ; DEPLANQUE, G. ; GRAVIS, G. ; RAVAUD, A. ; VANNETZEL, J. M. ; MACHIELS, J.-P. ; MURACCIOLE, X. ; PICHON, M.-F. ; BAY, J.-O. ; ELAIDI, R. ; TEGHOM, C. ; RADVANYI, F. ; BEUZEBOC, P. : *Multicentre randomised phase II trial of gemcitabine+platinum, with or without trastuzumab, in advanced or metastatic urothelial carcinoma overexpressing Her2*. In: *European Journal of Cancer* 51 (2015), S. 45–54
- [777] CHATTERJEE, S. ; BURNS, T. F. : *Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017), Art.-Nr. 1978
- [778] SEIGNEURIC, R. ; MJAHEH, H. ; GOBBO, J. ; JOLY, A.-L. ; BERTHENET, K. ; SHIRLEY, S. ; GARRIDO, C. : *Heat shock proteins as danger signals for cancer detection*. In: *Frontiers in Oncology* 1 (2011), Art.-Nr. 37
- [779] GARBUZ, D. G. : *Regulation of heat shock gene expression in response to stress*. In: *Molecular Biology* 51 (2017), S. 352–367
- [780] GOMEZ-PASTOR, R. ; BURCHFIEL, E. T. ; THIELE, D. J. : *Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (2018), S. 4–19
- [781] SANTORO, M. G. : *Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response*. In: *Biochemical Pharmacology* 59 (2000), S. 55–63
- [782] WU, J. ; LIU, T. ; RIOS, Z. ; MEI, Q. ; LIN, X. ; CAO, S. : *Heat Shock Proteins and Cancer*. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (2017), S. 226–256
- [783] SAIBIL, H. : *Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2013), S. 630–642
- [784] PRATT, W. B. ; MORISHIMA, Y. ; MURPHY, M. ; HARRELL, M. : *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (2006), S. 111–138
- [785] CALDERWOOD, S. K. ; KHALEQUE, M. A. ; SAWYER, D. B. ; CIOCCA, D. R. : *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. In: *Trends in Biochemical Sciences* 31 (2006), S. 164–172
- [786] IMAI, J. ; MARUYA, M. ; YASHIRODA, H. ; YAHARA, I. ; TANAKA, K. : *The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome*. In: *The EMBO Journal* 22 (2003), S. 3557–3567
- [787] XIAO, X. ; WANG, W. ; LI, Y. ; YANG, D. ; LI, X. ; SHEN, C. ; LIU, Y. ; KE, X. ; GUO, S. ; GUO, Z. : *HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37 (2018), Art.-Nr. 201
- [788] ABE, T. ; KONISHI, T. ; HIRANO, T. ; KASAI, H. ; SHIMIZU, K. ; KAHIMURA, M. ; HIGASHI, K. : *Possible correlation between DNA damage induced by Hydrogen peroxide and translocation of heat*

- shock 70 protin into the nucleus*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communication* 206 (1995), S. 548–555
- [789] SOTTILE, M. L. ; NADIN, S. B. : *Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview*. In: *Cell Stress and Chaperones* 23 (2018), S. 303–315
- [790] KOTOGLOU, P. ; KALAITZAKIS, A. ; VEZYRAKI, P. ; TZAVARAS, T. ; MICHALIS, L. K. ; DANTZER, F. ; JUNG, J. U. ; ANGELIDIS, C. : *Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks*. In: *Cell Stress and Chaperones* 14 (2009), S. 391–406
- [791] STANKIEWICZ, A. R. ; LACHAPPELLE, G. ; FOO, C. P. Z. ; RADICIONI, S. M. ; MOSSER, D. D. : *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), S. 38729–38739
- [792] SALEH, A. ; SRINIVASULA, S. M. ; BALKIR, L. ; ROBBINS, P. D. ; ALNEMRI, E. S. : *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. In: *Nature Cell Biology* 2 (2000), S. 476–483
- [793] SYRIGOS, K. N. ; HARRINGTON, K. J. ; KARAYIANNAKIS, A. J. ; SEKARA, E. ; CHATZIYIANNI, E. ; SYRIGOU, E. I. ; WAXMAN, J. : *Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer*. In: *Urology* 61 (2003), S. 677–680
- [794] CARDILLO, M. R. ; SALE, P. ; DI SILVERIO, F. : *Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer*. In: *Anticancer Research* 20 (2000), S. 4579–4583
- [795] VASILEVSKAYA, I. A. ; RAKITINA, T. V. ; O'DWYER, P. J. : *Quantitative Effects on c-Jun N-Terminal Protein Kinase Signaling Determine Synergistic Interaction of Cisplatin and 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Colon Cancer Cell Lines*. In: *Molecular Pharmacology* 66 (2004), S. 235–243
- [796] LIU, H. ; LU, J. ; HUA, Y. ; ZHANG, P. ; LIANG, Z. ; RUAN, L. ; LIAN, C. ; SHI, H. ; CHEN, K. ; TU, Z. : *Targeting heat-shock protein 90 with ganetespib for molecularly targeted therapy of gastric cancer*. In: *Cell Death & Disease* 6 (2015), Art.-Nr. e1595
- [797] UI, T. ; MORISHIMA, K. ; SAITO, S. ; SAKUMA, Y. ; FUJII, H. ; HOSOYA, Y. ; ISHIKAWA, S. ; ABURATANI, H. ; FUKAYAMA, M. ; NIKI, T. ; YASUDA, Y. : *The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway*. In: *Oncology Reports* 31 (2014), S. 619–624
- [798] ZHANG, Z. ; XIE, Z. ; SUN, G. ; YANG, P. ; LI, J. ; YANG, H. ; XIAO, S. ; LIU, Y. ; QIU, H. ; QIN, L. ; ZHANG, C. ; ZHANG, F. ; SHAN, B. : *Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells*. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (2015), S. 6687–6701
- [799] BAGATELL, R. ; BELIAKOFF, J. ; DAVID, C. L. ; MARRON, M. T. ; WHITESELL, L. : *Hsp90 inhibitors deplete key anti-apoptotic proteins in pediatric solid tumor cells and demonstrate synergistic anticancer activity with cisplatin*. In: *International Journal of Cancer* 113 (2005), S. 179–188
- [800] SHEVTSOV, M. ; MULTHOFF, G. ; MIKHAYLOVA, E. ; SHIBATA, A. ; GUZHOVA, I. ; MARGULIS, B. : *Combination of Anti-Cancer Drugs with Molecular Chaperone Inhibitors*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2019), Art.-Nr. 5284

- [801] KRAWCZYK, Z. ; GOGLER-PIGŁOWSKA, A. ; SOJKA, D. R. ; SCIEGLINSKA, D. : *The Role of Heat Shock Proteins in Cisplatin Resistance*. In: *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 18 (2018), S. 2093–2109
- [802] MA, L. ; SATO, F. ; SATO, R. ; MATSUBARA, T. ; HIRAI, K. ; YAMASAKI, M. ; SHIN, T. ; SHIMADA, T. ; NOMURA, T. ; MORI, K. ; SUMINO, Y. ; MIMATA, H. : *Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer*. In: *Oncology Reports* 31 (2014), S. 2482–2492
- [803] TATOKORO, M. ; KOGA, F. ; YOSHIDA, S. ; KAWAKAMI, S. ; FUJII, Y. ; NECKERS, L. ; KIHARA, K. : *Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells*. In: *International Journal of Cancer* 131 (2012), S. 987–996
- [804] YOSHIDA, S. ; KOGA, F. ; TATOKORO, M. ; KAWAKAMI, S. ; FUJII, Y. ; KUMAGAI, J. ; NECKERS, L. ; KIHARA, K. : *Low-dose Hsp90 inhibitors tumor-selectively sensitize bladder cancer cells to chemoradiotherapy*. In: *Cell Cycle* 10 (2011), S. 4291–4299
- [805] LIU, J. ; LIU, J. ; GUO, S.-Y. ; LIU, H.-L. ; LI, S.-Z. : *HSP70 inhibitor combined with cisplatin suppresses the cervical cancer proliferation in vitro and transplanted tumor growth: An experimental study*. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10 (2017), S. 184–188
- [806] SCHMITT, E. ; MAINGRET, L. ; PUIG, P.-E. ; REROLE, A.-L. ; GHIRINGHELLI, F. ; HAMMANN, A. ; SOLARY, E. ; KROEMER, G. ; GARRIDO, C. : *Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma*. In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 4191–4197
- [807] ENDO, H. ; YANO, M. ; OKUMURA, Y. ; KIDO, H. : *Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70*. In: *Cell death & disease* 5 (2014), e1027
- [808] KINNER, A. ; WU, W. ; STAUDT, C. ; ILIAKIS, G. : *Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin*. In: *Nucleic Acids Research* 36 (2008), S. 5678–5694
- [809] CLINGEN, P. H. ; WU, J. Y-H ; MILLER, J. ; MISTRY, N. ; CHIN, F. ; WYNNE, P. ; PRISE, K. M. ; HARTLEY, J. A. : *Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy*. In: *Biochemical Pharmacology* 76 (2008), S. 19–27
- [810] MOEGLIN, E. ; DESPLANCQ, D. ; CONIC, S. ; OULAD-ABDELGHANI, M. ; STOESSEL, A. ; CHIPER, M. ; VIGNERON, M. ; DIDIER, P. ; TORA, L. ; WEISS, E. : *Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress*. In: *Cancers* 11 (2019), Art.-Nr. 355
- [811] FERREIRA, J. A. ; PEIXOTO, A. ; NEVES, M. ; GAITEIRO, C. ; REIS, C. A. ; ASSARAF, Y. G. ; SANTOS, L. L. : *Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation*. In: *Drug Resistance Updates* 24 (2016), S. 34–54
- [812] BARBATO, L. ; BOCCHETTI, M. ; DI BIASE, A. ; REGAD, T. : *Cancer Stem Cells and Targeting Strategies*. In: *Cells* 8 (2019), Art.-Nr. 926
- [813] WALCHER, L. ; KISTENMACHER, A.-K. ; SUO, H. ; KITTE, R. ; DLUCZEK, S. ; STRAUß, A. ; BLAUDSZUN, A.-R. ; YEVSА, T. ; FRICKE, S. ; KOSSATZ-BOEHLERT, U. : *Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers:*

Perspectives for Targeted Personalized Therapies. In: *Frontiers in Immunology* 11 (2020), Art.-Nr. 1280

- [814] VOLKMER, J.-P. ; SAHOO, D. ; CHIN, R. K. ; HO, P. L. ; TANG, C. ; KURTOVA, A. V. ; WILLINGHAM, S. B. ; PAZHANISAMY, S. K. ; CONTRERAS-TRUJILLO, H. ; STORM, T. A. ; LOTAN, Y. ; BECK, A. H. ; CHUNG, B. I. ; ALIZADEH, A. A. ; GODOY, G. ; LERNER, S. P. ; VAN DE RIJN, M. ; SHORTLIFFE, L. D. ; WEISSMAN, I. L. ; CHAN, K. S. : *Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (2012), S. 2078–2083
- [815] ZHU, D. ; WAN, X. ; HUANG, H. ; CHEN, X. ; LIANG, W. ; ZHAO, F. ; LIN, T. ; HAN, J. ; XIE, W. : *Knockdown of Bmi1 inhibits the stemness properties and tumorigenicity of human bladder cancer stem cell-like side population cells*. In: *Oncology Reports* 31 (2014), S. 727–736
- [816] OOKI, A. ; DEL CARMEN RODRIGUEZ PENA, M. ; MARCHIONNI, L. ; DINALANKARA, W. ; BEGUM, A. ; HAHN, N. M. ; VAN DEN BUSSCHE, C. J. ; RASHEED, Z. A. ; MAO, S. ; NETTO, G. J. ; SIDRANSKY, D. ; HOQUE, M. O. : *YAP1 and COX2 Coordinately Regulate Urothelial Cancer Stem-like Cells*. In: *Cancer Research* 78 (2018), S. 168–181
- [817] CIAMPORCERO, E. ; SHEN, H. ; RAMAKRISHNAN, S. ; YU KU, S. ; CHINTALA, S. ; SHEN, L. ; ADELAIYE, R. ; MILES, K. M. ; ULLIO, C. ; PIZZIMENTI, S. ; DAGA, M. ; AZABDAFTARI, G. ; ATTWOOD, K. ; JOHNSON, C. ; ZHANG, J. ; BARRERA, G. ; PILI, R. : *YAP activation protects urothelial cell carcinoma from treatment-induced DNA damage*. In: *Oncogene* 35 (2016), S. 1541–1553
- [818] NIWA, N. ; TANAKA, N. ; HONGO, H. ; MIYAZAKI, Y. ; TAKAMATSU, K. ; MIZUNO, R. ; KIKUCHI, E. ; MIKAMI, S. ; KOSAKA, T. ; OYA, M. : *TNFAIP2 expression induces epithelial-to-mesenchymal transition and confers platinum resistance in urothelial cancer cells*. In: *Laboratory Investigation* 99 (2019), S. 1702–1713
- [819] JIANG, J. ; WANG, K. ; CHEN, Y. ; CHEN, H. ; NICE, E. C. ; HUANG, C. : *Redox regulation in tumor cell epithelial-mesenchymal transition: molecular basis and therapeutic strategy*. In: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (2017), Art.-Nr. e17036
- [820] LAMOUILLE, S. ; XU, J. ; DERYNCK, R. : *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (2014), S. 178–196
- [821] CHATTERJEE, R. ; CHATTERJEE, J. : *ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness*. In: *European Journal of Cell Biology* 99 (2020), Art.-Nr. 151073
- [822] ZHU, P. ; TONG, B. M. K. ; WANG, R. ; CHEN, J. P. ; FOO, S. ; CHONG, H. C. ; WANG, X. L. ; ANG, G. Y. ; CHIBA, S. ; TAN, N. S. : *Nox4-dependent ROS modulation by amino endoperoxides to induce apoptosis in cancer cells*. In: *Cell Death & Disease* 4 (2013), Art.-Nr. e552
- [823] PAOLI, P. ; GIANNONI, E. ; CHIARUGI, P. : *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833 (2013), S. 3481–3498
- [824] LEE, Y.-J. ; PARK, K.-S. ; HEO, S.-H. ; NAM, H.-S. ; CHO, M.-K. ; LEE, S.-H. : *Pifithrin- μ induces necroptosis through oxidative mitochondrial damage but accompanies epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon in malignant mesothelioma cells under lactic acidosis*. In: *Archives of Pharmacal Research* 42 (2019), S. 890–901

- [825] KASIOUMI, P. ; VRAZELI, P. ; VEZYRAKI, P. ; ZERIKIOTIS, S. ; KATSOURAS, C. ; DAMALAS, A. ; ANGELIDIS, C. : *Hsp70 (HSP70A1A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells*. In: *International Journal of Oncology* 54 (2019), S. 821–832
- [826] ARORA, A. ; SCHOLAR, E. M. : *Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (2005), S. 971–979
- [827] ESCUDIER, B. ; WORDEN, F. ; KUDO, M. : *Sorafenib: key lessons from over 10 years of experience*. In: *Expert Review of Anticancer Therapy* 19 (2019), S. 177–189
- [828] AHMADI, M. ; AMIRI, S. ; PECIC, S. ; MACHAJ, F. ; ROSIK, J. ; ŁOS, M. J. ; ALIZADEH, J. ; MAHDIAN, R. ; DA SILVA ROSA, S. C. ; SCHAAFSMA, D. ; SHOJAEI, S. ; MADRAKIAN, T. ; ZEKI, A. A. ; GHAVAMI, S. : *Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1866 (2020), Art.-Nr. 165968
- [829] ZHANG, D. ; PIAO, H.-L. ; LI, Y.-H. ; QIU, Q. ; LI, D.-J. ; DU, M.-R. ; TSANG, B. K. : *Inhibition of AKT sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin by abrogating S and G2/M arrest*. In: *Experimental and Molecular Pathology* 100 (2016), S. 506–513
- [830] ZHENG, H. ; SHAO, F. ; MARTIN, S. ; XU, X. ; DENG, C.-X. : *WEE1 inhibition targets cell cycle checkpoints for triple negative breast cancers to overcome cisplatin resistance*. In: *Scientific Reports* 7 (2017), Art.-Nr. 43517
- [831] THOMPSON, R. ; MEUTH, M. ; WOLL, P. ; ZHU, Y. ; DANSON, S. : *Treatment with the Chk1 inhibitor Gö6976 enhances cisplatin cytotoxicity in SCLC cells*. In: *International Journal of Oncology* 40 (2012), S. 194–202
- [832] HSU, W.-H. ; ZHAO, X. ; ZHU, J. ; KIM, I.-K. ; RAO, G. ; MCCUTCHEON, J. ; HSU, S.-T. ; TEICHER, B. ; KALLAKURY, B. ; DOWLATI, A. ; ZHANG, Y.-W. ; GIACCONE, G. : *Checkpoint Kinase 1 Inhibition Enhances Cisplatin Cytotoxicity and Overcomes Cisplatin Resistance in SCLC by Promoting Mitotic Cell Death*. In: *Journal of Thoracic Oncology* 14 (2019), S. 1032–1045
- [833] SEN, T. ; TONG, P. ; STEWART, C. A. ; CRISTEA, S. ; VALLIANI, A. ; SHAMES, D. S. ; REDWOOD, A.B. ; FAN, Y. H. ; LI, L. ; GLISSON, B. S. ; MINNA, J. D. ; SAGE, J. ; GIBBONS, D. L. ; PIWNICA-WORMS, H. ; HEYMACH, J. V. ; WANG, J. ; BYERS, L. A. : *CHK1 Inhibition in Small-Cell Lung Cancer Produces Single-Agent Activity in Biomarker-Defined Disease Subsets and Combination Activity with Cisplatin or Olaparib*. In: *Cancer Research* 77 (2017), S. 3870–3884
- [834] NAGEL, R. ; AVELAR, A. T. ; ABEN, N. ; PROOST, N. ; VAN DE VEN, M. ; VAN DER VLIET, J. ; COZIJNSEN, M. ; DE VRIES, H. ; WESSELS, L. F. A. ; BERNS, A. : *Inhibition of the Replication Stress Response Is a Synthetic Vulnerability in SCLC That Acts Synergistically in Combination with Cisplatin*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 18 (2019), S. 762–770
- [835] MENG, Y. ; CHEN, C.-W. ; YUNG, M. M. H. ; SUN, W. ; SUN, J. ; LI, Z. ; LI, J. ; LI, Z. ; ZHOU, W. ; LIU, S. S. ; CHEUNG, A. N. Y. ; NGAN, H. Y. S. ; BRAISTED, J. C. ; KAI, Y. ; PENG, W. ; TZATSOS, A. ; LI, Y. ; DAI, Z. ; ZHENG, W. ; CHAN, D. W. ; ZHU, W. : *DUOXA1-mediated ROS production promotes cisplatin resistance by activating ATR-Chk1 pathway in ovarian cancer*. In: *Cancer Letters* 428 (2018), S. 104–116
- [836] NIETO-JIMENEZ, C. ; ALCARAZ-SANABRIA, A. ; MARTINEZ-CANALES, S. ; CORRALES-SANCHEZ, V. ; MONTERO, J. C. ; BURGOS, M. ; NUNCIA-CANTARERO, M. ; PANDIELLA, A. ; GALAN-MOYA, E. M. ; OCAÑA, A. : *Checkpoint Kinase 1 Pharmacological Inhibition Synergizes with DNA-Damaging*

Agents and Overcomes Platinum Resistance in Basal-Like Breast Cancer. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020), Art.-Nr. 9034

- [837] HONG, J. ; HU, K. ; YUAN, Y. ; SANG, Y. ; BU, Q. ; CHEN, G. ; YANG, L. ; LI, B. ; HUANG, P. ; CHEN, D. ; LIANG, Y. ; ZHANG, R. ; PAN, J. ; ZENG, Y.-X. ; KANG, T. : *CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma*. In: *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2012), S. 2165–2175
- [838] DUAN, L. ; PEREZ, R. E. ; HANSEN, M. ; GITELIS, S. ; MAKI, C. G. : *Increasing cisplatin sensitivity by schedule-dependent inhibition of AKT and Chk1*. In: *Cancer Biology & Therapy* 15 (2014), S. 1600–1612
- [839] HEIDLER, C. L. ; ROTH, E. K. ; THIEMANN, M. ; BLATTMANN, C. ; PEREZ, R. L. ; HUBER, P. E. ; KOVAC, M. ; AMTHOR, B. ; NEU-YILIK, G. ; KULOZIK, A. E. : *Prexasertib (LY2606368) reduces clonogenic survival by inducing apoptosis in primary patient-derived osteosarcoma cells and synergizes with cisplatin and talazoparib*. In: *International Journal of Cancer* 147 (2020), S. 1059–1070
- [840] WANG, G. ; EDWARDS, H. ; CALDWELL, J. T. ; BUCK, S. A. ; QING, W. Y. ; TAUB, J. W. ; GE, Y. ; WANG, Z. : *Panobinostat synergistically enhances the cytotoxic effects of cisplatin, doxorubicin or etoposide on high-risk neuroblastoma cells*. In: *PLoS One* 8 (2013), Art.-Nr. e76662
- [841] KRÜGER, K. ; GEIST, K. ; STUHLREIER, F. ; SCHUMACHER, L. ; BLÜMEL, L. ; REMKE, M. ; WESSELBORG, S. ; STORK, B. ; KLÖCKER, N. ; BORMANN, S. ; ROOS, W. P. ; HONNEN, S. ; FRITZ, G. : *Multiple DNA damage-dependent and DNA damage-independent stress responses define the outcome of ATR/Chk1 targeting in medulloblastoma cells*. In: *Cancer Letters* 430 (2018), S. 34–46
- [842] FENG, Z. ; XU, S. ; LIU, M. ; ZENG, Y.-X. ; KANG, T. : *Chk1 inhibitor Gö6976 enhances the sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells to radiotherapy and chemotherapy in vitro and in vivo*. In: *Cancer Letters* 297 (2010), S. 190–197
- [843] LI, C.-C. ; YANG, J.-C. ; LU, M.-C. ; LEE, C.-L. ; PENG, C.-Y. ; HSU, W.-Y. ; DAI, Y.-H. ; CHANG, F.-R. ; ZHANG, D.-Y. ; WU, W.-J. ; WU, Y.-C. : *ATR-Chk1 signaling inhibition as a therapeutic strategy to enhance cisplatin chemosensitivity in urothelial bladder cancer*. In: *Oncotarget* 7 (2016), S. 1947–1959
- [844] YEH, B.-W. ; YU, L.-E. ; LI, C.-C. ; YANG, J.-C. ; LI, W.-M. ; WU, Y.-C. ; WEI, Y.-C. ; LEE, H.-T. ; KUNG, M.-L. ; WU, W.-J. : *The protoapigenone analog WYC0209 targets CD133+ cells: A potential adjuvant agent against cancer stem cells in urothelial cancer therapy*. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 402 (2020), Art.-Nr. 115129
- [845] ISONO, M. ; HOFFMANN, M. J. ; PINKERNEIL, M. ; SATO, A. ; MICHAELIS, M. ; CINATL, J. ; NIEGISCHE, G. ; SCHULZ, W. A. : *Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36 (2017), Art.-Nr. 1
- [846] ISONO, M. ; OKUBO, K. ; ASANO, T. ; SATO, A. : *Inhibition of checkpoint kinase 1 potentiates anticancer activity of gemcitabine in bladder cancer cells*. In: *Scientific Reports* 11 (2021), Art.-Nr. 10181
- [847] LIU, Y. ; KWIATKOWSKI, D. J. : *Combined CDKN1A/TP53 mutation in bladder cancer is a therapeutic target*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (2015), S. 174–182

- [848] MONTANO, R. ; KHAN, N. ; HOU, H. ; SEIGNE, J. ; ERNSTOFF, M. S. ; LEWIS, L. D. ; EASTMAN, A. : *Cell cycle perturbation induced by gemcitabine in human tumor cells in cell culture, xenografts and bladder cancer patients: implications for clinical trial designs combining gemcitabine with a Chk1 inhibitor*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 67754–67768
- [849] PATEL, R. ; BARKER, H. E. ; KYULA, J. ; MCLAUGHLIN, M. ; DILLON, M. T. ; SCHICK, U. ; HAFSI, H. ; THOMPSON, A. ; KHOO, V. ; HARRINGTON, K. ; ZAIDI, S. : *An orally bioavailable Chk1 inhibitor, CCT244747, sensitizes bladder and head and neck cancer cell lines to radiation*. In: *Radiotherapy and Oncology* 122 (2017), S. 470–475
- [850] GRALEWSKA, P. ; GAJEK, A. ; MARCZAK, A. ; ROGALSKA, A. : *Participation of the ATR/CHK1 pathway in replicative stress targeted therapy of high-grade ovarian cancer*. In: *Journal of Hematology & Oncology* 13 (2020), Art.-Nr. 39
- [851] DING, J. ; ZHANG, L. ; CHEN, S. ; CAO, H. ; XU, C. ; WANG, X. : *lncRNA CCAT2 Enhanced Resistance of Glioma Cells Against Chemodrugs by Disturbing the Normal Function of miR-424*. In: *OncoTargets and Therapy* 13 (2020), S. 1431–1445
- [852] POULIOT, L. M. ; CHEN, Y.-C. ; BAI, J. ; GUHA, R. ; MARTIN, S. E. ; GOTTESMAN, M. M. ; HALL, M. D. : *Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family*. In: *Cancer Research* 72 (2012), S. 5945–5955
- [853] CARRASSA, L. ; BROGGINI, M. ; ERBA, E. ; DAMIA, G. : *Chk1, but not Chk2, is Involved in the Cellular Response to DNA Damaging Agents : Differential Activity in Cells Expressing, or not, p53*. In: *Cell Cycle* 3 (2014), S. 1175–1179
- [854] CHEN, Z. ; XIAO, Z. ; GU, W.-Z. ; XUE, J. ; BUI, M. H. ; KOVAR, P. ; LI, G. ; WANG, G. ; TAO, Z.-F. ; TONG, Y. ; LIN, N.-H. ; SHAM, H. L. ; WANG, J. Y. J. ; SOWIN, T. J. ; ROSENBERG, S.H. ; ZHANG, H. : *Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics*. In: *International Journal of Cancer* 119 (2006), S. 2784–2794
- [855] GADHIKAR, M. A. ; SCIUTO, M. R. ; ALVES, M. V. O. ; PICKERING, C. R. ; OSMAN, A. A. ; NESKEY, D. M. ; ZHAO, M. ; FITZGERALD, A. L. ; MYERS, J. N. ; FREDERICK, M. J. : *Chk1/2 inhibition overcomes the cisplatin resistance of head and neck cancer cells secondary to the loss of functional p53*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (2013), S. 1860–1873
- [856] ZAHARIEVA, B. ; SIMON, R. ; RUIZ, C. ; OEGGERLI, M. ; MIHATSCH, M. J. ; GASSER, T. ; SAUTER, G. ; TONCHEVA, D. : *High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer*. In: *International Journal of Cancer* 117 (2005), S. 952–956
- [857] GORECKI, L. ; ANDRS, M. ; KORABECNY, J. : *Clinical Candidates Targeting the ATR-CHK1-WEE1 Axis in Cancer*. In: *Cancers* 13 (2021), Art.-Nr. 795
- [858] QIU, Z. ; OLEINICK, N. L. ; ZHANG, J. : *ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy*. In: *Radiotherapy and Oncology* 126 (2018), S. 450–464
- [859] SAUSVILLE, E. ; LORUSSO, P. ; CARDUCCI, M. ; CARTER, J. ; QUINN, M. F. ; MALBURG, L. ; AZAD, N. ; COSGROVE, D. ; KNIGHT, R. ; BARKER, P. ; ZABLUDOFF, S. ; AGBO, F. ; OAKES, P. ; SENDEROWICZ, A. : *Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors*. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73 (2014), S. 539–549

- [860] LIANG, M. ; ZHAO, T. ; MA, L. ; GUO, Y. : *CHK1 inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine via promoting CDK-dependent DNA damage and ribonucleotide reductase downregulation*. In: *Oncology Reports* 39 (2017), S. 1322–1330
- [861] BARNARD, D. ; DIAZ, H. B. ; BURKE, T. ; DONOHO, G. ; BECKMANN, R. ; JONES, B. ; BARDA, D. ; KING, C. ; MARSHALL, M. : *LY2603618, a selective CHK1 inhibitor, enhances the anti-tumor effect of gemcitabine in xenograft tumor models*. In: *Investigational New Drugs* 34 (2016), S. 49–60
- [862] VAN HARTEN, A. M. ; BUIJZE, M. ; VAN DER MAST, R. ; ROOIMANS, M. A. ; MARTENS-DE KEMP, S. R. ; BACHAS, C. ; BRINK, A. ; STIGTER-VAN WALSUM, M. ; WOLTHUIS, R. M. F. ; BRAKENHOFF, R. H. : *Targeting the cell cycle in head and neck cancer by Chk1 inhibition: a novel concept of bimodal cell death*. In: *Oncogenesis* 8 (2019), Art.-Nr. 38
- [863] SCAGLIOTTI, G. ; KANG, J. H. ; SMITH, D. ; ROSENBERG, R. ; PARK, K. ; KIM, S.-W. ; SU, W.-C. ; BOYD, T. E. ; RICHARDS, D. A. ; NOVELLO, S. ; HYNES, S. M. ; MYRAND, S. P. ; LIN, J. ; SMYTH, E. N. ; WIJAYAWARDANA, S. ; LIN, A. B. ; PINDER-SCHENCK, M. : *Phase II evaluation of LY2603618, a first-generation CHK1 inhibitor, in combination with pemetrexed in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer*. In: *Investigational New Drugs* 34 (2016), S. 625–635
- [864] LAQUENTE, B. ; LOPEZ-MARTIN, J. ; RICHARDS, D. ; ILLERHAUS, G. ; CHANG, D. Z. ; KIM, G. ; STELLA, P. ; RICHEL, D. ; SZCYLIK, C. ; CASCINU, S. ; FRASSINETI, G. L. ; CIULEANU, T. ; HURT, K. ; HYNES, S. ; LIN, J. ; LIN, A. B. ; VON HOFF, D. ; CALVO, E. : *A phase II study to evaluate LY2603618 in combination with gemcitabine in pancreatic cancer patients*. In: *BMC Cancer* 17 (2017), Art.-Nr. 137
- [865] WEHLER, T. ; THOMAS, M. ; SCHUMANN, C. ; BOSCH-BARRERA, J. ; VIÑOLAS SEGARRA, N. ; DICKGREBER, N. J. ; DALHOFF, K. ; SEBASTIAN, M. ; CORRAL JAIME, J. ; ALONSO, M. ; HYNES, S. M. ; LIN, J. ; HURT, K. ; LIN, A. B. ; CALVO, E. ; PAZ-ARES, L. : *A randomized, phase 2 evaluation of the CHK1 inhibitor, LY2603618, administered in combination with pemetrexed and cisplatin in patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer*. In: *Lung Cancer* 108 (2017), S. 212–216
- [866] NEIZER-ASHUN, F. ; BHATTACHARYA, R. : *Reality CHEK: Understanding the biology and clinical potential of CHK1*. In: *Cancer Letters* 497 (2021), S. 202–211
- [867] WANG, G.-Z. ; LIU, Y.-Q. ; CHENG, X. ; ZHOU, G.-B. : *Celastrol induces proteasomal degradation of FANCD2 to sensitize lung cancer cells to DNA crosslinking agents*. In: *Cancer Science* 106 (2015), S. 902–908
- [868] DAI, C.-H. ; LI, J. ; CHEN, P. ; JIANG, H.-G. ; WU, M. ; CHEN, Y.-C. : *RNA interferences targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway upstream genes reverse cisplatin resistance in drug-resistant lung cancer cells*. In: *Journal of Biomedical Science* 22 (2015), Art.-Nr. 77
- [869] FERRER, M. ; DE WINTER, J. P. ; MASTENBROEK, D. C. J. ; CURIEL, D. T. ; GERRITSEN, W. R. ; GIACCONE, G. ; KRUYT, F. A. E. : *Chemosensitizing tumor cells by targeting the Fanconi anemia pathway with an adenovirus overexpressing dominant-negative FANCA*. In: *Cancer Gene Therapy* 11 (2004), S. 539–546
- [870] CHIRNOMAS, D. ; TANIGUCHI, T. ; DE LA VEGA, M. ; VAIDYA, A. P. ; VASSERMAN, M. ; HARTMAN, A.-R. ; KENNEDY, R. ; FOSTER, R. ; MAHONEY, J. ; SEIDEN, M. V. ; D'ANDREA, A. D. : *Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (2006), S. 952–961

- [871] DUAN, W. ; GAO, L. ; ZHAO, W. ; LEON, M. ; SADEE, W. ; WEBB, A. ; RESNICK, K. ; WU, X. ; RAMASWAMY, B. ; COHN, D. E. ; SHAPIRO, C. ; ANDREASSEN, P. R. ; OTTERSON, G. A. ; VILLALONA-CALERO, M. A. : *Assessment of FANCD2 nuclear foci formation in paraffin-embedded tumors: a potential patient-enrichment strategy for treatment with DNA interstrand crosslinking agents*. In: *Translational Research* 161 (2013), S. 156–164
- [872] WU, F. ; LIN, X. ; OKUDA, T. ; HOWELL, S. B. : *DNA polymerase zeta regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance*. In: *Cancer Research* 64 (2004), S. 8029–8035
- [873] SHI, T.-Y. ; YANG, L. ; YANG, G. ; TU, X.-Y. ; WU, X. ; CHENG, X. ; WEI, Q. : *DNA polymerase ζ as a potential biomarker of chemoradiation resistance and poor prognosis for cervical cancer*. In: *Medical Oncology* 30 (2013), Art.-Nr. 500
- [874] YANG, L. ; SHI, T. ; LIU, F. ; REN, C. ; WANG, Z. ; LI, Y. ; TU, X. ; YANG, G. ; CHENG, X. : *REV3L, a promising target in regulating the chemosensitivity of cervical cancer cells*. In: *PLoS One* 10 (2015), Art.-Nr. e012033
- [875] WANG, H. ; ZHANG, S.-Y. ; WANG, S. ; LU, J. ; WU, W. ; WENG, L. ; CHEN, D. ; ZHANG, Y. ; LU, Z. ; YANG, J. ; CHEN, Y. ; ZHANG, X. ; CHEN, X. ; XI, C. ; LU, D. ; ZHAO, S. : *REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: the potential of its RNAi for synergistic therapy*. In: *Neuro-Oncology* 11 (2009), S. 790–802
- [876] DOLES, J. ; OLIVER, T. G. ; CAMERON, E. R. ; HSU, G. ; JACKS, T. ; WALKER, G. C. ; HEMANN, M. T. : *Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol{zeta}, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), S. 20786–20791
- [877] XIE, K. ; DOLES, J. ; HEMANN, M. T. ; WALKER, G. C. : *Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), S. 20792–20797
- [878] CHEN, X. ; ZHU, H. ; YE, W. ; CUI, Y. ; CHEN, M. : *MicroRNA-29a enhances cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer through the regulation of REV3L*. In: *Molecular Medicine Reports* 19 (2019), S. 831–840
- [879] WANG, J. ; GU, Q. ; LI, M. ; ZHANG, W. ; YANG, M. ; ZOU, B. ; CHAN, S. ; QIAO, L. ; JIANG, B. ; TU, S. ; MA, J. ; HUNG, I. F. ; LAN, H. Y. ; WONG, B. C. Y. : *Identification of XAF1 as a novel cell cycle regulator through modulating G(2)/M checkpoint and interaction with checkpoint kinase 1 in gastrointestinal cancer*. In: *Carcinogenesis* 30 (2009), S. 1507–1516
- [880] TU, S. P. ; LISTON, P. ; CUI, J. T. ; LIN, M. C. M. ; JIANG, X. H. ; YANG, Y. ; GU, Q. ; JIANG, S. H. ; LUM, C. T. ; KUNG, H. F. ; KORNELUK, R. G. ; WONG, B. C.-Y. : *Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer*. In: *International Journal of Cancer* 125 (2009), S. 688–697
- [881] MENDONÇA, B. S. ; FERREIRA, C. A. ; MAIA, R. C. ; NESTAL DE MORAES, G. : *Subcellular localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cancer : Does that matter?* In: *Biochimica et Biophysica Acta - Advances* 2 (2022), Art.-Nr. 100050

- [882] WU, Q. ; BERGLUND, A. E. ; WANG, D. ; MACAULAY, R. J. ; MULÉ, J. J. ; ETAME, A. B. : *Paradoxical epigenetic regulation of XAF1 mediates plasticity towards adaptive resistance evolution in MGMT-methylated glioblastoma*. In: *Scientific Reports* 9 (2019), Art.-Nr. 14072
- [883] REICH, T. R. ; SWITZENY, O. J. ; RENOVANZ, M. ; SOMMER, C. ; KAINA, B. ; CHRISTMANN, M. ; TOMICIC, M. T. : *Epigenetic silencing of XAF1 in high-grade gliomas is associated with IDH1 status and improved clinical outcome*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 15071–15084
- [884] HIROSE, Y. ; BERGER, M. S. ; PIEPER, R. O. : *p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells*. In: *Cancer Research* 61 (2001), S. 1957–1963
- [885] WANG, J. ; ZHANG, W. ; ZHANG, Y. ; CHEN, Y. ; ZOU, B. ; JIANG, B. ; PANG, R. ; GU, Q. ; QIAO, L. ; LAN, H. ; KUNG, H.-F. ; WONG, B. C. Y. : *c-Jun N-terminal kinase (JNK1) upregulates XIAP-associated factor 1 (XAF1) through interferon regulatory factor 1 (IRF-1) in gastrointestinal cancer*. In: *Carcinogenesis* 30 (2009), S. 222–229
- [886] CHUNG, Y. H. ; KIM, D. : *RIP kinase-mediated ROS production triggers XAF1 expression through activation of TAp73 in casticin-treated bladder cancer cells*. In: *Oncology Reports* 36 (2016), S. 1135–1142
- [887] SUN, Y. ; QIAO, L. ; XIA, H. H.-X. ; LIN, M. C. M. ; ZOU, B. ; YUAN, Y. ; ZHU, S. ; GU, Q. ; CHEUNG, T. K. ; KUNG, H. F. ; YUEN, M. F. ; CHAN, A. O. ; WONG, B. C. Y. : *Regulation of XAF1 expression in human colon cancer cell by interferon beta: activation by the transcription regulator STAT1*. In: *Cancer Letters* 260 (2008), S. 62–71
- [888] BANERJEE, S. ; BIEHL, A. ; GADINA, M. ; HASNI, S. ; SCHWARTZ, D. M. : *JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects*. In: *Drugs* 77 (2017), S. 521–546
- [889] ZHANG, Y. ; LIU, Z. : *STAT1 in cancer: friend or foe?* In: *Discovery Medicine* 24 (2017), S. 19–29
- [890] LEVINA, V. ; SU, Y. ; NOLEN, B. ; LIU, X. ; GORDIN, Y. ; LEE, M. ; LOKSHIN, A. ; GORELIK, E. : *Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network*. In: *International Journal of Cancer* 123 (2008), S. 2031–2040
- [891] YOULYOUZ-MARFAK, I. ; GACHARD, N. ; LE CLORENNEC, C. ; NAJJAR, I. ; BARAN-MARSZAK, F. ; REMINIERAS, L. ; MAY, E. ; BORNKAMM, G. W. ; FAGARD, R. ; FEUILLARD, J. : *Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents*. In: *Cell Death and Differentiation* 15 (2008), S. 376–385
- [892] STRONACH, E. A. ; ALFRAIDI, A. ; RAMA, N. ; DATLER, C. ; STUDD, J. B. ; AGARWAL, R. ; GUNAY, T. G. ; GOURLEY, C. ; HENNESSY, B. T. ; MILLS, G. B. ; MAI, A. ; BROWN, R. ; DINA, R. ; GABRA, H. : *HDAC4-regulated STAT1 activation mediates platinum resistance in ovarian cancer*. In: *Cancer Research* 71 (2011), S. 4412–4422
- [893] ZENG, X. ; BABA, T. ; HAMANISHI, J. ; MATSUMURA, N. ; KHARMA, B. ; MISE, Y. ; ABIKO, K. ; YAMAGUCHI, K. ; HORIKAWA, N. ; HUNSTMAN, D. G. ; MULATI, K. ; KITAMURA, S. ; TAKI, M. ; MURAKAMI, R. ; HOSOE, Y. ; MANDAI, M. : *Phosphorylation of STAT1 serine 727 enhances platinum resistance in uterine serous carcinoma*. In: *International Journal of Cancer* 145 (2019), S. 1635–1647

- [894] ROBERTS, D. ; SCHICK, J. ; CONWAY, S. ; BIADE, S. ; LAUB, P. B. ; STEVENSON, J. P. ; HAMILTON, T. C. ; O'DWYER, P. J. ; JOHNSON, S. W. : *Identification of genes associated with platinum drug sensitivity and resistance in human ovarian cancer cells*. In: *British Journal of Cancer* 92 (2005), S. 1149–1158
- [895] LIN, C.-C. ; HUANG, W.-L. ; SU, W.-P. ; CHEN, H. H. W. ; LAI, W.-W. ; YAN, J.-J. ; SU, W.-C. : *Single cell phospho-specific flow cytometry can detect dynamic changes of phospho-Stat1 level in lung cancer cells*. In: *Cytometry Part A* 77 (2010), S. 1008–1019
- [896] CHANG, W.-M. ; CHANG, Y.-C. ; YANG, Y.-C. ; LIN, S.-K. ; CHANG, P. M.-H. ; HSIAO, M. : *AKR1C1 controls cisplatin-resistance in head and neck squamous cell carcinoma through cross-talk with the STAT1/3 signaling pathway*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (2019), Art.-Nr. 245
- [897] OJHA, R. ; SINGH, S. K. ; BHATTACHARYYA, S. : *JAK-mediated autophagy regulates stemness and cell survival in cisplatin resistant bladder cancer cells*. In: *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860 (2016), S. 2484–2497
- [898] SASIDHARAN NAIR, V. ; TOOR, S. M. ; ALI, B. R. ; ELKORD, E. : *Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells*. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 22 (2018), S. 547–557
- [899] YAN, F. ; PANG, J. ; PENG, Y. ; MOLINA, J. R. ; YANG, P. ; LIU, S. : *Elevated Cellular PD1/PD-L1 Expression Confers Acquired Resistance to Cisplatin in Small Cell Lung Cancer Cells*. In: *PLoS One* 11 (2016), Art.-Nr. e0162925
- [900] ZUO, Y. ; ZHENG, W. ; LIU, J. ; TANG, Q. ; WANG, S. S. ; YANG, X. S. : *MiR-34a-5p/PD-L1 axis regulates cisplatin chemoresistance of ovarian cancer cells*. In: *Neoplasma* 67 (2020), S. 93–101
- [901] WANGPAICHITR, M. ; KANDEMIR, H. ; LI, Y. Y. ; WU, C. ; NGUYEN, D. J. M. ; FEUN, L. G. ; KUO, M. T. ; SAVARAJ, N. : *Relationship of Metabolic Alterations and PD-L1 Expression in Cisplatin Resistant Lung Cancer*. In: *Cell & Developmental Biology* 6 (2017), Art.-Nr. 183
- [902] KIM, S. ; KOH, J. ; KIM, M.-Y. ; KWON, D. ; GO, H. ; KIM, Y. A. ; JEON, Y. K. ; CHUNG, D. H. : *PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung*. In: *Human Pathology* 58 (2016), S. 7–14
- [903] SHEN, M. ; XU, Z. ; XU, W. ; JIANG, K. ; ZHANG, F. ; DING, Q. ; XU, Z. ; CHEN, Y. : *Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway*. In: *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38 (2019), Art.-Nr. 149
- [904] BARCLAY, J. ; CRESWELL, J. ; LEÓN, J. : *Inmunoterapia contra el cáncer y la ruta del punto de control PD-1/PD-L1*. In: *Archivos Espanoles de Urologia* 71 (2018), S. 393–399
- [905] SHIBATA, T. ; MAHOTKA, C. ; WETHKAMP, N. ; HEIKAUS, S. ; GABBERT, H. E. ; RAMP, U. : *Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas*. In: *Diagnostic Molecular Pathology* 16 (2007), S. 1–8
- [906] YIN, W. ; CHEEPALA, S. ; CLIFFORD, J. L. : *Identification of a novel splice variant of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339 (2006), S. 1148–1154

- [907] POPP, M. W. ; MAQUAT, L. E. : *Nonsense-mediated mRNA Decay and Cancer*. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 48 (2018), S. 44–50
- [908] HATAKEYAMA, K. ; YAMAKAWA, Y. ; FUKUDA, Y. ; OHSHIMA, K. ; WAKABAYASHI-NAKAO, K. ; SAKURA, N. ; TANIZAWA, Y. ; KINUGASA, Y. ; YAMAGUCHI, K. ; TERASHIMA, M. ; MOCHIZUKI, T. : *A novel splice variant of XIAP-associated factor 1 (XAF1) is expressed in peripheral blood containing gastric cancer-derived circulating tumor cells*. In: *Gastric Cancer* 18 (2015), S. 751–761
- [909] SAVAGNER, P. ; VALLÉS, A. M. ; JOUANNEAU, J. ; YAMADA, K. M. ; THIERY, J. P. : *Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells*. In: *Molecular Biology of the Cell* 5 (1994), S. 851–862
- [910] SHAPIRO, I. M. ; CHENG, A. W. ; FLYTZANIS, N. C. ; BALSAMO, M. ; CONDEELIS, J. S. ; OKTAY, M. H. ; BURGE, C. B. ; GERTLER, F. B. : *An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype*. In: *PLoS Genetics* 7 (2011), Art.-Nr. e1002218
- [911] GARDNER, L. B. : *Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis*. In: *Molecular Cancer Research* 8 (2010), S. 295–308
- [912] GOETZ, A. E. ; WILKINSON, M. : *Stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway*. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (2017), S. 3509–3531
- [913] MAYATI, A. ; LE VEE, M. ; MOREAU, A. ; JOUAN, E. ; BUCHER, S. ; STIEGER, B. ; DENIZOT, C. ; PARMENTIER, Y. ; FARDEL, O. : *Protein kinase C-dependent regulation of human hepatic drug transporter expression*. In: *Biochemical Pharmacology* 98 (2015), S. 703–717
- [914] YANO, K. ; TODOKORO, I. ; KAMIOKA, H. ; TOMONO, T. ; OGIHARA, T. : *Functional Alterations of Multidrug Resistance-Associated Proteins 2 and 5, and Breast Cancer Resistance Protein upon Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HCC827 Cells*. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 44 (2021), S. 103–111
- [915] PRATT, S. ; SHEPARD, R. L. ; KANDASAMY, R. A. ; JOHNSTON, P. A. ; PERRY, W. ; DANTZIG, A. H. : *The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites*. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (2005), S. 855–863
- [916] WU, T.-T. ; CAI, J. ; TIAN, Y.-H. ; CHEN, J.-F. ; CHENG, Z.-L. ; PU, C.-S. ; SHI, W.-Z. ; SUO, X.-P. ; WU, X.-J. ; DOU, X.-W. ; ZHANG, K.-M. : *MTF2 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Progression of Hepatocellular Carcinoma by Transcriptionally Activating Snail*. In: *OncoTargets and Therapy* 12 (2019), S. 11207–11220
- [917] WANG, N. ; DONG, C.-R. ; JIANG, R. ; TANG, C. ; YANG, L. ; JIANG, Q.-F. ; CHEN, G. G. ; LIU, Z.-M. : *Overexpression of HIF-1 α , metallothionein and SLUG is associated with high TNM stage and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma*. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7 (2014), S. 322–330
- [918] MIYAKE, M. ; FUJIMOTO, K. ; ANAI, S. ; OHNISHI, S. ; NAKAI, Y. ; INOUE, T. ; MATSUMURA, Y. ; TOMIOKA, A. ; IKEDA, T. ; OKAJIMA, E. ; TANAKA, N. ; HIRAO, Y. : *Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the cytotoxic effect of gemcitabine in urothelial cancer cells*. In: *Anticancer Research* 30 (2010), S. 2145–2152

- [919] SIEGSMUND, M. J. ; MARX, C. ; SEEMANN, O. ; SCHUMMER, B. ; STEIDLER, A. ; TOKTOMAMBETOVA, L. ; KÖHRMANN, K. U. ; RASSWEILER, J. ; ALKEN, P. : *Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins*. In: *Urological Research* 27 (1999), S. 157–163
- [920] HAYASHI, M. ; GUIDA, E. ; INOKAWA, Y. ; GOLDBERG, R. ; REIS, L. O. ; OOKI, A. ; PILLI, M. ; SADHUKHAN, P. ; WOO, J. ; CHOI, W. ; IZUMCHENKO, E. ; GONZALEZ, L. M. ; MARCHIONNI, L. ; ZHAVORONKOV, A. ; BRAIT, M. ; BIVALACQUA, T. ; BARAS, A. ; NETTO, G. J. ; KOCH, W. ; SINGH, A. ; HOQUE, M. O. : *GULP1 regulates the NRF2-KEAP1 signaling axis in urothelial carcinoma*. In: *Science Signaling* 13 (2020), Art.-Nr. eaba0443
- [921] CHEN, W. ; SUN, Z. ; WANG, X.-J. ; JIANG, T. ; HUANG, Z. ; FANG, D. ; ZHANG, D. D. : *Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response*. In: *Molecular Cell* 34 (2009), S. 663–673
- [922] RAYESS, H. ; WANG, M. B. ; SRIVATSAN, E. S. : *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. In: *International Journal of Cancer* 130 (2012), S. 1715–1725
- [923] LENZEN-SCHULTE, M. ; ZYLKA-MENHORN, V. : *Autophagie: „Selbstverstümmelung“ als Überlebensstrategie*. In: *Deutsches Ärzteblatt* 113 (2016), S. A1740-A1742
- [924] KONDAPURAM, S. K. ; SARVAGALLA, S. ; COUMAR, M. S. : *Targeting autophagy with small molecules for cancer therapy*. In: *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 5 (2019), Art.-Nr. 32
- [925] KOCATURK, N. M. ; AKKOC, Y. ; KIG, C. ; BAYRAKTAR, O. ; GOZUACIK, D. ; KUTLU, O. : *Autophagy as a molecular target for cancer treatment*. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 134 (2019), S. 116–137
- [926] WANG, J. ; WU, G. S. : *Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 289 (2014), S. 17163–17173
- [927] USMAN, R. M. ; RAZZAQ, F. ; AKBAR, A. ; FAROOQUI, A. A. ; IFTIKHAR, A. ; LATIF, A. ; HASSAN, H. ; ZHAO, J. ; CAREW, J. S. ; NAWROCKI, S. T. ; ANWER, F. : *Role and mechanism of autophagy-regulating factors in tumorigenesis and drug resistance*. In: *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 17 (2021), S. 193–208
- [928] OJHA, R. ; SINGH, S. K. ; BHATTACHARYYA, S. ; DHANDA, R. S. ; RAKHA, A. ; MANDAL, A. K. ; JHA, V. : *Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent*. In: *The Journal of Urology* 191 (2014), S. 1889–1898
- [929] DYSHLOVOY, S. A. ; MADANCHI, R. ; HAUSCHILD, J. ; OTTE, K. ; ALSDORF, W. H. ; SCHUMACHER, U. ; KALININ, V. I. ; SILCHENKO, A. S. ; AVILOV, S. A. ; HONECKER, F. ; STONIK, V. A. ; BOKEMEYER, C. ; VON AMSBERG, G. : *The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells*. In: *BMC Cancer* 17 (2017), Art.-Nr. 93
- [930] LIN, J.-F. ; LIN, Y.-C. ; TSAI, T.-F. ; CHEN, H.-E. ; CHOU, K.-Y. ; HWANG, T. I.-S. : *Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells*. In: *Drug Design, Development and Therapy* 11 (2017), S. 1517–1533
- [931] SCHLÜTERMANN, D. ; SKOWRON, M. A. ; BERLETH, N. ; BÖHLER, P. ; DEITERSEN, J. ; STUHLREIER, F. ; WALLOT-HIEKE, N. ; WU, W. ; PETER, C. ; HOFFMANN, M. J. ; NIEGISCHE, G. ; STORK, B. : *Targeting*

urothelial carcinoma cells by combining cisplatin with a specific inhibitor of the autophagy-inducing class III PtdIns3K complex. In: *Urologic Oncology* 36 (2018), S. 160.e1-160.e13

- [932] BERNING, L. ; SCHLÜTERMANN, D. ; FRIEDRICH, A. ; BERLETH, N. ; SUN, Y. ; WU, W. ; MENDIBURO, M. J. ; DEITENSEN, J. ; BRASS, H. U. C. ; SKOWRON, M. A. ; HOFFMANN, M. J. ; NIEGISCHE, G. ; PIETRUSZKA, J. ; STORK, B. : *Prodigosin Sensitizes Sensitive and Resistant Urothelial Carcinoma Cells to Cisplatin Treatment.* In: *Molecules* 26 (2021), Art.-Nr. 1294
- [933] YUGE, K. ; KIKUCHI, E. ; HAGIWARA, M. ; YASUMIZU, Y. ; TANAKA, N. ; KOSAKA, T. ; MIYAJIMA, A. ; OYA, M. : *Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer.* In: *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (2015), S. 2112–2120
- [934] FARAHMAND, L. ; MERIKHIAN, P. ; JALILI, N. ; DARVISHI, B. ; MAJIDZADEH-A, K. : *Significant Role of MUC1 in Development of Resistance to Currently Existing Anti-cancer Therapeutic Agents.* In: *Current Cancer Drug Targets* 18 (2018), S. 737–748
- [935] SHIGETA, K. ; HASEGAWA, M. ; KIKUCHI, E. ; YASUMIZU, Y. ; KOSAKA, T. ; MIZUNO, R. ; MIKAMI, S. ; MIYAJIMA, A. ; KUFE, D. ; OYA, M. : *Role of the MUC1-C oncoprotein in the acquisition of cisplatin resistance by urothelial carcinoma.* In: *Cancer Science* 111 (2020), S. 3639–3652
- [936] SJÖDAHL, G. ; JACKSON, C. L. ; BARTLETT, J. M. S. ; SIEMENS, D. R. ; BERMAN, D. M. : *Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts.* In: *The Journal of Pathology* 247 (2019), S. 563–573
- [937] TEO, M. Y. ; MOTA, J. M. ; WHITING, K. A. ; LI, H. A. ; FUNT, S. A. ; LEE, C.-H. ; SOLIT, D. B. ; AL-AHMADIE, H. ; MILOWSKY, M. I. ; BALAR, A. V. ; PIETZAK, E. ; DALBAGNI, G. ; BOCHNER, B. H. ; OSTROVNAYA, I. ; BAJORIN, D. F. ; ROSENBERG, J. E. ; IYER, G. : *Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Alteration Status is Associated with Differential Sensitivity to Platinum-based Chemotherapy in Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma.* In: *European Urology* 78 (2020), S. 907–915
- [938] SUNG, J.-Y. ; SUN, J.-M. ; CHANG JEONG, B. ; IL SEO, S. ; SOO JEON, S. ; MOO LEE, H. ; YONG CHOI, H. ; YOUNG KANG, S. ; CHOI, Y.-L. ; YOUNG KWON, G. : *FGFR3 overexpression is prognostic of adverse outcome for muscle-invasive bladder carcinoma treated with adjuvant chemotherapy.* In: *Urologic Oncology* 32 (2014), S. 49.e23-49.e31
- [939] AL-OBAIDY, K. I. ; CHENG, L. : *Fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene: pathogenesis and treatment implications in urothelial carcinoma of the bladder.* In: *Journal of Clinical Pathology* 74 (2021), S. 491–495
- [940] LORIOT, Y. ; NECCHI, A. ; PARK, S. H. ; GARCIA-DONAS, J. ; HUDDART, R. ; BURGESS, E. ; FLEMING, M. ; REZAZADEH, A. ; MELLADO, B. ; VARLAMOV, S. ; JOSHI, M. ; DURAN, I. ; TAGAWA, S. T. ; ZAKHARIA, Y. ; ZHONG, B. ; STUYCKENS, K. ; SANTIAGO-WALKER, A. ; DE PORRE, P. ; O'HAGAN, A. ; AVADHANI, A. ; SIEFKER-RADTKE, A. O. : *Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma.* In: *The New England Journal of Medicine* 381 (2019), S. 338–348
- [941] XIAO, J.-F. ; CALIRI, A. W. ; DUEX, J. E. ; THEODORESCU, D. : *Targetable Pathways in Advanced Bladder Cancer: FGFR Signaling.* In: *Cancers* 13 (2021), Art.-Nr. 4891
- [942] WANG, L. ; ŠUŠTIĆ, T. ; LEITE DE OLIVEIRA, R. ; LIEFTINK, C. ; HALONEN, P. ; VAN DE VEN, M. ; BEIJERSBERGEN, R. L. ; VAN DEN HEUVEL, M. M. ; BERNARDS, R. ; VAN DER HEIJDEN, M. S. : A

Functional Genetic Screen Identifies the Phosphoinositide 3-kinase Pathway as a Determinant of Resistance to Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors in FGFR Mutant Urothelial Cell Carcinoma. In: *European Urology* 71 (2017), S. 858–862

- [943] MANSOUR, A. M. ; ABDELRAHIM, M. ; LAYMON, M. ; ELSHERBEENY, M. ; SULTAN, M. ; SHOKEIR, A. ; MOSBAH, A. ; ABOL-ENEIN, H. ; AWADALLA, A. ; CHO, E. ; SAIRAM, V. ; PARK, T. D. ; SHAHID, M. ; KIM, J. : *Epidermal growth factor expression as a predictor of chemotherapeutic resistance in muscle-invasive bladder cancer.* In: *BMC Urology* 18 (2018), Art.-Nr. 100
- [944] WANG, W.-J. ; LI, C.-F. ; CHU, Y.-Y. ; WANG, Y.-H. ; HOUR, T.-C. ; YEN, C.-J. ; CHANG, W.-C. ; WANG, J.-M. : *Inhibition of the EGFR/STAT3/CBPB Axis Reverses Cisplatin Cross-resistance with Paclitaxel in the Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder.* In: *Clinical Cancer Research* 23 (2017), S. 503–513
- [945] ARBOUR, K. C. ; RIELY, G. J. : *Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review.* In: *Journal of the American Medical Association* 322 (2019), S. 764–774
- [946] MILLER, K. ; MORANT, R. ; STENZL, A. ; ZUNA, I. ; WIRTH, M. : *A Phase II Study of the Central European Society of Anticancer-Drug Research (CESAR) Group: Results of an Open-Label Study of Gemcitabine plus Cisplatin with or without Concomitant or Sequential Gefitinib in Patients with Advanced or Metastatic Transitional Cell Carcinoma of the Urothelium.* In: *Urologia Internationalis* 96 (2016), S. 5–13
- [947] PHILIPS, G. K. ; HALABI, S. ; SANFORD, B. L. ; BAJORIN, D. ; SMALL, E. J. : *A phase II trial of cisplatin (C), gemcitabine (G) and gefitinib for advanced urothelial tract carcinoma: results of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90102.* In: *Annals of Oncology* 20 (2009), S. 1074–1079
- [948] REBOUISSOU, S. ; BERNARD-PIERROT, I. ; DE REYNIÈS, A. ; LEPAGE, M.-L. ; KRUCKER, C. ; CHAPEAUBLANC, E. ; HÉRAULT, A. ; KAMOUN, A. ; CAILLAULT, A. ; LETOUZÉ, E. ; ELAROUCI, N. ; NEUZILLET, Y. ; DENOUX, Y. ; MOLINIÉ, V. ; VORDOS, D. ; LAPLANCHE, A. ; MAILLÉ, P. ; SOYEUX, P. ; OFUALUKA, K. ; REYAL, F. ; BITON, A. ; SIBONY, M. ; PAOLETTI, X. ; SOUTHGATE, J. ; BENHAMOU, S. ; LEBRET, T. ; ALLORY, Y. ; RADVANYI, F. : *EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype.* In: *Science Translational Medicine* 6 (2014), Art.-Nr. 244ra91
- [949] ECKSCHLAGER, T. ; PLCH, J. ; STIBOROVA, M. ; HRABETA, J. : *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs.* In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017), Art.-Nr. 1414
- [950] CAPPELLACCI, L. ; PERINELLI, D. R. ; MAGGI, F. ; GRIFANTINI, M. ; PETRELLI, R. : *Recent Progress in Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents.* In: *Current Medicinal Chemistry* 27 (2020), S. 2449–2493
- [951] RYU, H. ; JIN, H. ; HO, J.-N. ; BAE, J. ; LEE, E. ; LEE, S. E. ; LEE, S. : *Suberoylanilide Hydroxamic Acid Can Re-sensitize a Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer.* In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 42 (2019), S. 66–72
- [952] CHOUDHARY, S. ; SOOD, S. ; WANG, H.-C. R. : *Synergistic induction of cancer cell death and reduction of clonogenic resistance by cisplatin and FK228.* In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436 (2013), S. 325–330

- [953] PATTARAWAT, P. ; HONG, T. ; WALLACE, S. ; HU, Y. ; DONNELL, R. ; WANG, T.-H. ; TSAI, C.-L. ; WANG, J. ; WANG, H.-C. R. : *Compensatory combination of romidepsin with gemcitabine and cisplatin to effectively and safely control urothelial carcinoma*. In: *British Journal of Cancer* 123 (2020), S. 226–239
- [954] YEH, B.-W. ; LI, W.-M. ; LI, C.-C. ; KANG, W.-Y. ; HUANG, C.-N. ; HOUR, T.-C. ; LIU, Z.-M. ; WU, W.-J. ; HUANG, H.-S. : *Histone deacetylase inhibitor trichostatin A resensitizes gemcitabine resistant urothelial carcinoma cells via suppression of TG-interacting factor*. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 290 (2016), S. 98–106
- [955] ZHANG, H. ; LIU, L. ; LIU, C. ; PAN, J. ; LU, G. ; ZHOU, Z. ; CHEN, Z. ; QIAN, C. : *Notch3 overexpression enhances progression and chemoresistance of urothelial carcinoma*. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 34362–34373
- [956] TYAGI, A. ; CHANDRASEKARAN, B. ; KOLLURU, V. ; RAI, S. ; JORDAN, A. C. ; HOUDA, A. ; MESSER, J. ; ANKEM, M. ; DAMODARAN, C. ; HADDAD, A. : *Combination of androgen receptor inhibitor and cisplatin, an effective treatment strategy for urothelial carcinoma of the bladder*. In: *Urologic Oncology* 37 (2019), S. 492–502

Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Fritz für die hervorragende Betreuung bedanken. Er hat mich äußerst strukturiert und zielstrebig durch die gesamte Arbeit geführt und für Fragen immer ein offenes Ohr gehabt. Nicht zuletzt hat er mit großem Engagement die Publikation meiner Daten vorangetrieben. Mir werden viele interessante und lehrreiche Gespräche in der Kaffeeküche der Toxikologie und in seinem Büro, aus denen immer neue Denkanstöße hervorgegangen sind, in dauerhafter positiver Erinnerung bleiben. Von ihm habe ich viel über präklinische Forschung gelernt und daraus Motivation geschöpft, auch weiterhin wissenschaftlich zu arbeiten.

Ich denke oft und gerne an die Zeit im Institut für Toxikologie zurück. Das gesamte Team hat durch die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen bin. Mein besonderer Dank gilt Katharina Roquette (damals Krüger), die mir mit unerschöpflicher Geduld und Kompetenz sowie anhaltender guter Laune alle Methoden so gut beigebracht hat, dass sie selbst bei einer Medizinerin funktioniert haben. Auch bei Verena Ziegler, Lena Schumacher und Birgit Opgenoorth möchte ich mich für zahlreiche praktische Tipps und kompetente Hilfestellungen herzlich bedanken.

Meiner Familie möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Betreuung meiner Kinder danken – allen voran meiner Mutter Ulrike, aber auch meiner Schwester Katharina, meiner besten Freundin Anna und meinem Freund Johannes. Ohne euch hätte ich weder die Daten im Labor erheben noch die Dissertationsschrift anfertigen können. Meinen beiden Eltern Ulrike und Thomas Geist danke ich dafür, dass sie mich während der gesamten Dauer meines Studiums finanziell unterstützt haben. Euch allen und auch meinen beiden Töchtern Hannah und Marie danke ich dafür, dass ihr mich immer bestärkt und an mich geglaubt habt.

Vielen Dank!