

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

Analyse zur nichtkanonischen Wirkung von Inhibitoren der Transkriptionskontrolle im Harnblasenkarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Sophia Thy

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Thy, S.; Hommel, A.; Meneceur, S.; Bartkowiak, A.L.; Schulz, W.A.; Niegisch, G.; Hoffmann, M.J. Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. *Cancers* 2021, 13, 1376. <https://doi.org/10.3390/cancers13061376>

Zusammenfassung

Das muskelinvasive Urothelkarzinom (UC) wird, unter anderem, mit cisplatinbasierter Chemotherapie behandelt. Die Wirksamkeit dieser Therapie ist jedoch häufig durch die Ausbildung einer Chemoresistenz der Tumorzellen limitiert. Daraus leitet sich der Bedarf an neuen Wirkstoffen in der medikamentösen Therapie des UC ab. Im UC konnten bereits eine Vielzahl von Mutationen und Expressionsveränderungen epigenetischer Enzyme nachgewiesen werden. Diese tragen zur Krankheitsentstehung bei und können zur Therapieresistenz führen, stellen aber auch ein mögliches pharmakologisches Ziel in der Therapie dar. So kann die pharmakologische Inhibition von epigenetischen Enzymen ein sinnvoller Angriffspunkt für eine medikamentöse Tumortherapie des UC sein. Daher sollte in dieser Arbeit die Wirkung eines Inhibitors von Bromodomänen (BET)-Proteinen der zweiten Generation namens PLX51107 (PLX) auf UC-Zellen und benigne Epithelzellen (HBLAK Zelllinie) charakterisiert werden. Diese Wirkung sollte mit der von Romidepsin, einem etablierten Inhibitor von Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse I verglichen werden. Während HDACs zu den epigenetischen *erasern* gehören, zählen BET-Proteine zu den epigenetischen *readern*, die die Acetylierung an Histonschwänzen erkennen und die Transkriptionsmaschinerie rekrutieren.

Über durchflusszytometrische Analysen und Western Blots nach Behandlung konnten Induktion von Apoptose und Hemmung der Proliferation in UC-Zelllinien nachgewiesen werden. Analysen des Transkriptomts mittels RNA-Sequenzierung und anschließende Validierungen via RT-PCR ergaben unterschiedliche molekulare Wirkungen der beiden Substanzen auf Komponenten der DNA-Reparatur. Insbesondere Gene der Homologen Rekombination (HR) und des nicht homologen end joinings (NHEJ) wurden besonders durch PLX vermindert exprimiert. HR-defiziente Tumoren wie z.B. Mamma- und Ovarialkarzinome sind empfindlich gegenüber PARP-Inhibitoren. Daher wurde eine Kombinationsbehandlung mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib untersucht. Weiter sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Wirksamkeit einer Behandlung mit Cisplatin, durch eine Kombination mit einem epigenetischen Inhibitor verbessert werden kann.

Synergieanalysen mit Hilfe der Chou Talalay Methode ergaben für die Kombination mit Cisplatin einen robusten synergistischen Effekt mit PLX in UC-Zellen, aber nicht in der benignen Kontrolle. Die Kombination mit Romidepsin wirkte nur bei höheren Dosierungen synergistisch und auch in benignen HBLAK. Noch bessere Ergebnisse konnten für die Kombination mit PLX und Talazoparib erzielt werden. Auch hier war die Kombination mit Romidepsin unterlegen. Durch die Synergieeffekte waren Dosisreduzierungen möglich, die sich günstig mit Hinblick auf Normaltoxizität auswirken könnten. Diese reduzierten Dosierungen von Kombinationsbehandlungen wurden bezüglich ihrer Wirkung auf das klonogene Wachstum, den Zellzyklus und die Apoptoseinduktion weiter untersucht. Auch hierbei zeigte sich die Kombination aus PLX und Talazoparib am effektivsten.

Zusammenfassend lässt sich nach diesen in vitro Untersuchungen sagen, dass PLX dazu genutzt werden kann, die Anwendung von PARP-Inhibitoren auf Zellen ohne BRCA-Mutation zu erweitern. Durch die Synergieeffekte kann mit niedriger Dosierung in Tumorzellen effektiv Apoptose induziert werden, somit werden benigne Zellen besser geschont. Zukünftig sollte die neue Kombinationstherapie über in vivo Versuche validiert werden.

Summary

Muscle-invasive urothelial carcinoma (UC) is treated with cisplatin-based chemotherapy, among other things. However, the effectiveness of this therapy is often limited by the development of chemoresistance in the tumour cells. This gives rise to the need for new active substances in the drug therapy of UC. Many mutations and changes in the expression of epigenetic enzymes have already been identified in UC. These contribute to the development of the disease and can lead to treatment resistance but also represent a potential pharmacological target in therapy. Pharmacological inhibition of epigenetic enzymes could therefore be a useful target for drug-based tumour therapy of UC. Therefore, the aim of this study was to characterise the effect of a second-generation inhibitor of bromodomain (BET) proteins called PLX51107 (PLX) on UC cells and benign epithelial cells (HBLAK cell line). This effect should be compared with that of Romidepsin, an established inhibitor of class I histone deacetylases (HDACs). While HDACs are epigenetic erasers, BET proteins are epigenetic readers that recognise acetylation at histone tails and recruit the transcription machinery.

Flow cytometric analyses and Western blots after treatment demonstrated induction of apoptosis and inhibition of proliferation in UC cell lines. Analyses of the transcriptome using RNA sequencing and subsequent validation via RT-PCR revealed different molecular effects of the two substances on components of DNA repair. In particular, genes of homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) were particularly reduced by PLX. HR-deficient tumours such as breast and ovarian carcinomas are sensitive to PARP inhibitors. Therefore, a combination treatment with the PARP inhibitor Talazoparib was investigated. This study also aimed to investigate whether the efficacy of treatment with cisplatin can be improved by combining it with an epigenetic inhibitor.

Synergy analyses using the Chou Talalay method showed a robust synergistic effect for the combination with cisplatin with PLX in UC cells but not in the benign control. The combination with Romidepsin only had a synergistic effect at higher doses and also in benign HBLAK. Even better results were achieved for the combination with PLX and Talazoparib. Here, too, the combination with Romidepsin was inferior. The synergistic effects enabled dose reductions that could have a favourable effect regarding normal toxicity. These reduced doses of combination treatments were further analysed regarding their effect on clonogenic growth, the cell cycle, and apoptosis induction. Here, too, the combination of PLX and Talazoparib proved to be the most effective.

In summary these in vitro results suggest that PLX can be used to extend the application of PARP inhibitors to cells without a BRCA mutation. Due to the synergy effects, apoptosis can be effectively induced in tumour cells at low doses, while benign cells are better protected. In future, the new combination therapy should be validated by in vivo trials.

Abkürzungsverzeichnis

Alt-EJ-Weg	Alternative End-Joining	HCl	Salzsäure
APS	Ammoniumpersulfat	HDAC	Histondeacetylase
AURKA	Aurorakinase A	HDACi	HDAC-Inhibitor
AURKB	Aurorakinase B	HRR	Homologe Rekombination-Reparaturweg
BCA	Bicinchoninsäure	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,3-diphenyltetrazoliumbromid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin	NaCl	Natriumchlorid
BET-Familie	Bromodomänen und Extraterminal Familie	NHEJ	Nicht homologes End Joining
BETi	BET-Inhibitor	PAA	Polyacrylamid
BMFZ	Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf	PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
BSA	Bovines Serum Albumin	PARPi	PARP Inhibitor
cDNA	complementary DNA	PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Cq-Wert	quantification cycle	PI	Propidium-Iodid
DDS	DNA-Schadensantwort	PLX	PLX51107
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PS	Phosphatidylserin
DMSO	Dimethylsulfoxid	P-TEFb	positiver Transkriptions-Elongationsfaktor b
DNMT	DNA-Methyltransferasen	qRT-PCR	quantitativen Echtzeit-PCR
DOC	Sodium Deoxycholat	RNA-seq	RNA-Sequenzierung
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SE	Super-Enhancer
ET	extraterminal	TBTB	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
FCS	Fetales Kälberserum	TEMED	Tetramethylethylendiamin
H4Ac	acetyliertes H4		
HAT	Histon-Acetyltransferase		

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethane

TUR-B Transurethrale Blasenresektion

UC Urothelkarzinom

UCCs Urothelkarzinomzellen

UICC Union internationale contre le cancer

ZBG zinc binding group

γ H2AX Phosphoryliertes H2AX

δ H2Axphos phosphoryliertes Histon H2Ax

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Urothelkarzinom.....	1
1.1.1	Cisplatin	4
1.2	Epigenetik	5
1.2.1	Bromodomänen 4 Protein	6
1.2.2	BET-Inhibitoren	7
1.2.3	Histondeacetylasen	8
1.2.4	HDAC-Inhibitoren	10
1.2.5	TW09	11
1.3	DNA-Reparaturmechanismen	11
1.3.1	Homologe Rekombination	11
1.3.2	Nicht homologes End Joining	12
1.3.3	Alternative End-Joining	12
1.3.4	PARP-Inhibitoren und BRCAness	12
1.4	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Verwendete Zelllinien	16
2.1.2	Zellkultur	16
2.1.3	Zellkulturmedien.....	17
2.1.4	Substanzen für die Behandlung von Zellen	17
2.1.5	RNA-Isolation	18
2.1.6	Proteinextraktion	18
2.1.7	BCA-Protein Assay	19
2.1.8	SDS-PAGE und Western Blot	20
2.1.9	Quantitative Echtzeit-PCR.....	22
2.1.10	MTT-Test	24
2.1.11	FACS- Messung.....	24
2.1.12	Software.....	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Zellkultur	25
2.2.2	RNA-Analyse	30
2.2.3	Protein-Analyse.....	32

2.2.4	Durchflusszytometrie.....	34
3	Ergebnisse	36
3.1	<i>BRD-4</i> Expression in unbehandelten UCCs	36
3.2	Erstellung eines molekularen Wirkprofils der epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin mittels Transkriptom-Analyse	36
3.2.1	Effekte der Behandlungen auf die DNA-Schadensantwort	37
3.2.2	Effekte der Behandlungen auf die DNA-Reparaturmechanismen	38
3.2.3	Effekte der Behandlung auf die BRCAness	41
3.2.4	Effekte der Behandlung auf die Apoptoseregulation.....	44
3.3	Validierung der RNAseq Ergebnisse mittels RT-qPCR.....	45
3.3.1	Untersuchung der DNA-Schadensantwort mittels qPCR	45
3.3.2	Untersuchung der DNA-Reparatur mittels qPCR.....	46
3.3.3	Untersuchung der Apoptoseregulation mittels qPCR.....	49
3.3.4	Untersuchung der Zellzyklusregulation mittels qPCR.....	50
3.3.5	Auswirkung der Inhibitorbehandlung auf das Proteinniveau	51
3.4	Einfluss von Kombinationsbehandlung auf die Viabilität der Zelllinien	53
3.4.1	Wirkung der Behandlung mit PLX und Romidepsin auf die Zellviabilität	54
3.4.2	Wirkung der Behandlung mit TW09 und Cisplatin auf die Zellviabilität.	55
3.4.3	Wirkung der Behandlung mit Cisplatin und PLX auf die Zell Viabilität.....	57
3.4.4	Wirkung der Behandlung mit Romidepsin und Cisplatin auf die Zellviabilität	59
3.4.5	Wirkung der Behandlung mit PLX und dem PARP-Inhibitor Talazoparib auf die Zellviabilität.....	60
3.4.6	Wirkung der Behandlung mit Romidepsin und Talazoparib auf die Kurzzeitproliferation.....	62
3.4.7	Wirkung der Behandlung mit einer reduzierten Dosis epigenetischer Inhibitoren auf die Zellviabilität	64
3.5	Wirkung von Kombinationsbehandlung auf die Langzeitproliferation der Zelllinien	66
3.5.1	Wirkung der Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib in voller und reduzierter Dosierung auf die Langzeitproliferation.....	67
3.5.2	Wirkung der Behandlung mit PLX und Cisplatin auf die Langzeitproliferation	68
3.6	Effekte der Kombinationsbehandlungen auf die Apoptoseinduktion	69
3.6.1	Apoptoseinduktion nach Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib	70
3.6.2	Apoptoseinduktion nach Behandlung mit PLX und Cisplatin.....	71
3.7	Effekte der Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus.....	72

3.7.1	Zellzyklus nach Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib.....	73
3.7.2	Zellzyklus nach Behandlung mit PLX und Cisplatin	74
3.8	Einfluss einer sequenziellen Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität	75
3.8.1	Behandlung mit Gemcitabin und PLX 24 h später	75
3.8.2	Sequenzielle Behandlung mit Cisplatin und TW09	77
3.8.3	Sequenzielle Behandlung mit PLX und Cisplatin	80
4	Diskussion.....	82
4.1	Die molekulare Wirkung von epigenetischen Inhibitoren, die auf Histonacetylierung abzielen	82
4.1.1	PLX hemmt die Zellproliferation, induziert Apoptose und vermindert die Reparaturkapazität von DNA-Schäden.....	83
4.1.2	Romidepsin senkt die Zellviabilität und induziert Apoptose	84
4.1.3	Die Kombinationstherapie mit PLX und Romidepsin ist der Monobehandlung nicht überlegen.....	85
4.2	Zelluläre Wirkung von Romidepsin und PLX in Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin bzw. Talazoparib	86
4.2.1	Die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und PLX/ Romidepsin zeigt synergistische Effekte auf die UCCs.....	86
4.2.2	Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt synergistische Effekte auf die UCCs.....	87
4.2.3	Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt weniger starke synergistische Effekte auf die HBLAK Zellen.....	89
4.2.4	Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und Romidepsin zeigt sich der Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX unterlegen.....	89
4.2.5	Sequenzielle Behandlung mit PLX/ TW09 und Cisplatin verbessert nicht die Effektivität der Behandlung.....	90
4.2.6	Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt auch in reduzierter Dosierung synergistische Effekte auf die UCCs.....	90
4.2.7	Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX induziert Apoptose und induziert ein G2/M-Arrest in den UCCs.....	91
4.3	: Schlussfolgerung: Epigenetische Inhibitoren sensitivieren UCCs für eine Behandlung mit Cisplatin und PARPi	92
5	Literaturverzeichnis	93

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom

Das Urothel kleidet das Nierenbecken, die Harnleiter und die Blase, welche die ableitenden Harnwege bilden, aus. Hierbei handelt es sich um ein mehrschichtiges Epithel, welches in eine Basal-, Intermediär- und Oberflächenschicht eingeteilt werden kann. Das Urothel passt sich den unterschiedlichen Füllungszuständen der Organe an und erfüllt sowohl eine Speicherfunktion, wie auch eine Barrierefunktion (Welsch, 2014). Das Urothelkarzinom (UC) ist die klinisch bedeutendste Tumorentität der ableitenden Harnwege, da Malignome der Harnwege in über 90 % der Fälle vom Urothel ausgehen. Sie sind zu 93-95 % in der Harnblase lokalisiert. Seltener histologische Entitäten stellen das Plattenepithelkarzinom mit einem Anteil von ca. 5 % und das Adenokarzinom mit einem Anteil von unter 2 % dar. (Schmelz et al., 2014).

Weltweit ist das Urothelkarzinom die am zehnthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung mit rund 573.278 Fällen in 2020 (Sung et al., 2021). Die Inzidenz variiert länderabhängig, wobei sie in westlichen Ländern am höchsten und auf dem asiatischen Kontinent am niedrigsten ist (Kakehi et al., 2010) (Burger et al., 2013). In Deutschland erkrankten im Jahr 2018 über 30.000 Menschen an einem Blasenkarzinom, rund dreiviertel der Erkrankten waren Männer (Zentrum für Krebsregisterdaten 2021).

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Urothelkarzinoms ist die Inhalation von Tabakrauch. Schätzungsweise 50 % der Urothelkarzinome lassen sich mit Zigarettenkonsum assoziieren. Ein weiter bedeutender Risikofaktor ist die Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien, vorrangig polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine, wie Benzidin, 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl, 4-Chlor-o-toluidin und o-Toluidin. Aromatische Amine finden Anwendung in der Farbindustrie, in Friseurchemikalien und bei der Härtung von Epoxidharzen (Giesen et al., 2019).

Abhängig von der Histologie wird das Urothelkarzinom nach der WHO-Klassifikation von 2016 eingeteilt. Hierbei wird die histologische Differenzierung der Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe angegeben. Diese Bestimmung des Differenzierungsgrades bezeichnet man als *Grading*. Hier unterscheidet man gut differenzierte Tumoren (*low grade*) von schlecht differenzierten Tumoren (*high grade*) (Humphrey et al., 2016). Die bei anderen Tumorentitäten gebräuchliche Klassifikation, die drei Differenzierungsgrade (G1, G2 und G3) unterscheidet, wurde in der WHO Klassifikation von 2004 verlassen (Schmelz et al., 2014). Des Weiteren erfolgt eine Einteilung anhand der TNM-Kriterien der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Diese gibt die Ausdehnung des Primärtumors (T), den Befall von Lymphknoten (N) und die Metastasierung in andere Organe (M) an. Anhand des T-Stadiums kann die Unterscheidung zwischen einem nicht-muskelinvasivem (pTis, pTa, pT1) und einem muskelinvasivem (\geq pT2) Karzinom getroffen werden. Diese Einteilung ist entscheidend für die Planung weiterer Diagnostik und Therapie. Etwa 75 % der neu diagnostizierten Urothelkarzinome sind nicht muskelinvasiv. Das nicht-muskelinvasive Karzinom ist somit die häufigste Form des Urothelkarzinoms, auch hat es eine günstige Prognose bezüglich Therapieansprechen und Remission. Die übrigen 25 % der Urothelkarzinome weisen bei Diagnose bereits einen Befall der Muskulatur auf, was die

Prognose verschlechtert und in den meisten Fällen radikale chirurgische Therapien notwendig macht (Burger et al., 2013).

Die Therapie des Urothelkarzinoms richtet sich vorrangig danach, ob es sich um einen muskelinvasiven oder nicht-muskelinvasiven Tumor handelt. Bei den nicht-muskelinvasiven Tumoren steht die transurethrale Blasenresektion (TUR-B) im Vordergrund der Behandlung: Hierbei wird mittels einer durch die Harnröhre eingeführten Elektroschlinge die vorhandene Tumormasse abgetragen (Schmelz et al., 2014). Bei inkompletter Abtragung, einem Tumor mit hohem Rezidiv- oder Progressionsrisiko oder bei fehlendem Muskelgewebe im Präparat, sollte innerhalb von 6 Wochen eine Nachresektion durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Die anschließende adjuvante Behandlung richtet sich nach dem Rezidiv- und Progressionsrisiko des Tumors, welches mit der Risikoklassifikation der *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) bestimmt wird. Es erfolgt eine Einteilung in drei Risikogruppen: „*Low-risk*“, „*Intermediate-risk*“ und „*High-risk*“. Aus dieser Klassifikation ergeben sich risikoadaptierte Therapieempfehlungen. Bei „*Low-risk*“-Tumoren kann, unmittelbar postoperativ, eine einmalige Instillationstherapie der Harnblase mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C erfolgen. Bei einem „*Intermediate-risk*“-Tumor sollte eine adjuvante, intravesikale Therapie mit Mitomycin C mit einer Erhaltungstherapie über ein Jahr durchgeführt werden. Bei einem „*high-risk*“-Tumor erfolgt eine intravesikale Therapie mit dem Immunmodulator *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), einem attenuierten Tuberkuloseerreger. Nach einer sechswöchigen Induktionstherapie erfolgt eine bis zu dreijährige Erhaltungstherapie (Karl et al., 2016; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Die Therapie mit BCG zeigt eine signifikante Reduktion der Rezidive gegenüber einer Therapie mit Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Wenn ein „*High-risk*“ Karzinom vorliegt, ist außerdem eine Zystektomie eine mögliche Therapieoption. Auch bei einem Frührezidiv oder einer Progression unter Therapie sollte eine Zystektomie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).

Bei der Behandlung von muskelinvasiven Urothelkarzinomen ist die radikale Zystektomie der Goldstandard. Beim Mann wird dabei die Harnblase, die Prostata und die Samenblasen entfernt. Bei der Frau werden Harnblase, Uterus, Adnexen und die vordere Vaginalwand reseziert. Ein obligater Bestandteil der radikalen Zystektomie ist zudem eine pelvine Lymphadenektomie mit der Entfernung der Lymphknoten im kleinen Becken (Schmelz et al., 2014). Eine moderate, aber signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens kann mit einer platinhaltigen perioperativen Chemotherapie erreicht werden. Für die Wirksamkeit der Therapie ist der Einsatz von Cisplatin entscheidend, was die Möglichkeit der Anwendung auf Patienten mit guter Nierenfunktion und gutem Allgemeinzustand begrenzt. (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Mit einer neoadjuvanten Chemotherapie konnte lediglich eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von 45 % auf 50 % gezeigt werden, dieser Überlebensvorteil zeigte sich zudem nur bei cisplatinbasierter Therapien (Schmelz et al., 2014). Im metastasiertem Stadium ist die Erstlinientherapie eine Chemotherapie aus Gemcitabin und Cisplatin (Schmelz et al., 2014). In diesem Stadium liegt allerdings bei über 50 % der Patienten eine Kontraindikation gegen Cisplatin vor. In diesen Fällen wird auf eine carboplatinhaltige Chemotherapie zurückgegriffen, welche sich als weniger effektiv erwiesen hat, als die Therapie mit Cisplatin (Alfred Witjes et al., 2017). Aber auch unter Therapie mit Cisplatin

kann das mediane Gesamtüberleben lediglich von 6 auf 12-15 Monate gesteigert werden. Nur 3,7 % der Patienten sind 6 Jahre nach einer Chemotherapie tumorfrei (Schmelz et al., 2014). Bei den nicht metastasierten Urothelkarzinomen zeigt sich mit Beginn des muskulinvasiven Wachstums trotz der dargestellten Therapieoptionen eine deutliche Verschlechterung der Prognose mit fortschreitendem Wachstum. Nach radikaler Zystektomie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate von lokal begrenzten Tumoren (pTa, pT1, pT2) etwa 75 %, diese sinkt bei organüberschreitendem Wachstum (pT3, pT4) auf 50 %. Bei Lymphknotenbefall beläuft sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 25-50 %.

Neben der cisplatinhaltigen Chemotherapie, gibt es zudem neue Studienergebnisse, die die Wirksamkeit einer neuen Substanzklasse, den Antikörper-Wirkstoff Konjugaten belegen. Allen voran das Konjugat Enfortumab-Vedotin, welches an Nectin 4 bindet. Bei Nectin 4 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, welches in Urothelkarzinomzellen überexprimiert wird (Liu et al., 2021). In der Klinik wird es in Kombination mit dem PD-L1 Inhibitor Pembrolizumab eingesetzt, da sich in voraus gegangenen Studien eine verbesserte antitumorale Wirkung durch eine Kombination von beiden Wirkstoffen gezeigt hatte (O'Donnell et al., 2023). In der EV-302/KN39 Studie, deren Ergebnisse 2023 erstmals präsentiert wurde, wurde die Therapie mit Enfortumab-Vedotin mit Pembrolizumab mit der konventionellen Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin verglichen. Durch die Therapie mit Enfortumab-Vedotin konnte eine signifikante Steigerung des medianen Gesamtüberlebens auf 31,5 Monate erreicht werden, im Vergleich zu 16,1 Monaten bei der konventionellen Chemotherapie. In dieser Studie konnte zudem eine Steigerung der objektiven Ansprechrates von 44,4 % auf 67,7, % von Enfortumab-Vedotin mit Pembrolizumab im Vergleich zu konventioneller Chemotherapie mit Cisplatin, gezeigt werden (Powles, Valderrama, et al., 2024). In den Leitlinien der European Society for Medical Oncology wird Enfortumab-Vedotin mit Pembrolizumab als neuer Standard beim metastasierten Urothelkarzinom empfohlen (Powles, Bellmunt, et al., 2024). Eine weitere, zugelassene Erstlinientherapie ist eine Ergänzung der Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin um den PD-L1 Inhibitor Nivolumab. Die CheckMate-901 Studie verglich die Chemotherapie mit Cisplatin und Gemcitabin mit einer Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin plus Nivolumab. Es zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von 21,7 Monaten, im Vergleich zu 18,9 Monaten bei der alleinigen Chemotherapie (van der Heijden et al., 2023).

Langzeitdaten, die mit denen von konventioneller, cisplatinhaltiger Chemotherapie vergleichbar wären, liegen aufgrund der kurzen Zulassungszeit der neuen Therapie noch nicht vor.

Der Therapieerfolg des metastasierten Urothelkarzinoms ist limitiert durch die Resistenz der Tumorzellen gegen die Chemotherapie. Basierend auf den vorliegenden Langzeitdaten und der Analyse der bereits etablierten Therapie hat der Großteil der Patienten einen Tumorprogress nach leitliniengerechter Behandlung (Niegisch et al., 2018). In früheren Studien konnten Mechanismen identifiziert werden, durch die Tumorzellen dem durch Cisplatin induzierten Zellstress entgehen und dadurch eine Resistenz gegen die Chemotherapie entwickeln (Skowron et al., 2018). Bei der Entstehung von Chemoresistenzen wurde die zelluläre Plastizität von Urothelkarzinomzellen als ein zugrunde liegender Mechanismus erkannt (Hohn et al., 2016; Skowron et al., 2015). Diese zelluläre Plastizität wird in Tumorzellen durch eine Reihe von epigenetischen Modifikationen erreicht (Flavahan et al., 2017). Dieser Zusammenhang ist für die Therapie

des Urothelkarzinoms besonders bedeutsam, da dieses im Vergleich zu anderen Tumorarten besonders viele Veränderungen in epigenetischen Regulatorproteinen aufweist (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

1.1.1 Cisplatin

Eine Chemotherapie mit Cisplatin in Kombination mit anderen Zytostatika ist der Therapiestandard in der Behandlung von lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen, seit mehr als 30 Jahren (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020; von der Maase et al., 2005). Das Zytostatikum findet zudem Anwendung im Therapieregime zahlreicher weiterer solider Tumore (Bönisch, 2016). Cisplatin bewirkt Quervernetzungen der DNA. Intrazellulär werden die im Cisplatinmolekül enthaltenen Chloridgruppen durch Wasser ersetzt; dadurch entsteht ein Diaquaplatin-Komplex. Dieser Komplex ist sehr reaktiv und reagiert bevorzugt mit den N7-Atomen von Adenin und Guanin. Diese Reaktionen führen zur Bildung quervernetzter Platinkomplexe, die ein sterisches Hindernis für die DNA-Replikation und Transkription sowie die DNA-Reparatur darstellen. Zudem löst Cisplatin Punktmutationen aus (Bönisch, 2016; Freissmuth, 2016). Die Anwendung von Cisplatin in der Therapie des Urothelkarzinoms ist jedoch nicht bei jedem Patienten möglich, da eine Reihe dosislimitierender und therapielimitierender Nebenwirkungen bestehen. Zu den häufigen Nebenwirkungen zählen teils irreversible Nieren-, Nerven- und Hörschädigungen (Bönisch, 2016). Zum anderen wird die Wirksamkeit durch die Entwicklung einer Chemoresistenz limitiert. Während die initiale Therapie mit einer cisplatinhaltigen Chemotherapie häufig ein Ansprechen des Tumors auf die Therapie zur Folge hat, kommt es im Verlauf häufig zu einem erneuten Progress der Erkrankung. Dies ist auf die Entwicklung einer Resistenz gegen Cisplatin zurückzuführen. Die Resistenzmechanismen, die Tumorzellen gegen Cisplatin entwickeln können sind sehr vielfältig und lassen sich in vier Untergruppen unterteilen (Galluzzi et al., 2012):

1: Prozesse, die greifen, bevor Cisplatin an die DNA bindet, wird als „*pre-target* Resistenz“ bezeichnet. Hierunter versteht man eine Verringerung der Cisplatinkonzentration im Zytoplasma, beispielsweise durch eine erhöhte Expression von Plasmamembrantransportern, die das Cisplatin aus der Zelle transportieren (Galluzzi et al., 2012).

2: Die Reduktion der Empfindlichkeit von Krebszellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin, nachdem Cisplatin bereits an die DNA gebunden hat, wird als „*on-target* Resistenz“ bezeichnet. Diese kann erreicht werden durch eine Erhöhung der Reparaturkapazität für die durch Cisplatin ausgelösten DNA-Schäden. Hierbei ist besonders die Nukleotid-Exzisionsreparatur ein wichtiger Reparaturmechanismus. Auch konnte in BRCA-mutierten Mammakarzinom-Zellen eine Wiederherstellung der Funktionalität des homologen Rekombination-Reparaturweges (HRR) nachgewiesen werden. Diese Wiederherstellung hatte ebenfalls eine Cisplatin Resistenz zur Folge (Galluzzi et al., 2012).

3: Eine Veränderung des Signalweges, der normalerweise Apoptose aufgrund von DNA-Schädigung auslösen würde, wird als „*post-target* Resistenz“ bezeichnet. So kann die Zelle dem Zelltod durch Apoptose oder Nekrose entgehen. Dieser Mechanismus macht die Zelle nicht nur resistent gegen Cisplatin, sondern auch gegenüber allen Einflüssen, die DNA-Schäden auslösen, beispielsweise Bestrahlung (Galluzzi et al., 2014).

4. Es kann sich zudem eine „*off-target* Resistenz“ entwickeln. Hierunter versteht man die Induktion von Signalwegen, die die durch Cisplatin ausgelösten, für die Zelle tödlichen Signalwege kompensieren. Beispielhaft wäre das Onkogen *ERBB2* zu nennen, das häufig in Brust- und Ovarialkarzinomen überexprimiert ist (Galluzzi et al., 2012; Galluzzi et al., 2014).

In Urothelkarzinomzellen wurde ebenfalls eine Resistenz gegen Cisplatin festgestellt. Frühere Studien der Forschungsgruppe haben gezeigt, dass UCCs, die über einen längeren Zeitraum mit Cisplatin behandelt wurden, durch eine gesteigerte Expression von antiapoptotischen Faktoren der Apoptose entkommen konnten und gleichzeitig die durch Cisplatin verursachten DNA-Schäden reduzieren konnten (Skowron et al., 2018).

1.2 Epigenetik

Epigenetik bezeichnet Mechanismen der Genregulation, die nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz bedingt sind, sondern durch eine veränderte Genaktivität einzelner DNA-Abschnitte. Diese Veränderung der Genexpression wird durch verschiedene DNA-bezogene Regulationsmechanismen verursacht (Reinhold et al., 2018). Diese Veränderungen spielen bei der Entstehung von vielen Krebsarten, neben genetischen Mutationen, eine entscheidende Rolle (Tollefsbol, 2017). Da das Urothelkarzinom im Vergleich zu anderen Krebsarten eine besonders hohe Last an epigenetischen Veränderungen aufweist, bieten diese vielversprechende neue Therapieziele (Schulz et al., 2015). Die in der Entstehung des Urothelkarzinoms relevanten Mechanismen der epigenetischen Modifikationen werden im Folgenden dargestellt.

Ein bedeutsamer Mechanismus ist die Methylierung von DNA. Diese, durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysierte Reaktion führt zu einer Übertragung einer Methylgruppe auf Zytosine in bestimmten CpG-Dinukleotiden. Ob die Genexpression dadurch gesteigert oder gesenkt wird, hängt davon ab, welcher Abschnitt des Gens methyliert wird. Gehäufte Methylierungen im Promotorbereich wirken inhibitorisch auf die Gentranskription (Tollefsbol, 2017). Im Urothelkarzinom lässt sich über alle klinischen Stadien hinweg eine starke genomweite Hypomethylierung der DNA nachweisen, die vor allem repetitive Sequenzen betrifft (Niegisch et al., 2015). Ein weiterer in der Genese des Urothelkarzinoms relevanter Mechanismus ist die posttranslationale Modifikation von Histonen. Diese Modifikation geschieht über Methylierung und Acetylierung von Lysin am N-terminalen Ende der Histone (Reinhold et al., 2018). Diese Prozesse werden durch zwei verschiedene Enzymgruppen moduliert. Zum einen die *Writer*, die den Einbau von translationalen Modifikationen katalysieren. Das sind beispielsweise die Histon-Acetyltransferasen (HAT), die die Acetylierung von Histonen katalysieren, oder die Histonmethyltransferasen, welche zu einer zur Methylierung der Histone führen. Gegensätzlich wirken die *Eraser*-Enzyme wie die Histondeacetylasen (HDAC), die Acetylgruppen entfernen, oder die Histondemethylasen, die die Demethylierung der Histone katalysieren (Ferri et al., 2016; Niegisch et al., 2015). Die Acetylierung der Histone führt zu einer offenen Struktur des Chromatins und damit zu einer Aktivierung der Transkription (Li & Seto, 2016; Seto & Yoshida, 2014). Dieser Effekt wird durch epigenetische *Reader* vermittelt. Im Falle der Acetylierung von Histonen sind diese *Reader*-Proteine aus der Bromodomänen- und Extraterminal-Familie (BET-Familie). Diese BET-

Familie umfasst die Proteine BRD2, BRD3, BRD4 und das Hoden- und Ovarienspezifische BRDT (Donati et al., 2018). Diese Proteine erkennen und binden acetylierte Lysinreste und fördern die Transkription, bevorzugt in hyperacetylierten Histonregionen. Die BET-Proteine, insbesondere BRD4, bilden somit das Bindeglied zwischen den acetylierten Histonen und der Transkriptionsaktivierung (Donati et al., 2018). Das Protein BRD4 ist in einem Großteil der Urothelkarzinome überexprimiert (Yan et al., 2014). Wie die Acetylierung, beeinflusst auch die Methylierung der Histone die Genexpression. Ob eine Methylierung eine verstärkte oder verminderte Aktivität der Gene zur Folge hat, hängt von der Position des methylierten Lysinrestes ab (Reinhold et al., 2018). Im Urothelkarzinom kommt es häufig zur Mutation der Histondemethylase *UTX/KDM6A* und der Histonmethyltransferasen *MLL*, *MLL2* und *MLL 3* (Besaratinia et al., 2013).

Bei epigenetischen Veränderungen handelt es sich, anders als bei genetischen Veränderungen, um pharmakologisch reversible Vorgänge. Zugleich beeinflussen epigenetische Veränderungen global die Expression zahlreicher Gene. Diese Aspekte führen dazu, dass hier ein Ansatzpunkt für der pharmakologischen Krebstherapie liegt (Tollefsbol, 2017). In dieser Arbeit soll der Fokus besonders auf das BET-Protein BRD4 als aussichtsreicher Ansatz für eine Therapie gelegt werden.

1.2.1 Bromodomänen 4 Protein

Die Verbindung zwischen der Acetylierung von Histonen und der Transkription wird durch epigenetische *Reader* wie BRD4 hergestellt. BRD4 besteht aus zwei N-terminalen Tandem Bromodomänen (BD1 und BD2) und einer extraterminalen Domäne (ET); diese erkennen und binden acetyliertes Lysin an Histonen. Zudem weist BRD4 zusätzlich eine C-terminale Domäne auf, die mit dem positiven Transkriptions-Elongationsfaktor b (P-TEFb) interagiert. Auch kann BRD4 über die extraterminale Domäne mit weiteren Chromatinregulatoren interagieren, wie der Arginin-Demethylase *JMJD6* und der Lysin-Methyltransferase *NSD3* (Ferri et al., 2016; Letson & Padron, 2019). BRD4 wird ubiquitär exprimiert und ist essenziell in der Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Replikation (Wu & Chiang, 2007). Experimente mit *Knockout*-Mäusen belegen seine wesentliche Rolle in der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen (Wu & Chiang, 2007). Allerdings zeigte sich in Untersuchungen, dass BRD4 auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Malignomen spielt. Eine Dysregulation von BRD4 konnte in mehreren Krebsarten nachgewiesen werden. Auch in Gewebe von Urothelkarzinomen konnte eine erhöhte Expression von BRD4 im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden. Auch zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher *BRD4* Expression und *high-grade* Karzinomen bzw. Lymphknotenmetastasen (Wu et al., 2016).

In der Tumorzelle bewirkt BRD4 eine Aktivierung der Transkription von Onkogenen. Bei der Initiation der Transkription bindet BRD4 an hyperacetylierte Regionen des Chromatins und vermittelt dort die Bindung von regulatorischen Proteinen an die DNA, was zur Bindung und Stabilisierung von RNA-Polymerase II führt. BRD4 rekrutiert zudem P-TEFb, dieser aktiviert die RNA-Polymerase II und somit die Elongation. Über diese Förderung der Transkription kommt es zu der gesteigerten Expression von Onkogenen (Donati et al., 2018) (Bowry et al., 2018). Im Falle des Urothelkarzinoms konnte gezeigt werden, dass BRD4 zu einer vermehrten Expression von *cMYC* führt, einem Transkriptionsfaktor, der Zellwachstum und die Proliferation von Krebszellen fördert (Wu et al., 2016).

Über die Funktionen in der Transkriptionsregulation hinaus erfüllt BRD4 noch weitere Funktionen in Krebszellen. Es konnte gezeigt werden, dass BRD4 notwendig ist für die Reparatur von durch ionisierende Strahlung ausgelöste DNA-Doppelstrangbrüche (DSB). Eine Hemmung von BRD4 führte unter Zellkulturbedingungen zu einer Hemmung des Nichthomologes *End Joining* (NHEJ) (Li et al., 2018). Durch einen Doppelstrangbruch kommt es zu einer vermehrten Acetylierung von H4 (H4Ac), sowie zu einer Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX), was wiederum die Rekrutierung von BRD4 als Mediator für die Formation und Aktivierung des DNA-Reparaturkomplexes zur Folge hat (Donati et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über die Wirkung von BRD4 transkriptionsabhängige und transkriptionsunabhängige Prozesse vermittelt werden, die zur Entstehung und dem Fortschreiten von malignen Tumoren beitragen. Ergebnisse aus vorausgegangenen Untersuchungen legen zudem nahe, dass dieser Pathomechanismus auch im Urothelkarzinom eine wichtige Rolle spielt.

1.2.2 BET-Inhibitoren

Aufgrund der im vorherigen Kapitel dargestellten Funktion von BRD4 in der Expressionsregulation von Onkogenen, ist eine Hemmung von BRD4 ein vielversprechender Ansatz zur Therapie. Hierzu stehen verschiedene BET-Inhibitoren (BETi) zur Verfügung. Ein BETi bindet über Wasserstoffbrückenbindungen an die Bromodomänen des BET-Proteins und besetzt so die Bindungstasche für das acetylierte Lysin. Dadurch wird eine Interaktion zwischen den BET-Proteinen und den acetylierten Histonen verhindert (Letson & Padron, 2019).

Bei Wirkung von BETi in Krebszellen wird zwischen kanonischen Effekten, die über Beeinflussung der Transkription ihre Wirkung entfalten und nicht-kanonischen Effekten, die über die Transkriptionsregulation hinausgeht, unterschieden.

Die kanonischen Effekte wirken über eine Herunterregulation der Transkription in der Krebszelle. Durch die oben beschriebene Bindung des BETi an die Bindungstaschen kommt es zu einer Verdrängung der BET-Proteine von den Histonen. Die Lösung der Bindung der BET-Proteine aus dem Chromatin hat vermehrte Pausen der Transkription zur Folge, was zu einer stark verminderten Expression von Genen führt. Eine, der am besten untersuchten Expressionsvermindierungen in Krebszellen ist die verminderte Expression von *cMYC* nach BETi Behandlung. Auch *CDK6*, *IL7R* und *BCL2* sind in vielen Krebsarten nach Behandlung mit einem BETi vermindert exprimiert (Letson & Padron, 2019).

Bei der Untersuchung, warum BETi hauptsächlich in Krebszellen wirksam ist, während BRD4 auch in nicht-krebsartigen Zellen zur Genregulation beiträgt, könnten *Super-Enhancer* (SE) eine entscheidende Rolle spielen. SEs sind regulatorische Regionen, in denen eine hohe Dichte an Transkriptionsaktivatoren vorliegen. In Krebszellen finden sich SEs vermehrt an Onkogenen, dort sorgen sie für die Expression dieser und damit für die Aufrechterhaltung der Zelleigenschaften. Zudem zeigte sich eine starke Abhängigkeit der SEs von BRD4. Somit führt eine Inhibition von BRD4 zu einem Funktionsverlust der SEs und einer verminderten Expression der von den SEs abhängigen Onkogene (Pott & Lieb, 2015) (Donati et al., 2018).

Neben Verminderung der Expression von Onkogenen haben BETi noch weitere Effekte in Krebszellen, die über die Hemmung der Transkription hinausgehen. Die nicht-kanonische

Wirkung der BETi hat vor allem Auswirkungen auf die DNA-Reparatur von Zellen. Zum einen induziert die Behandlung mit BETi DNA-Schäden und reduziert gleichzeitig die DNA-Schadensantwort (DDS) der Zelle durch die Herunterregulation von Mediatoren der DDS (Donati et al., 2018; Sun et al., 2018). Unter DNA-Schadensantwort werden eine Vielzahl von zellulären Signalwegen und Mechanismen zusammengefasst, die Schäden an der DNA erkennen. Hierdurch kann die Reparatur der DNA induziert werden oder, wenn eine Reparatur nicht möglich ist, der Zelltod induziert werden (Lord & Ashworth, 2012; O'Connor, 2015). Über welchen Mechanismus genau BETi die DDS hemmen, ist jedoch je nach Tumorentität unterschiedlich (Letson & Padron, 2019). Auch hemmen BETi verschiedene Wege der DNA-Reparatur. In nicht *BRCA1/2*-mutiertem triple-negativem Brustkrebs führte die Behandlung mit JQ1, einem BETi der 1. Generation, zu einer verminderten Expression von *BRCA1* und *RAD51*, was zu einem Zustand der BRCAness in den Zellen führte und daraus resultierend zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen über HRR (Mio et al., 2019). In Zelllinien eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms führte eine Behandlung mit JQ1 zu einer Hemmung der NHEJ (Takashima et al., 2020).

Die oben beschriebenen Effekte konnten für die BETi der 1. Generation (z.B. JQ1, iBET762, OTX015) nachgewiesen werden. JQ1 ist einer der am besten charakterisierten BETi. JQ1 und andere BETi der 1. Generation zeigten in präklinischen Studien bereits antitumorale Aktivität in soliden und hämatologischen Malignomen (Ozer et al., 2018). In Urothelkarzinomzellen führt eine Behandlung mit JQ1 zu einer Hemmung der Proliferation sowie zu einer vermehrten Induktion von Apoptose und einem Zellzyklusarrest. Auch zeigte sich, dass die Wirksamkeit von JQ1 bei einer Überexpression von *BRD4* verbessert ist (Li et al., 2019; Wu et al., 2016). An Urothelkarzinom-Zelllinien haben sich bei der Einzelbehandlung mit JQ1 jedoch auch Limitationen gezeigt, wie eine stark unterschiedliche IC50-Konzentration, abhängig von der Zelllinie. Hier beliefen sich die Konzentrationen auf Werte zwischen 0,18 und 10 µM. Auch konnte nur eine limitierte Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Teilweise überwunden werden, konnten diese Limitationen durch eine Kombination von JQ1 mit dem HDACi Romidepsin (Hölscher et al., 2018).

Eine weitere Limitation der BETi der 1. Generation ist klinisch eine dosislimitierende gastrointestinale und hämatologische Toxizität sowie ein niedriger therapeutischer Index, was ihre Dosierung erschwert und die klinische Anwendbarkeit einschränkt (Ozer et al., 2018). Eine neuere Substanz mit einem verbesserten therapeutischen Index ist das in dieser Arbeit eingesetzte PLX51107 (im Folgenden abgekürzt als PLX), ein BETi der 2. Generation, der ein verbessertes pharmakologisches Wirkprofil aufweist (Ozer et al., 2018). Ozer et al. (2018) wiesen bereits einen antiproliferativen Effekt von PLX bei chronisch lymphatischer Leukämie nach, auch ein antitumoraler Effekt in Melanomzellen konnte gezeigt werden (Erkes et al., 2019). Eine Untersuchung der Effekte einer PLX-Behandlung auf Urothelkarzinomzellen ist jedoch noch ausstehend.

1.2.3 Histondeacetylasen

Die posttranslationale Acetylierung und Deacetylierung von Histonen beeinflusst die lokale Chromatinstruktur und spielt so eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation. Die Acetylierung findet an den N-terminalen Lysinresten der Histone statt und wird katalysiert

durch HATs. Durch die Acetylierung wird die DNA leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren und die Transkription wird hochreguliert. Die Deacetylierung von Histonen hat den gegenteiligen Effekt und wird katalysiert durch HDACs. Über diesen Mechanismus beeinflussen HDACs die Interaktion zwischen den positiv geladenen Histonen und der negativ geladenen DNA. Durch Abspaltung einer negativ geladenen Acetylgruppe vom Lysinrest der Histone kommt es zu einer verstärkten Bindung zwischen der DNA und den Histonen. Dadurch wird die DNA schwerer zugänglich für Transkriptionsfaktoren, was zu einer Unterdrückung der Transkription führt, (de Ruijter et al., 2003; Witt et al., 2009). Neben den Histonen katalysieren HDACs auch die Deacetylierung von Nicht-Histon-Proteinen wie p53, E2Fs, GATA1, Bcl-6, Stat3, HMGs, HSP90, NF- κ B, Tubulin, Importin und β -Catenin. Beispielsweise verringert die Deacetylierung von p53 durch HDAC1 die Stabilität und die Interaktion des Proteins mit der DNA. Somit können HDACs, über die epigenetische Modifikation hinaus, zelluläre Prozesse wie Transkription, Apoptose und den Zellzyklus regulieren (Witt et al., 2009).

Aus der HDAC-Enzym-Familie sind bisher 18 Enzyme bekannt, die in 4 Klassen eingeteilt werden. Klasse I und II gehören zu den „klassischen“ HDACs; ihnen ist gemein, dass sie eine Bindungstasche mit einem Zink Ion aufweisen und auf Zink als Cofaktor angewiesen sind. HDACs der Klasse III werden als Sirtuine bezeichnet und benötigen nicht Zink, sondern NAD⁺ als Cofaktor. Die Klasse IV umfasst ausschließlich HDAC11, die sowohl strukturelle Ähnlichkeit zur Klasse I wie auch zur Klasse II aufweist (Rikiishi, 2011; Witt et al., 2009). Die einzelnen Enzymklassen unterscheiden sich durch ihre Lokalisation und Funktion. Klasse I umfasst HDAC 1, 2, 3 und 8; diese werden ubiquitär in fast allen Zelltypen exprimiert. HDACs der Klasse I sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert und wesentlich für die epigenetische Regulation der Genexpression. Auch interagieren die HDACs neben den Histonen mit weiteren Substraten wie z.B. Transkriptionsfaktoren (Li & Zhu, 2014). Die Klasse II ist unterteilt in Klasse IIa, zu der HDAC4, 5, 7, und 9 gehören, und Klasse IIb, die HDAC6 und 10 umfasst. Diese HDACs sind sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma lokalisiert und bewirken neben der Regulation der Transkription auch die Regulation von zytoplasmatischen Proteinen für beispielsweise Zellmotilität, Adhäsion und Chaperonfunktion (Fischle et al., 2002; Li & Zhu, 2014; Witt et al., 2009). Im Gegensatz zu Klasse I HDACs ist die Expression von Klasse IIa HDACs gewebespezifisch. HDAC4 wird stark im Gewebe des Kolons, der Hoden, der Ovarien und der Harnblase exprimiert, während HDAC5 in der Retina und den B-Zellen vorkommt, HDAC7 in verschiedenen Immunzellen exprimiert wird und HDAC9 auf einem niedrigen Niveau ubiquitär vorhanden ist (Kaletsch et al., 2018). Die HDACs der Klasse III haben hauptsächlich eine regulatorische Funktion des Metabolismus und der Seneszenz von Zellen. Bei einigen HDACs aus dieser Gruppe kann nur eine geringe oder keine Deacetylaseaktivität gegenüber Histonen nachgewiesen werden (Li & Zhu, 2014).

Eine Dysregulation bzw. Überexpression von HDACs ist in vielen verschiedenen Tumorentitäten nachweisbar und dort mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Vor allem HDACs der Klasse I und II scheinen an der Pathogenese von Tumoren beteiligt zu sein (Rikiishi, 2011).

1.2.4 HDAC-Inhibitoren

Zur pharmakologischen Hemmung von HDACs, werden HDAC-Inhibitoren (HDACi) eingesetzt. In den letzten Jahren hat sich der Einsatz von HDACi in der Therapie verschiedener Tumorentitäten als wirkungsvoll herausgestellt (Bolden et al., 2006). HDAC-Inhibitoren bestehen aus einer *zinc binding group* (ZBG) und einer *Cap*; diese sind über einen *Linker* miteinander verbunden. Über die ZBG wird Zink im aktiven Zentrum der HDACs gebunden und die Aktivität der HDACs so inhibiert.

Die HDAC-Inhibitoren lassen sich pharmakologisch in vier Gruppen unterteilen. Diese Einteilung erfolgt auf Basis der chemischen Struktur der ZBG. Die ZBG kann aus Hydroxamsäure, Benzamiden, Carbonsäuren oder zyklische Tetrapeptiden bestehen (Ramaiah et al., 2021; Zhang et al., 2018). Diese Struktur bestimmt die Isoenzympezifität der jeweiligen HDACi. Hydroxamsäure und Pyroxamsäure sind unspezifische, panHDACi, das bedeutet, dass sie HDACs der Klasse I, II und IV inhibieren. Carbonsäuren, Benzamine und zyklische Tetrapeptide sind dagegen Klasse I-spezifische HDACi (Rikiishi, 2011). Auch Nicht-Histon-Proteine, wie die Transkriptionsfaktoren p53 und E2F oder andere Proteine, wie α -Tubulin, Ku70 oder das Hitzeschockprotein 90 werden durch HDACi beeinflusst. Dieser Effekt wurde bislang nur bei der Gruppe der Hydroxamsäure HDACi nachgewiesen. Durch diese Acetylierung wird die Genexpression bestimmter Gene beeinflusst. Im Falle der Histone bewirkt diese Acetylierung eine offene Chromatinstruktur, was zu einer gesteigerten Transkription von insbesondere Tumorsuppressorgenen führt. Im Falle der Nicht-Histon-Proteine kommt es durch die Acetylierung zu einer gesteigerten Aktivität, was zur Transkriptionssteigerung führt, aber auch andere biologische Effekte wie Apoptose und Zellzyklusarrest zur Folge hat (Bolden et al., 2006; Xu et al., 2007). Die Wirkung von HDACi auf Krebszellen hängt davon ab, welches HDAC Isoenzym inhibiert wird und kann zur Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest, mitotischen Zelltod sowie Zelltod durch Autophagie und ROS-Induktion führen. (Bolden et al., 2006; Witt et al., 2009; Xu et al., 2007). Weiterführend konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Tumorzellen deutlich empfindlicher auf die Behandlung mit einem HDACi reagieren als normale Zellen. (Bolden et al., 2006).

Urothelkarzinomzellen (UCCs) wiesen variable Veränderungen der HDAC-Expression auf. HDAC4, die in normalem Urothelgewebe stark exprimiert wird, zeigt sich im Urothelkarzinom, abhängig von der Zelllinie und der Untersuchung, mal stark vermindert und mal erhöht (Kaletsch et al., 2018). Auch HDAC5 und 7 mRNA wurden bei Untersuchung der Arbeitsgruppe in 15 von 18 UCCs vermindert exprimiert, wohingegen HDAC2 und 8 mRNA in 11 von 18 UCCs vermehrt nachweisbar waren (Niegisch et al., 2013). Durch eine hohe Zahl von Mutationen in Chromatin regulierenden Genen sind Inhibitoren epigenetischer Enzyme, speziell HDACi, ein vielversprechender Therapieansatz in der Behandlung des Urothelkarzinom (Giannopoulou et al., 2019). Bei der Behandlung von UCCs haben sich panHDACi allerdings als weniger effektiv erwiesen, sodass selektive HDACi als Behandlungsoption aussichtsreicher scheinen (Niegisch et al., 2013; Pinkerneil et al., 2016). Bei den Untersuchungen von Pinkerneil et al. [2016, 2017] zu der Wirkung von selektiven HDACi auf UCCs, zeigte sich, dass der antineoplastische Effekt bei Klasse I-selektiven HDACi besonders günstig ist, während HDACi, die vornehmlich HDAC4 und 5 hemmen, keinen ausreichenden anti-neoplastischen Effekt zeigten. Unter Beachtung dieser Ergebnisse wird im Zuge dieser Arbeit der HDACi Romidepsin verwendet, der selektiv die Klasse I HDACs hemmt. Romidepsin ist in den USA bereits zur Behandlung des

kutanen T-Zell Lymphoms zugelassen (Zhang et al., 2018). Bei Romidepsin handelt es sich um einen selektiven HDACi, der HDAC1 und 2 inhibiert mit einem zyklischen Tetrapeptid als ZBG. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erwies sich Romidepsin im Vergleich zu weiteren Klasse I-selektiven Inhibitoren als am wirkungsvollsten bei der Induktion von Zellzyklusarrest und Zelltod (Pinkerneil et al., 2016). Auch konnten synergistische Effekte zwischen Romidepsin und dem BETi JQ1 nachgewiesen werden. Bei einer Kombinationstherapie mit den beiden Wirkstoffen kommt es zu einer signifikanten Synergie bei der Apoptose in UCCs, nicht aber in den benignen Zellen (Hölscher et al., 2018). Diese Möglichkeit einer Kombinationstherapie mit einem BETi soll in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

1.2.5 TW09

Bei dem Wirkstoff TW09 handelt es sich um einen kombinierten epigenetischen Inhibitor, der eine Zusammensetzung aus dem BETi JQ1 und dem Klasse I HDACi CI994 darstellt. TW09 zeigte in Voruntersuchungen sowohl die Wirksamkeit von BETi wie auch von HDACi und hemmte im Pankreaskarzinom die Zellproliferation effektiver als eine Kombinationsbehandlung der Einzelwirkstoffe JQ1 und CI994 (Zhang et al., 2020). Die synergistische Wirkung von BETi und HDACi in UCCs wurde bereits in den vorherigen Kapiteln besprochen. Weiterhin konnte durch Zhang et al. [2020] eine synergistische Wirkung bei der Kombination von TW09 mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine gezeigt werden. Diese Daten dienen als Grundlage für die Erprobung neuer Kombinationstherapien für das Urothelkarzinom.

1.3 DNA-Reparaturmechanismen

Doppelstrangbrüche der DNA können beispielsweise durch Bestrahlung, durch bestimmte Chemikalien oder endogen durch einen Bruch der Replikationsgabel entstehen (Arnemann, 2019). Doppelstrangbrüche werden über zwei verschiedene Reparaturmechanismen repariert: Die HRR und das NHEJ (Koch et al., 2014).

1.3.1 Homologe Rekombination

Bei dieser Reparatur dient das homologe Chromosom als Matrize für die Reparatur, sodass eine fehlerfreie Behebung des DSB möglich ist. Da ein homologes Chromosom benötigt wird, ist diese Art der Reparatur nur bei diploiden Zellen möglich. Nach der Erkennung des Doppelstrangbruches erfolgt die Verdauung des freien DNA-Doppelstranges durch MRE11-Endonukleaseaktivität, sodass es zu einem kurzen Einzelstrangbereich kommt. Dieser Einzelstrang wird durch das Protein RPA stabilisiert. Anschließend bindet RAD51 an diesen Bereich und bewirkt zusammen mit RAD52 und RAD54 eine Inversion der DNA in das intakte Schwesterchromatid; mit diesem als Matrize erfolgt die Neusynthese des fehlenden DNA-Stückes durch die DNA-Polymerase (Koch et al., 2014; Taubmann, 2015). Das Protein *BRCA 2* belädt die DNA mit RAD51 und ist ein wichtiger Faktor in der HRR. Auch *BRCA 1* begünstigt die HRR und ist zudem an der Zellzyklus-*Checkpoint*-Kontrolle und dem G2/M-*Checkpoint*-Arrest bei Zellen mit DNA-Schädigung beteiligt. *BRCA1/2* stellen somit wichtige Faktoren zu Erhaltung der Genomstabilität dar (Brandt & Petrides, 2014).

1.3.2 Nicht homologes End Joining

Das NHEJ ist fehleranfälliger als die HRR, da bei diesem Mechanismus keine homologe Sequenz als Vorlage dient, was aber auch bedeutet, dass dieser Mechanismus auch verfügbar ist, wenn keine homologe Sequenz vorliegt. Bei dieser Reparatur werden die freien Enden zweier DNA-Fragmente miteinander verknüpft. Dazu bindet der heterodimere Komplex KU80/KU70 an die freien DNA-Enden und bildet einen Komplex mit der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PK. Dieser Komplex prozessiert die DNA-Enden und macht diese zugänglich. Anschließend erfolgt eine Verbindung der DNA-Fragmente über die DNA-Ligase 4 und das XRCC-4 Protein (Koch et al., 2014; Taubmann, 2015). Im Vergleich zur HRR ist dieser Mechanismus anfälliger für die Einführung von Mutationen in die DNA (Lord & Ashworth, 2016). Das NHEJ ist stark von dem Protein KU80 abhängig, beim Fehlen dieses Komplexes erfolgt die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den *PARP1* abhängigen Mechanismus des *Alternative End-Joining* (Alt-EJ-Weg).

1.3.3 Alternative End-Joining

Der Alt-EJ-Weg stellt einen Reparaturweg dar, auf den die Zelle im Falle eines Verlustes von NHEJ-Schlüsselproteinen, beispielsweise KU80, zurückgreift. Insgesamt ist der Alt-EJ-Weg deutlich langsamer und anfälliger für Mutationen als die klassische NHEJ (Chang et al., 2017; Mansour et al., 2010). Bei dem Alt-EJ-Weg wird der Doppelstrangbruch über *PARP1* erkannt, hierdurch werden die Proteine MRN/CtIP aktiviert, die die freien Enden der DNA reseziert, sodass eine Mikrohomologie in den DNA-Strängen entsteht. Anhand der Mikrohomologie zwischen den DNA-Strängen, werden diese ausgerichtet und das freie 3' Ende über die Nukleasen ERCC1/XPF verdaut. Anschließend erfolgt die *PolQ* vermittelte DNA-Synthese und die Verbindung der Stränge mittels DNA-Ligase (Caracciolo et al., 2021). Der alt-EJ-Weg läuft *PARP1* anhängig ab, durch eine Hemmung von *PARP1*, wird in der Folge auch der alt-EJ-Weg gehemmt (Mansour et al., 2010).

1.3.4 PARP-Inhibitoren und BRCAness

PARPi wirken über die Hemmung der Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 und 2 (*PARP*). Hierbei handelt es sich um die wichtigsten Vertreter der *PARP*-Enzymfamilie, die insgesamt aus 17 Enzymen besteht. *PARP1* stellt einen wichtigen Faktor in der Erkennung von Doppel- und Einzelstrangbrüchen der DNA dar. Es bindet an DNA-Schäden und katalysiert dort die Bildung von ADP-Ribose Ketten, was zur Aktivierung der DNA-Reparatur führt. *PARPi* zeigten sich sehr effektiv in der Behandlung von Tumoren mit einer HRR-Defizienz. Es gibt verschiedene Mechanismen über die *PARPi* Tumorzellen mit einer HRR-Defizienz abtöten können. Zum einen ist hier das Konzept der „*synthetic lethality*“ zu nennen. Dieses Konzept besagt, dass zwei Genmutationen zum Zelltod führen können, wenn diese gemeinsam auftreten, auch wenn eine der beiden Genmutation allein nicht zum Zelltod geführt hätten (Klinakis et al., 2020). Konkret heißt das, dass der *PARPi* die Reparatur von Einzelstrangbrüchen hemmt, da diese über eine Basen-Excisionreparatur, *PARP1* abhängig ablaufen (D'Andrea, 2018; Grundy & Parsons, 2020). Bei ausbleibender Reparatur entwickeln sich aus diesen Einzelstrangbrüchen bei Replikation der Zelle Doppelstrangbrüche; diese können in einer Zelle mit intakter HRR effektiv repariert werden. Bei fehlender HRR akkumulieren die DNA-Schäden allerdings, was eine genomische Instabilität und letztlich den Zelltod zur Folge hat (Helleday et al., 2005; Pommier et al., 2016).

Ein weiterer Mechanismus ist das „*PARP Trapping*“, hierbei schließt der PARPi das ans Chromatin gebundene PARP1-Enzym ein, sodass sich dieses nicht mehr vom Chromatin lösen kann. Durch diesen Mechanismus werden Doppelstrangbrüche der DNA verursacht, für deren Reparatur die HRR nötig wäre (D'Andrea, 2018). Das Potenzial zum „*PARP Trapping*“ unterscheidet sich hierbei je nach eingesetztem PARPi (Murai et al., 2012). Auch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen über den Alt-EJ-Weg sind *PARP1* abhängig und werden von PARPi blockiert. (D'Andrea, 2018).

Dass eine alleinige Inhibition von PARP1 nicht letal für die Zelle ist, konnte anhand von *PARP1 Knockout*-Mäusen gezeigt werden. Diese sind lebensfähig und zeigen keine verstärkte Tendenz zur Entwicklung von Tumoren. In den Zellen dieser Mäuse konnte zudem eine erhöhte Aktivität der HRR festgestellt werden. In Abwesenheit von PARP1 sind Zellen folglich stärker auf HRR als Reparaturmechanismus angewiesen (Helleday et al., 2005). Wenn durch eine Mutation von *BRCA1/2* dieser Reparaturmechanismus nicht funktioniert, dann führt das zu einer Akkumulation von DNA-Schäden in der Zelle und in der Folge zu Zelltod. Dieser Mechanismus lässt sich auch umgekehrt betrachten. Bei einer schon bestehenden *BRCA1/2* Mutation der Zelle kommt es zu einem Verlust der HRR als Reparaturweg für DNA-Schäden, da *BRCA1* und *BRCA2* von entscheidender Bedeutung hierfür sind. Dieser Zustand wird als BRCAness bezeichnet (Byrum et al., 2019; Lord & Ashworth, 2016).

Der, in den Experimenten zu dieser Arbeit eingesetzte PARPi Talazoparib, ist ein hoch potenter PARPi mit starker Trapping-Aktivität, der zur Behandlung von Brustkrebs mit einer *BRCA1/2* Mutation zugelassen ist. Zudem ist Talazoparib in Kombination mit dem antiandrogeneren Wirkstoff Enzalutamid für die Behandlung des kastrationsrefraktären, metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen (European Medicines Agency, 2019). Wenn eine *BRCA 1/ 2* Mutation nachgewiesen, ist der PARPi Olaparib beim Prostatakarzinom auch als Monotherapie zugelassen (European Medicines Agency, 2024). In der Zulassungsstudie PROfound wurde die Monotherapie mit Olaparib mit der leitliniengerechten Therapie mit den antiandrogeneren Wirkstoffen Abiraterone oder Enzalutamid verglichen. In der Gruppe, die mit Olaparib behandelt wurde, zeigte sich ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben, im Vergleich zur Kontrollgruppe (7,4 vs. 3,6 Monate), auch zeigte sich eine Verbesserung der objektiven Ansprechrates von 2 % auf 33 % in der Gruppe mit der Olaparibbehandlung und des medianen Gesamtüberlebens auf 19,1 vs. 14,7 Monate. Diese Vorteile konnten jedoch nur in der Patientenkohorte nachgewiesen werden, die eine gesicherte Veränderung der Gene *BRCA1*, *BRCA2* oder *ATM* hatte. Für die Kohorte, die keine Veränderung in diesen Genen aufwies, war kein Vorteil durch die Behandlung mit Olaparib nachweisbar (de Bono et al., 2020; Hussain et al., 2020). Ähnliche Ergebnisse hat die Studie TALAPRO-2, die die Kombinationstherapie aus Talazoparib und Enzalutamid mit der Behandlung mit Enzalutamid und einem Placebo vergleicht. Hier konnte ein Vorteil in Hinblick auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben in der Kohorte, die mit Talazoparib behandelt wurde, gezeigt werden. Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass die Daten zum Langzeitüberleben noch vorläufig sind und noch keine endgültige Aussage zur Verbesserung des Gesamtüberlebens getroffen werden kann. Basierend auf diesen Daten, erfolgte jedoch die Zulassung der Wirkstoffkombination in den USA und Europa (Agarwal et al., 2023).

Zu der Anwendung von PARPi zur Behandlung von fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen gibt es bisher weniger Daten. Ein im Jahr 2023 erschienenes Review, gibt einen Überblick über die bisher vorliegenden Daten über die klinische Wirksamkeit von

PARPi im metastasierten Urothelkarzinom. Das Review inkludierte 3 randomisierte, kontrollierte Studien. In einer unselektierten Patientengruppe ergab sich aus der Behandlung der Patienten mit PARPi kein Überlebensvorteil. In zwei Studien, konnte jedoch ein Vorteil im progressionsfreien Überleben durch PARPi- Therapie gezeigt werden, und zwar in einer Subgruppe von Patienten, die somatische Defekte der DNA-Reparatur aufwiesen (Crabb et al., 2023).

BRCAness, die sich in einigen Tumoren aufgrund einer Keimbahnmutation zeigt, scheint eine entscheidende Voraussetzung für eine wirksame Behandlung mit PARPi zu sein. Es wäre theoretisch möglich, die Wirksamkeit von PARPi bei Tumoren ohne BRCA1/2-Mutationen oder bei Tumoren mit PARPi-Resistenzen durch eine medikamentöse Induktion von BRCAness zu verbessern. Ein HRR-Defizit kann zum Beispiel durch BETi erzeugt werden. Es wurde auch festgestellt, dass PARPi und BETi in verschiedenen Krebszelllinien synergistisch wirken (Sun et al., 2018). Durch eine Kombinationstherapie mit einem BETi könnte somit die Anwendung von PARPi bei Tumoren ohne BRCA1/2-Mutationen, wie dem Urothelkarzinom, ermöglicht werden.

1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der Vielzahl von epigenetischen Veränderungen in Urothelkarzinomen, stellen diese ein erfolgversprechendes Therapieziel dar. In Vorarbeiten hat der HDACi Romidepsin bereits gute antiproliferative Wirkungen in UCCs gezeigt (Pinkerneil et al., 2016). Auch BET-Proteine, insbesondere BRD4, haben sich als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von Urothelkarzinomen herausgestellt (Li et al., 2019; Wu et al., 2016). In der Literatur gibt es zudem viele Hinweise darauf, dass eine Behandlung mit einem epigenetischen Inhibitor Karzinomzellen für die Behandlung mit einem Zytostatikum oder einem PARPi sensitivieren kann, (Mio et al., 2019; Sun et al., 2018; Yang et al., 2017). Ziel dieser Arbeit war es zum einen die Wirkung des *next-generation* BETi PLX51107 auf UCCs genau zu charakterisieren und basierend auf den Ergebnissen potenziell synergistisch wirkende Kombinationsbehandlungen abzuleiten, diese zu untersuchen und erfolgsversprechende Kombinationen für die Behandlung herauszuarbeiten.

Für diese Arbeit wurden zwei Zellreihen von Urothelkarzinomen verwendet und eine Zelllinie aus immortalisierten Urothelzellen als Kontrolle. Begonnen wurde zunächst mit der Charakterisierung der zellulären und molekularen Wirkung von PLX auf die Ziellinien sowie mit einer Transkriptom-Analyse mittels RNAseq nach einer Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin. Anschließend erfolgte die Validierung der Daten mittels RT-qPCR und Western Blot. Basierend auf diesen Daten konnten geeignete Kombinationspartner für die anschließenden Behandlungen mit Wirkstoffkombinationen abgeleitet werden.

Im nächsten Schritt wurde die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlungen geprüft. Kombiniert wurden hierfür die epigenetischen Inhibitoren PLX oder Romidepsin jeweils mit dem PARPi Talazoparib oder mit dem Zytostatikum Cisplatin. Zur Bestimmung der Effektivität dieser Behandlungen wurden MTT-Assays durchgeführt, anhand derer man die Viabilität der Zellen nach der Behandlung prüfen kann. Zum tiefergehenden Verständnis über die Wirkungsweise der Behandlungen wurde nach Kombinations- und Einzelbehandlungen FACS-Analysen durchgeführt, die die Zellzyklusregulation und Apoptose nach den einzelnen Behandlungen genauer abbilden. Die Wirkung der Behandlungen auf die Langzeitproliferation über zwei Wochen wurde mittels Klonogenitätstest ermittelt. Abschließend wurde untersucht, ob die Effektivität der Behandlung durch eine sequenzielle Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen im Vergleich zu einer simultanen Behandlung verbessert wird.

Es wurde angestrebt auf Grundlage dieser Daten, eine Aussage darüber zu treffen welche Substanzkombinationen einen vielversprechenden Therapieansatz für das Urothelkarzinom darstellen könnten, die zukünftig genauer untersucht werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind Alter und Geschlecht des Spenders (M: männlich, W: weiblich), Herkunft und die Literaturreferenz

Zelllinie	Geschlecht, Alter [Jahren]	Herkunft	Referenz
VM-CUB1	M	Harnblase, Primärtumor	Willams et al. 1980
UM-UC-3	M	Harnblase, Primärtumor	Grossmann et al. 1986
HBLAK	M, 80	Harnleiter, spontan immortalisiert	Hoffmann et al. 2016

In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerzielle Zelllinien verwendet. Die Zelllinien VM-CUB1 und UM-UC-3 wurden von Dr. B. Grossmann (*MD Anderson Cancer Center*, Houston, Texas, USA) und der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zelllinie HBLAK stammt von der Firma CELLnTEC (Schweiz).

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2: Materialien für die Zellkultur

Material	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad
CnT-Prime Epithelzellkulturmedium	CELLnTEC
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	GIBCO
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Essigsäure (100%)	Sigma-Aldrich
Falconröhrchen (15ml,50ml)	Greiner bio-one
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom/MERCK

Glas-Pasteurpipetten	Brand
Kollagen IV	Sigma-Aldrich
Mehrfachdispenser	Eppendorf
Mehrfachdispenser-Pipetten (1, 5, 10ml)	Eppendorf
Mikroskope Ts2, TE2000-S	Nikon Eclipse
Multikanalpipette	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann
Reagent reservoir	Costar
Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %)	GIBCO
Zählkammer	BioRad
Zellkulturflaschen (T25) für fortgeschrittene Gewebekulturen	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-,6-Well)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-Well) für fortgeschrittene Gewebekulturen	Greiner bio-one
Zentrifuge 5810	Eppendorf

2.1.3 Zellkulturmedien

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Zusammensetzung Medium
HBLAK	CnT-Prime Epithelzellkulturmedium
VM-CUM1, UM-UC-3	DMEM+GlutaMAXX + 10% hitzeinaktiviertes FCS

2.1.4 Substanzen für die Behandlung von Zellen

Tabelle 4: Verwendete pharmakologische Substanzen

Substanz	Hersteller	Lösungsmittel
----------	------------	---------------

Cisplatin	HEXAL AG	H ₂ O
Gemcitabine	Selleckchem	DMSO
PLX51107 (PLX)	Selleckchem	DMSO
Romidepsin	Selleckchem	DMSO
Talazoparib/ BMN 673	Cayman/ Biomol	DMSO
TW09	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Knapp (Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt)	DMSO

2.1.5 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden zwei verschiedene molekularbiologische Kits verwendet und der RNA-Gehalt der isolierten Probe mittels Nanodrop bestimmt.

Tabelle 5: Materialien für die RNA-Isolation

Material	Hersteller
Fast Gene RNA Premium Kit	Nippon
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase free water	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen

2.1.6 Proteinextraktion

Tabelle 6: Materialien für die Proteinextraktion

Material	Hersteller
Phosphat-buffert saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Cell scraper	Sarstedt
Kühlzentrifuge	Beckman

Allegra™ 21R Centrifuge	
Rüttelplatte	IKA Labortechnik
RIPA-Puffer	Siehe Tabelle 7

Tabelle 7: Chemikalien RIPA-Puffer

Sodium Deoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	VWR Chemicals
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Der RIPA-Puffer wurde aus 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 %, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM hergestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden noch jeweils 1 % Phosphatase- und Proteaseinhibitor zugegeben.

2.1.7 BCA-Protein Assay

Tabelle 8: Materialien für den BCA-Protein Assay

Material	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH
Falconröhrchen 50ml	Greiner bio-one
iMark™ Microplate reader	BioRad
Pierce™ BCA™ Protein Assay Reagent A/B	Thermo Scientific
RIPA-Puffer	Siehe 2.1.6
Zellkulturplatten (96-Well)	Greiner bio-one

2.1.8 SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 9: Materialien SDS-PAGE und Western Blot

Bovines Serum Albumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH
ChemiDoc™ Imaging System Version 2.3.0.07	BioRad
Clarity Max™ Western ECL Substrate	BioRad
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad
Immobilon®-P Transfer Membranes	MERCK
Methanol	VWR Chemicals
Milchpulver	CARL ROTH GmbH+Co KG
Mini-PROTEAN Tetra Cell (mit Kammer, Deckel, Elektrodenzubehör und Kompanion Laufmodul)	BioRad
PowerPac 200 Netzteil	BioRad
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder #26616	Thermo Scientific
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad
Whatman™ Gel Blot Paper	GE Healthcare
Roti®-Load 4x	CARL ROTH GmbH+Co KG

Tabelle 10: Chemikalien für die Puffer und Polyacrylamidgele

10x Tris/ Glycin Puffer	BioRad
10x Tris/ Glycin/ SDS Puffer	BioRad
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck
Methanol	VWR Chemicals
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Polyacrylamid (PAA)	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck

Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Merck
Tween 20	Sigma-Aldrich

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer. Alle Puffer wurden mit Wasser angesetzt, das mit der Q-Gard® 2 Anlage von Milipore aufbereitet wurde

SDS-Page Laufpuffer	10 % Tris/Glycin/SDS Puffer
Stripping	1,5 % Glycin, 0,1 % SDS, 1 % Tween 20 mit HCl auf pH 2,2 einstellen
TBS-Puffer (10x)	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris mit HCl auf pH 7,6 einstellen
TBS-T-Puffer (1x)	10 % TBS-Puffer (10x), 0,1 % Tween
Western Blotting Puffer	10 % Tris/ Glycin Puffer, 20 % Methanol

Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper. Alle Blocking-Puffer wurden mit TBS-T angesetzt.

Antikörper	Hersteller	Blocking-Puffer	Konzentration	Katalognummer
Anti-cleaved Parp	Cell Signaling	5 % Milchpulver	1:1000	9541S
Anti-Cyclin B1	Santa Cruz	5 % BSA	1:1000	SC-752
Anti-phospho-Histone H2A.X S139	Cell Signaling	5 % BSA	1:1000	2577S
Anti-RAD51	Millipore	5 % Milchpulver	1:2000	ABE257
Anti-total Parp	Cell Signaling	5 % Milchpulver	1:2000	9532S
Anti-β Actin	Sigma-Aldrich	5 % Milchpulver	1:10000	A5441

Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper. Alle Blockingpuffer wurden mit TBS-T angesetzt.

Antikörper	Hersteller	Blocking-Puffer	Konzentration	Katalognummer
Polyclonal Goat Anti-rabbit IgG	Dako	1 %ige Milch 1 %iges BSA	1:2000	P0448

Polyclonal Rabbit Anti-mouse IgG	Dako	1 %ige Milch	1:1000	P0260
----------------------------------	------	--------------	--------	-------

2.1.9 Quantitative Echtzeit-PCR

Tabelle 14: Material für die quantitative Echtzeit-PCR.

Material	Hersteller
Ampuwa®	Frisenius Kabi
C1000 Touch Thermal Cycler CFX384™ Real-Time System	BioRad
Frame Star® 384 Well Skirted PCR Plates Plus qPCR	4titude UK
LightCycler®480 Sealing Foil	Roche
LightCycler® 96	Roche
Luna® universal qPCR Master Mix	New England BioLabs® Inc
Multiwellplatte 96	Roche
PCR Tubes	Eppendorf
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf

Tabelle 15: Verwendete Primer

Gen	Sequenz 5'-3'	T _{annealing} in °C
TBP	Fwd: GAGCCAAGAGTGAAGAACAGTC Rev: GCTCCCCACCATATTCTGAATCT	60
BRCA1	Fwd: AAAGGGCCTTCACAGTGTCC Rev: CCTGTGTCAAGCTGAAAAGCA	60
BRCA2	Fwd: GGAGCTGAGGTGGATCCTGA Rev: CATGAGGAAATACAGTTTCAGATGCTT	60
ATR	Fwd: CAGCTTTGTGCCATTTACTG Rev: CTACCTCAATTCCAAGCACA	60
CHK1	Fwd: ATATGAAGCGTGCCGTAGACT Rev: TGCCTATGTCTGGCTCTATTCTG	60
ATM	Fwd: TGGATCCAGCTATTTGGTTTGA Rev: CCAAGTATGTAACCAACAATAGAAGAAGTAG	60

RAD51	Fwd: CAACCCATTTACGGTTAGAGC Rev: GGGAGCTTGAAGACGATCAG	60
RAD17	Fwd: CCTGGATGTGGAAAGACAACG Rev: TCCCAGGTTCAAGCACAGTA	60
cMYC	Fwd: CAGCTGCTTAGACGCTGGATT Rev:GTAGAAATACGCTGCACCGA	60
MCL1	Fwd: GAGACCTTACGACGGGTTGG Rev: GTTACGCCGTCGCTGAAAAC	60
GADD45A	Fwd: TCAGCGCACGATCACTGTC Rev: CCAGCAGGCACAACACCAC	60
GADD45B	Fwd: GTCGGCCAAGTTGATGAAT Rev: CACGATGTTGATGTCGTTGT	60
CCNB1	Fwd: AGCTGCTGCCTGGTGAAGAG Rev: GCCATGTTGATCTTCGCCTTA	60
FAS	Fwd: AGCTTGGTCTAGAGTGAAA Rev: GAGGCAGAATCATGAGATAT	60
CCNB2	Fwd: CCGACGGTGTCCAGTGATTT Rev: TGTTGTTTTGGTGGGTTGAACT	60
CDK9 Iso1	Fwd: GATGCTGCTTAACGGCCTCT Rev: CAGCTTCAGGACCCCATCAC	60
CDK9 Iso1+2	Fwd: GCCAGAAGGTGGCTCTGAAG Rev: GATCTTGATCTCCCGCAAGG	60
AURKA	Fwd: CTGCATTTACAGGACCTGTTAAG Rev: GACACAAGACCCGCTGAG	50
AURKB	Fwd: GCTCTACAAGGAGCTGCAG Rev: CCTTGAGCCCTAAGAGCAG	50
BRD4	Fwd: ATTGATGTTCTCCAAGTCT Rev: TTTCGAACACATCCTGGAG	55
ERCC1	Fwd: AGGAAGAAATTTGTGATAC Rev: TGTGTAGATCGGAATAAG	55
RAD50	Fwd: CTGGACCAGGAGCTCATAAAAG Rev: ACGCAGGGTCCTGTCTAAGTC	60
NBN	Fwd: CAGGATGATAGTGAGATGCTTCC Rev: ATGCCAGATGGATTTCTGGA	60
MRE11	Fwd: ACGTCGTTTCAGAGAAACCAGA Rev: AAAGGCAGAAGCAGACTCCTC	60
HEXIM	Fwd: GACGAGAAACAGAGCCTTCG Rev: TCGTGATCATCCATGAGGAA	60
FANCD2	Fwd: GGCCAAGTGGGGATAAAGAG Rev: TGATCAGTTCTGGGACACCA	60
PARP2	Fwd: ACACCCATTGGACCAACACT Rev: GTGGGAGCATGGGTAGATTG	60
NHEJ1	Fwd: AGTGCCAAGTGAGGGAGCTA Rev: TTTCTTCAAATGGTTCTGTCTTCA	60
CHK2	Fwd: CGCCTGAAAGAAGCTACCTG Rev: CTCTGGCTTTAAGTCACGGTGT	60

CASP9	Fwd: TTCTCCTCGCTGCATTTTCAT Rev: GCCGTGAGAGAGAATGACCA	60
PARP1	Fwd: TGCTGCTGTGAACTCCTCTG Rev: CATGGCCTTCACTTCATCCT	60

2.1.10 MTT-Test

Tabelle 16: Materialien für den MTT-Test

Material	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma-Aldrich
iMark™ Microplate reader	BioRad
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (TBTB)	Sigma-Aldrich
Zellkulturplatten (96-Well) für fortgeschrittene Gewebekulturen	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-Well)	Greiner bio-one

2.1.11 FACS- Messung

Tabelle 17: Material für die FACS-Messung

Material	Hersteller
Falconröhrchen (15ml)	Greiner bio-one
<i>MACSQuant Analyzer</i>	Miltenyi Biotec
Mastermix zur Apoptose-Bestimmung	siehe unten
Nicoletti Puffer	siehe unten
PS Tubes	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner bio-one

Tabelle 18: Chemikalien für den Nicoletti-Puffer

Triton X100	Sigma-Aldrich
Tri-Na-Citrat Dihydrat	Merck
Propidimiodid	Sigma-Aldrich

Der Nicoletti-Puffer wurde aus 0,1 % Triton X100, 0,1 % Tri-Na-Citrat Dihydrat, 50 µg/ml Propidiumiodid in Millipore Wasser hergestellt.

Tabelle 19: Chemikalien für den Mastemix zu Apoptose-Bestimmung

20x Annexin binding buffer	Miltenyi Biotec
Annexin V FITC-Konjugat	Miltenyi Biotec
Propidiumiodid 2mg/ml	Sigma-Aldrich

Zur Herstellung des Mastemix wurde der 20x Annexin binding buffer mit Millipore Wasser auf 1x verdünnt. Pro Probe werden zu je 70 µl 1x Annexin binding buffer 2,5 µl V FITC-Konjugat und 7,5 µl Propidiumiodid in oben angegebener Konzentration zugegeben.

2.1.12 Software

Tabelle 20: Verwendete Software

Bio-Rad CFX Maestro	BioRad
CompuSyn Version 1.0	CompuSyn, Inc.
EndNote X9	Clarivate Analytics
Light Cycler 96 Software	Roche
MACSQuantify Version 2.11	Miltenyi Biotec
Micosoft Word 2010	Microsoft
Microsoft Excel 2010	Microsoft
MPM6	BioRad
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Scientific
CanoScan Toolbox 5.0	Canon

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Karzinomzelllinien

Die Urothelkarzinomzelllinien UM-UC-3 und VM-CUB1 wurden im Brutschrank bei 37°C bei 5 % CO₂ inkubiert. Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Glutamax (stabilisiertes L-Glutamin) genutzt. Dem Medium wurde 10 % FCS zugesetzt, dass bei 56°C für eine halbe Stunde in einem Wasserbad hitzeinaktiviert wurde. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 16 ml Medium kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml 0,25 %igem Trypsin und

eine Inkubation von zwei bis drei Minuten. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit 3 ml Medium abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen erneut resuspendiert und im Verhältnis 1:25 bzw. 1:30 in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.2 Kultivierung der Urothelzelllinie HBLAK

Die spontan immortalisierte Urothelzelllinie HBLAK wurde in CnT-Prime Epithelzellkulturmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Um geeignete Wachstumsbedingungen für die HBLAK Zellen zu schaffen, wurde die Zellkulturflasche vor Verwendung für 30 min bei RT mit Kollagen IV (Konzentration 1 mg/ ml) beschichtet, welches im Verhältnis 1:20 in 0,1 %er Essigsäure gelöst war. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, dazu wurden das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Accutase Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde 4 ml Medium zugegeben, die Zellsuspension in eine Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen resuspendiert und im Verhältnis 1:4 bzw. 1:5 in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.3 Zellzählung

Die Zellzählung wurde genutzt, um eine bestimmte Anzahl an Zellen auf Well-Platten auszusäen.

Für die Zellzählung wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem sterilen Eppendorfgefäß vermischt und 10 µl davon in eine Zählkammer pipettiert.

Die Zellzählung erfolgte mit dem automatischer Zellzähler TC20TM.

2.2.1.4 Aussaat von Zellen auf 6- und 96-Well-Platten

Tabelle 21: Aussaat-Schema für die Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB1

Platte	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen in µl
96-Well	1.500	50
6-Well	150.000	2000

Tabelle 22: Aussaat-Schema für die Zelllinie HBLAK

Platte	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen in µl
96-Well	2.000	50
6-Well	200.000	2000

Ausgehend von der Zellzählung wurde das benötigte Volumen Zellsuspension berechnet, dieses wurde in ein Falconröhrchen überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. So wurde die gewünschte Anzahl von Zellen und das gewünschte Aussaatvolumen erreicht.

Für einen anschließenden MTT-Test wurden die Zellen auf 96-Well-Platten und für eine FACS-Analyse, einen Klonogenitätstest, RNA-Ernte oder Proteingewinnung auf 6-Well-Platten ausgesät.

2.2.1.5 IC₅₀-Bestimmung

Die IC₅₀-Bestimmung erfolgte für den epigenetischen Inhibitor TW09, den PARPi Talazoparib und für das Zytostatikum Gemcitabin. Bei den anderen Wirkstoffen wurde auf schon bestehende Ergebnisse der Arbeitsgruppe zurückgegriffen.

Mittels Literaturrecherche konnte ein Bereich definiert werden, indem sich die IC₅₀-Werte bewegen und ausgehend von dieser Information wurden die Zellen mit sieben verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes und einer DMSO-Kontrolle behandelt. Die eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Nach 72h Inkubation wurde zur Bestimmung der Viabilität ein MTT-Test durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.1.7).

Um aus der relativen Viabilität die IC₅₀-Konzentration zu ermitteln, wurde die Website <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator/> genutzt.

Tabelle 23: Eingesetzte Wirkstoffkonzentrationen zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes für 72h. Für jede Zelllinie wurden die gleichen Konzentrationen verwendet.

Wirkstoff	Konzentrationen [nM]
Gemcitabine	5, 10, 15, 20, 25, 30
Talazoparib	10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000
TW09	50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000

2.2.1.6 Behandlung mit Inhibitoren für den MTT-Test

Die Inhibitoren wurden zunächst unter sterilen Bedingungen in 100 % DMSO gelöst. Um der zytotoxischen Wirkung von DMSO Rechnung zu tragen, wurde bei jeder Behandlung eine DMSO-Kontrolle entsprechen der am höchsten konzentrierten Inhibitorbehandlung angesetzt.

Die Zellen wurden nach der Aussaat auf die 96-Well Platte für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ in serumhaltigem Medium bzw. Epithelzellkulturmedium kultiviert.

Die Behandlung erfolgte mit den Zytostatika Cisplatin und Gemcitabin, sowie epigenetischen Inhibitoren, welche in Tabelle 24 aufgelistet sind.

Es wurden Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Die Kombinationsbehandlungen erfolgten simultan und sequenziell. Der zeitliche Ablauf der sequenziellen und der simultanen Behandlung sind in Abbildung 1 und 2 dargestellt.

Um anhand der Daten des MTT-Tests eine Synergieanalyse nach *Chou-Talalay* durchzuführen, erfolgte die Behandlung anhand eines festen Schemas (Tab. 25). Für die Behandlung wurden die IC₅₀-Konzentrationen für 72h zugrunde gelegt (Tab. 24). Für die Synergieanalyse wurde die Software Compusyn verwendet.

Tabelle 24.: IC₅₀-Konzentrationen für 72h

	UM-UC-3	VM-CUB-1	HBLAK
PLX51107 [µM]	8,8	2	0,6
Romidepsin	3,4	4,3	0,9

[nM]			
Talazoparib [μM]	1	1	1
TW09 [μM]	2	0,1	0,1
Cisplatin [μM]	4	5	5
Gemcitabine [nM]	12,1	5,2	2,7

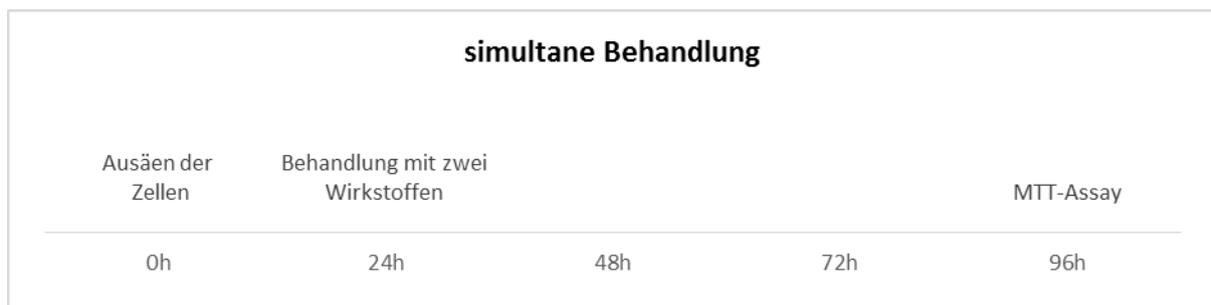


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf der simultanen Behandlung

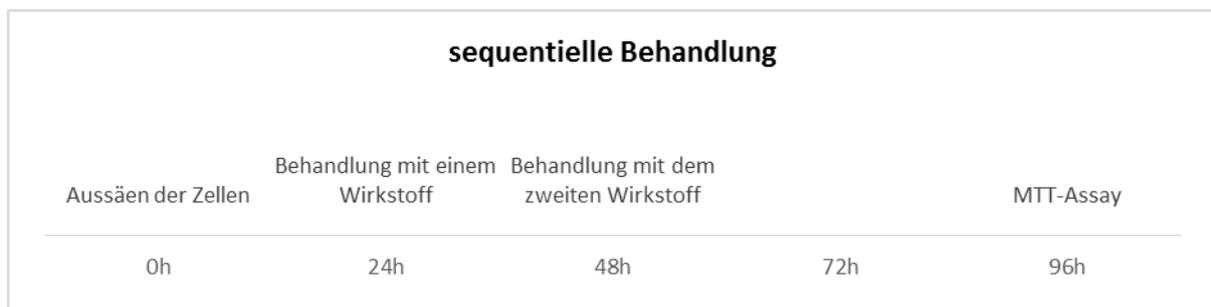


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der sequenziellen Behandlung

Tabelle 25: Behandlungsschema für die Inhibitorbehandlung

		Wirkstoff 1						
		0,125x IC ₅₀	0,25x IC ₅₀	0,5x IC ₅₀	0,75x IC ₅₀	1x IC ₅₀	1,5x IC ₅₀	2x IC ₅₀
Wirkstoff 2	0,125xIC ₅₀	x						
	0,25xIC ₅₀		x					
	0,5xIC ₅₀			x				
	0,75xIC ₅₀				x			
	1xIC ₅₀					x		
	1,5xIC ₅₀						x	
	2xIC ₅₀							x

2.2.1.7 Viabilitätstest MTT

Die zytotoxische Wirkung der Kombinations- und Einzelbehandlung wurde mittels MTT-Viabilitätstest untersucht.

Der Test beruht auf der Umwandlung des wasserlöslichen, schwach gelben 3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,3-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu dem wasserunlöslichen, violetten Formazan durch die Wirkung der mitochondrialen Reduktase (Kumar et al., 2018). Diese Umwandlung findet nur in metabolisch aktiven Zellen statt und die Anzahl der gebildeten Formazankristalle ist proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen.

Für die Messung wurden VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK Zellen, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, auf 96-Well Platten ausgesät und wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben behandelt. Mit jeder Inhibitor Konzentration wurden 4 Wells behandelt.

Nach 72h Behandlung wurden in jedes Well 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml PBS) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h bei den Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 und für 4 h bei der Zelllinie HBLAK. Nach der Inkubation wurde das Reagenz abgeschüttet und in jedes Well 50 µl DMSO gegeben. Die Extinktion wurde in dem *iMark™ Microplate reader* bei 595 nm und 750 nm (Referenzwellenlänge) gemessen. Nach Abzug der Leerprobe wurde aus den vier gemessenen Extinktionen pro Inhibitorkonzentration der Mittelwert gebildet und der Mittelwert gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle normiert.

2.2.1.8 Klonogenitätstest und Giemsa Färbung

Der Klonogenitätstest wurde eingesetzt, um die Wirkung der Kombinationsbehandlung auf die Langzeitproliferation der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen.

Dazu wurden die Zellen wie in 2.2.1.4 beschrieben ausgesät und nach 24 h mit der Kombinationsbehandlung behandelt. Es erfolgten Behandlungen mit jeweils einem Wirkstoff: PLX, Romidepsin der Talazoparib in der jeweiligen IC₅₀-Konzentration der jeweiligen Zelllinie sowie Kombinationsbehandlungen mit PLX und Talazoparib in der 0,5-fachen IC₅₀-Konzentration der Wirkstoffe der jeweiligen Zelllinien.

Außerdem erfolgte eine Behandlung mit Cisplatin und PLX in Einzel- und Kombinationsbehandlung in der IC₅₀-Konzentration der Zelllinien. Nach 72h wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin abgelöst und in 2 ml Wachstumsmedium aufgenommen.

In neue 6-Well Platten wurden je 2ml Wachstumsmedium vorgelegt und 1000 Zellen der DMSO-Kontrolle wurden auf die neue 6-Well Platten überführt. Von den Zellen nach Inhibitorbehandlung wurden die zu der DMSO-Kontrolle äquivalenten Volumina der Zellsuspension überführt.

Nach 10-12 Tagen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellkolonien mit PBS und mit PBS/Methanol (1:1) gewaschen. Das Fixieren der Kolonien erfolgte für 10 min mit Methanol bei RT. Für die Färbung wurden die Zellkolonien vollständig mit Giemsa-Lösung bedeckt und für 2 min inkubiert. Die nach 2 Minuten verbliebende Lösung wurde abgenommen und die Zellen mit Aqua dest. gewaschen. Die angefärbten Kolonien wurden mit dem Scanner *Canon 4400F* dokumentiert.

2.2.2 RNA-Analyse

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Für die Gewinnung von RNA wurden HBLAK, UM-UC-3 und VM-CUB-1 Zellen auf 6-Well Platten, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin. Es erfolgte sowohl eine Einzelbehandlung mit je einem der Wirkstoffe wie auch eine Behandlung mit einer Kombination aus PLX und Romidepsin.

Bei der Behandlung mit nur einem Wirkstoff wurde mit der IC_{50} -Konzentration der jeweiligen Zelllinie behandelt (siehe Tab.24). Bei der Kombinationsbehandlung wurde mit Wirkstoffkonzentrationen behandelt, die unterhalb der jeweiligen IC_{50} -Konzentration der Zelllinien lagen, um so die synergistische Wirkung nachzuweisen und eine mögliche Dosisreduktion zu untersuchen. Die Dosisreduktion sollte zur Verminderung der Toxizität für normale Zellen angestrebt werden. Aufgrund der Reduktion der Wirkstoffdosis wurden die Zelllinien HBLAK und VM-CUB1 mit 0,6 μ M PLX und 0,9 nM Romidepsin behandelt und die Zelllinie UM-UC-3 mit 1 μ M PLX und 1,3 nM Romidepsin. Zu jeder behandelten Probe wurde eine, mit einer analogen Konzentration DMSO behandelte, Kontrolle erstellt.

Nach 72 h Behandlung erfolgte die RNA-Isolierung mit dem *FastGene® RNA Premium Kit (NIPPON Genetics EUROPE)*. Diese wurde nach Herstelleranweisungen durchgeführt.

Der RNA-Gehalt der gewonnenen Proben wurde mittels *NanoDrop®* bestimmt und die Proben bei minus 80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Die Umwandlung der RNA in complementary DNA (cDNA) wurde mit dem *FastGene® Scriptase II cDNA Synthesis Kit* nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Für die Reaktion wurde jeweils 1 μ g RNA eingesetzt. Anschließend wurde die cDNA 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und bei minus 20°C gelagert.

2.2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wird mittels eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes die Amplifikation der DNA in Echtzeit detektiert. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur Menge des gebildeten Amplifikates zu. Als *quantification cycle (Cq-Wert)* wird der Zyklus in der PCR angegeben, indem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und detektiert werden kann. Je geringer die Menge des Amplifikates in der Probe ist, desto größer ist der Cq-Wert. Zur absoluten Quantifizierung wurden die Cq-Werte mit denen einer Standardreihe, bestehend aus drei Verdünnungen einer Standard-cDNA, verrechnet.

Die qRT-PCR wurde in 96-Well Platten und 384-Well Platten durchgeführt. Für die beiden Formate wurde ein unterschiedlicher Mastermix angesetzt (siehe Tab. 26 und 28). Für jede Probe wurde ein Triplikat gemessen.

Die Messung erfolgte bei den 96-Well Platten im LightCycler® 96 und bei den 384-Well Platten im C1000 Touch Thermal Cycler CFX384™.

Tabelle 26: Mastermix für die qRT-PCR auf der 96-Well Platte. Der Mastermix ist pro Well angegeben, was einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Well entspricht. Pro Probe wurde dieser Mastermix dreimal angesetzt, um Triplikate zu erhalten.

Mastermix	Volumen
2x Luna® universal qPCR Master Mix	10 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O (Ampuwa®)	8 µl

Tabelle 27: Mastermix für die qRT-PCR auf der 384-Well Platte. Der Mastermix ist für drei Well angegeben. Von dem Mastermix wurden jeweils 5 µl in ein Well pipettiert und die Platte kurz zentrifugiert. Die Messung erfolgte im C1000 Touch Thermal Cycler CF

Mastermix	Volumen
2x Luna® universal qPCR Master Mix	8,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O (Ampuwa®)	6,5 µl
cDNA (1:10)	1 µl

2.2.2.4 Auswertung der qRT-PCR

Für die Auswertung wurde die Software *Light Cycler 96 Software* (96-Well Platte) und die *Software Bio-Rad CFX Maestro* (384-Well Platte) benutzt. Die in Abschnitt 2.2.2.3 beschriebene absolute Quantifizierung wurde von der Software durchgeführt, sodass zur Auswertung die quantifizierte Konzentration der jeweiligen Proben relativ zur Standardreihe vorlagen. Für eine weitere relative Quantifizierung wurde das *housekeeping gene TBP* als Referenz bestimmt. Durch Dividieren der Konzentration des zu testenden Gens durch die Konzentration von *TBP* in der entsprechenden Probe wurde die relative Expression des Gens bestimmt. Um den Unterschied in der relativen Expression von behandelten Proben zu den mit DMSO behandelten Kontrollproben - den *fold change*- zu errechnen, wurde aus den Triplikaten der DMSO-Kontrollen der Mittelwert ermittelt und jede behandelte Probe durch den Mittelwert der dazugehörigen DMSO-Probe dividiert. Aus diesen Ergebnissen wurde der Logarithmus zur Basis zwei berechnet. Von den drei Werten, die so für jede behandelte Probe vorlagen, wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt. Für den paarweisen Vergleich zwischen behandelten Proben und DMSO-Kontrolle wurde unter Verwendung der Software Graph Pad Prism das Signifikanzniveau mittels t-Test bestimmt.

2.2.2.5 RNA-Sequenzierung

Mittels RNA-Sequenzierung (RNA-seq) wurde eine umfassende Genexpressionsanalyse durchgeführt und die Veränderung der Genexpression nach Inhibitorbehandlung untersucht. Die RNA-seq erfolgte mittels *Next-Generation Sequencing* und wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt.

Für die Analyse wurden VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben ausgesät. Nach 24 h erfolgte sowohl eine Einzelbehandlung mit PLX wie auch eine Behandlung mit einer Kombination aus PLX und Romidepsin.

Bei der Einzelbehandlung mit PLX wurde mit der IC_{50} -Konzentration der jeweiligen Zelllinie behandelt (siehe Tab. 24). Die Kombinationsbehandlung erfolgte mit reduzierten Dosierungen, die sich aus Vorarbeiten zur Synergieanalyse zwischen PLX und Romidepsin ergeben hatten. Ziel war es dabei, für die Tumorzelllinien Dosierungen zu verwenden, die ungefähr der halbmaximal letalen Dosis der benignen HBLAK-Kontrollzellen entsprechen. Daher wurden die Zelllinien HBLAK und VM-CUB-1 mit 0,6 μ M PLX und 0,9 nM Romidepsin behandelt. Da die Zelllinie UM-UC-3 eine auffällig geringere Sensitivität gegenüber PLX zeigte, wurde nach einem weiteren Vortest mit unterschiedlichen Dosierungen mittels MTT-Test die Dosierung von 1 μ M PLX und 1,3 nM Romidepsin gewählt. Zu jeder behandelten Probe wurde eine mit einer entsprechenden DMSO-Konzentration behandelte Kontrollprobe erstellt. Nach 72h Behandlung wurde die RNA mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ isoliert. Diese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, inklusive des optionalen DNase-Verdau. Nach der Isolation in Triplikaten wurde die gewonnene RNA dem BMFZ übergeben, welches die Hochdurchsatzanalyse der RNA durchführte.

Für die Analyse der Einzelbehandlung mit Romidepsin wurde auf Daten eines bereits durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Microarrays zurückgegriffen. Dabei wurden die Zellen jeweils mit 3 nM Romidepsin behandelt. Zur Auswertung der Analyse stellte das BMFZ eine Liste zur Verfügung, in welcher signifikante Expressionsveränderung aller Gene als *fold change (cut-off 1.5)* angegeben waren. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ nach Bonferroni-Korrektur angenommen.

2.2.3 Protein-Analyse

2.2.3.1 Proteinisolation

Für Herstellung von Proteinlysaten wurden HBLAK, UM-UC-3 und VM-CUB-1 Zellen auf 6-Well Platten, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben, ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin, sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Es wurde mit der IC_{50} -Konzentration der jeweiligen Zelllinie behandelt (siehe Tab.24).

Nach 72 h Behandlung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 150 μ l Lysepuffer (1 % Protease- und Phosphataseinhibitor in RIPA-Puffer) auf die Zellen geben und diese 30 min auf Eis geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 900 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei minus 80°C gelagert.

2.2.3.2 BCA-Protein Assay zur quantitativen Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA) und wurde mit dem *BCA-Protein Assay Kit von Pierce* durchgeführt. Aus den in diesem Kit enthaltenden Reagenzien A und B wurde ein *BCA-Mix* hergestellt, welcher aus 196 µl Reagenz A und 4 µl Reagenz B besteht. Als Standard wurde BSA verwendet, welches mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde, woraus sich eine Standardreihe mit einem BSA-Gehalt von 2000 µg bis 32 µg ergab. Die Proben wurden mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Zur Messung wurden 10 µl der Proben und der Standards in eine 96-Well Platte pipettiert. In jedes Well wurde anschließend 200 µl *BCA-Mix* hinzugegeben. Als Blank wurde 10 µl RIPA-Puffer verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 495 nm, die im *Microplate reader iMark™* durchgeführt wurde.

2.2.3.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach Größe wurde eine SDS-PAGE Gelelektrophorese durchgeführt. Das verwendete 12 %ige Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Tab. 28 und 29).

Tabelle 28: Zusammensetzung Trenngel für zwei 12 %ige Polyacrylamidgele

H ₂ O	3,3 ml
PAA 30 %	4 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS in dest. H ₂ O	0,1 ml
10 %APS in dest. H ₂ O	0,1 ml
TEMED	5 µl

Tabelle 29: Zusammensetzung Sammelgel für zwei Polyacrylamidgele

H ₂ O	3,4 ml
PAA 30 %	0,83 ml
1 M Tris pH 6,8	0,63 ml
10 % SDS in dest. H ₂ O	50µl
10 % APS in dest. H ₂ O	50µl
TEMED	5 µl

Pro Probe wurden 20 µg Protein eingesetzt, welche im Verhältnis 1:4 mit *4x Roti-Load-Probenpuffer* versetzt wurden und anschließend mit RIPA-Puffer auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt wurden. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Das 12 %ige Polyacrylamid wurde in die Laufkammer eingespannt, an das Laufmodul angeschlossen und mit Laufpuffer gefüllt. 20 µl der denaturierten Proben wurden anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard wurde 4 µl der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 70 V, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, danach wurde die Spannung für ca. 90 Minuten auf 100 V erhöht.

2.2.3.4 Western Blot und Detektion

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein *Semidry Blotter* verwendet. Zur Vorbereitung auf das Blotten wurden die PVDF-Membran aktiviert, dazu wurde die Membran 1 min in 100 % Methanol, 2 min in Aqua dest. und 5 min in *Blotting-Puffer* inkubiert. Das ebenfalls für den Transfer benötigte *Whatman-Paper* wurde für 5 min in *Blotting-Puffer* eingeweicht. Für den Transfer wurden das *Whatman-Paper*, die PVDF-Membran und das Polyacrylamidgel nach Herstelleranweisung in der Kassette des *Semidry Blotters* platziert. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 20 min bei 25 V.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran, abhängig vom Protokoll des Antikörperherstellers, für eine 1 h in 5 % BSA oder 5 % Milchpulver in TBS-T eingelegt. Im Anschluss wurde der Primärantikörper zugegeben und die Membran über Nacht bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert.

Vor und nach der anschließenden, einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 4x10 min mit TBS-T gewaschen, um die Membran von ungebundenen Antikörpern zu befreien.

Zur darauffolgenden Detektion wurde das *Clarity Western ECL Substrat* verwendet. Nach 5 Minuten Inkubation erfolgte die Detektion im Chemolumineszenz Detektor *Chemi Doc*. Auch erfolgte eine kolorimetrische Aufnahme des Größenstandards.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie die spezifischen *Blocking*-Verfahren sind den Tabellen 12 und 13 zu entnehmen.

2.2.3.5 Stripping

Um einen Nachweis von mehreren Proteinen auf einer Membran zu ermöglichen, wurden nach der Detektion die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper mittels *Strippings* entfernt. Dazu wurde die Membran 2x10 min mit mildem *Stripping Puffer* inkubiert und anschließend 3x10min mit TBS-T gewaschen.

Anschließend konnte die Membran neu geblockt und mit Antikörpern inkubiert werden.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Iodid (PI) angefärbt. PI interkaliert in die DNA und ist in der Durchflusszytometrie als Fluoreszenzsignal messbar. Das Signal ist proportional zum zellulären DNA-Gehalt. Da sich der DNA-Gehalt der Zelle innerhalb des Zellzyklus ändert, kann durch das Fluoreszenzsignal eine Einteilung in die einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgen (Crowley, Chojnowski, et al., 2016).

Für die Analyse wurden HBLAK, VM-CUB-1 und UM-UC-3 Zellen wie in Abschnitt 2.2.1.4 ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Kombinationsbehandlungen: Talazoparib und PLX, Talazoparib und Romidepsin und PLX und Cisplatin. Für die Behandlung wurden die IC₅₀ Konzentrationen aus Tabelle 24 zugrunde gelegt und alle Zelllinien mit dem 0,5-fachen IC₅₀ von VM-CUB-1 für 72h behandelt.

Für die Ernte der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Plattenboden gelöst und zusammen mit dem abgenommenen Medium für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 2 ml PBS resuspendiert. Die 2 ml Zellsuspension wurde in 2 Reagenzgläser aufgeteilt und erneut für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In dem einen Reagenzglas erfolgte die Färbung für die Zellzyklusanalyse, in dem anderen die Färbung für die Apoptose-Bestimmung (siehe Abschnitt 2.2.4.2).

Für die Zellzyklusanalyse wurde das Zellpellet mit 500 µl Nicoletti-Puffer resuspendiert und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte mit dem *MACSQuant® Analyser*. Für die Auswertung der Zellzyklusanalyse und der Apoptose-Bestimmung wurde die *MACSQuant® Software* genutzt.

2.2.4.2 Apoptose-Bestimmung

Ziel dieser Messung ist eine Einteilung der Zellen in vier Zustände: Vital, früh-apoptotisch, spät-apoptotisch und nekrotisch. Die Apoptose-Bestimmung beruht auf der spezifischen Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS), welches an der Innenseite der Zellemembran vorkommt. Während der frühen Apoptose kommt es zu einer Translokation von PS an die Außenseite der Membran. Hier kann es durch fluoreszenzmarkiertes Annexin V nachgewiesen werden (Crowley, Marfell, et al., 2016). Ergänzend erfolgte eine Färbung mit PI. Dieser färbt nur nekrotische und spät-apoptotische Zellen an, da in vitalen und früh-apoptotischen Zellen die Integrität der Zellmembran ein Eindringen des Farbstoffes in die Zelle verhindert (Crowley, Marfell, et al., 2016)

Die Behandlung und Ernte der Zellen für die Analyse sind in Abschnitt 2.2.4.1 dargestellt. Das aus dem dort beschriebenen Vorgehen entstandene Zellpellet wurde mit 200 µl *1xAnnexin-Binding Buffer* resuspendiert, für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde mit 70 µl Mastermix zur Apoptose-Bestimmung resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Unmittelbar vor der Messung mit dem *MACSQuant® Analyser* wurden der Zellsuspension weitere 500 µl *1xAnnexin Binding Buffer* zugegeben.

3 Ergebnisse

3.1 BRD-4 Expression in unbehandelten UCCs

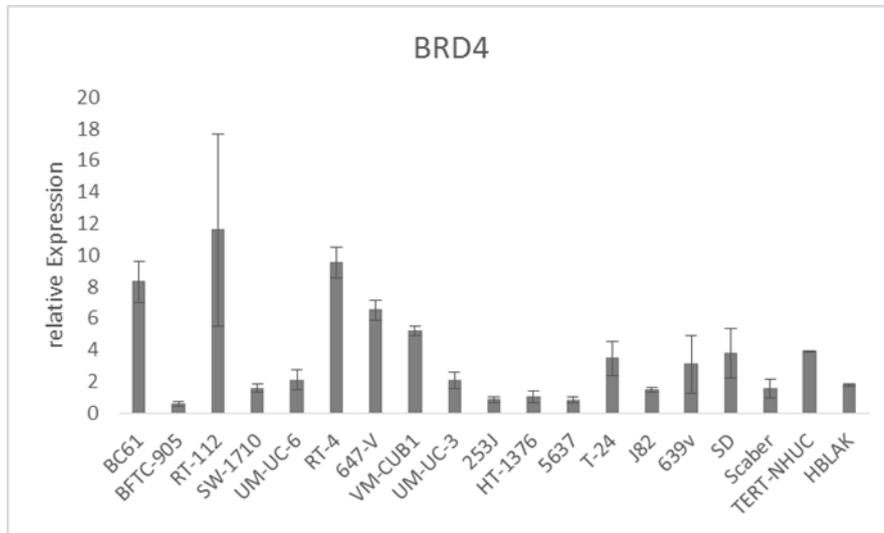


Abb. 3: qPCR zur Bestimmung der BRD4 Expression in verschiedenen Zelllinien. Durchführung einer qPCR an 17 unbehandelten UCCs und den zwei Kontrollzelllinien TERT-NHUC und HBLAK. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=3.

Bei der in Abbildung 3 dargestellten Expressionsanalyse von BRD4 in UCCs fällt eine sehr heterogene Expression von BRD4 in den verschiedenen Zelllinien auf. Die beiden benignen Kontrollzelllinien TERT-NHUC und HBLAK wiesen im Vergleich zu den UCCs eine mittlere Expression von BRD4 auf. Für diese Arbeit ausgewählt wurden die UCCs, die als Modelle für das fortgeschrittene UC dienen: VM-CUB-1, mit einer höheren BRD4 Expression und UM-UC-3 mit einem mittleren Expressionsniveau.

3.2 Erstellung eines molekularen Wirkprofils der epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin mittels Transkriptom-Analyse

Um einen globalen Überblick über die Expressionsveränderungen zu erhalten, die durch die Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren PLX und Romidepsin ausgelöst werden, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Diese und die statistische Aufarbeitung der Rohdaten wurde durch das BMFZ durchgeführt. Für die vorliegende Arbeit standen daher Listen mit statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen nach Behandlung mit PLX, Romidepsin und der Kombination aus beiden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zur Verfügung. Für die Einzelbehandlung wurden jeweils die IC_{50} -Dosierungen verwendet. Für die Kombinationsbehandlung wurden tolerable, reduzierte Dosen verwendet. Da die Zelllinie UM-UC-3 einen hohen IC_{50} -Wert für PLX aufwies, wurde sie in der Kombinationsbehandlung mit vergleichsweise niedrigen PLX-Dosierungen behandelt. Bei der genaueren Auswertung in dieser Arbeit war vor allem die nicht kanonische Wirkung der Behandlung und damit der Einfluss der auf bestimmte Signalwege z.B. der DNA-Schadensantwort oder DNA-Reparatur relevant. Weitere Fragen waren, ob sich die Wirkung der beiden Inhibitoren, die beide mit der Histonacetylierung interferieren, unterscheidet und ob sich durch eine Kombination von beiden die Wirkung im Sinne einer Synergie verstärkt. Zur Auswertung wurden in dieser Arbeit eine, vom Broad Institute

erstellte, Genlisten für einzelne Signalwege mit den Ergebnissen der Sequenzierung verglichen, um festzustellen, ob diese nach der Behandlung Veränderungen unterliegen (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>). Für jeden Signalweg wurden die signifikanten Expressionsveränderungen der beteiligten Gene dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die verschiedenen Transkriptomanalysen nebeneinander in einer Abbildung dargestellt.

3.2.1 Effekte der Behandlungen auf die DNA-Schadensantwort

Nach der Induktion von DNA-Schäden steuert die DNA-Schadensantwort sowohl deren Erkennung als auch die Aktivierung und Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen. Eine vom Broad Institute erstellte Liste von Genen zur DNA-Schadensantwort wurde daher mit den Transkriptom-Ergebnissen verglichen und nach Behandlung differentiell exprimierte Gene in Form einer Heatmap dargestellt. Bei den Vergleichen fiel auf, dass mehr Faktoren vermindert exprimiert waren als induziert. In der Zelllinie VM-CUB1 waren mehr Faktoren differentiell exprimiert, als in UM-UC-3. Einzelne Faktoren waren nahezu über alle Bedingungen hinweg in beiden Zelllinien gleichsam verändert, z.B. die Induktion von *BCL6* und *RAD17* oder die Reduktion von *XRCC4*. In VM-CUB-1 Zellen waren zahlreiche Gene durch Romidepsin, PLX bzw. deren Kombination gleichsam verändert. Grundsätzlich hatte die Kombination häufig ähnliche Effekte, wie eine der Mono-Behandlungen, jedoch keine sonderlich verstärkenden Effekte im Sinne einer Synergie. Auffällig waren hier die Reduktion der *BRCA* und weiterer Fanconi-Gene, Gene der *RAD*-Familie und der Checkpointkinasen *CHK1* und *CHK2*, die nach *ATM* und *ATR* an der Spitze der DNA-Schadensantwort stehen.

Schadensantwort

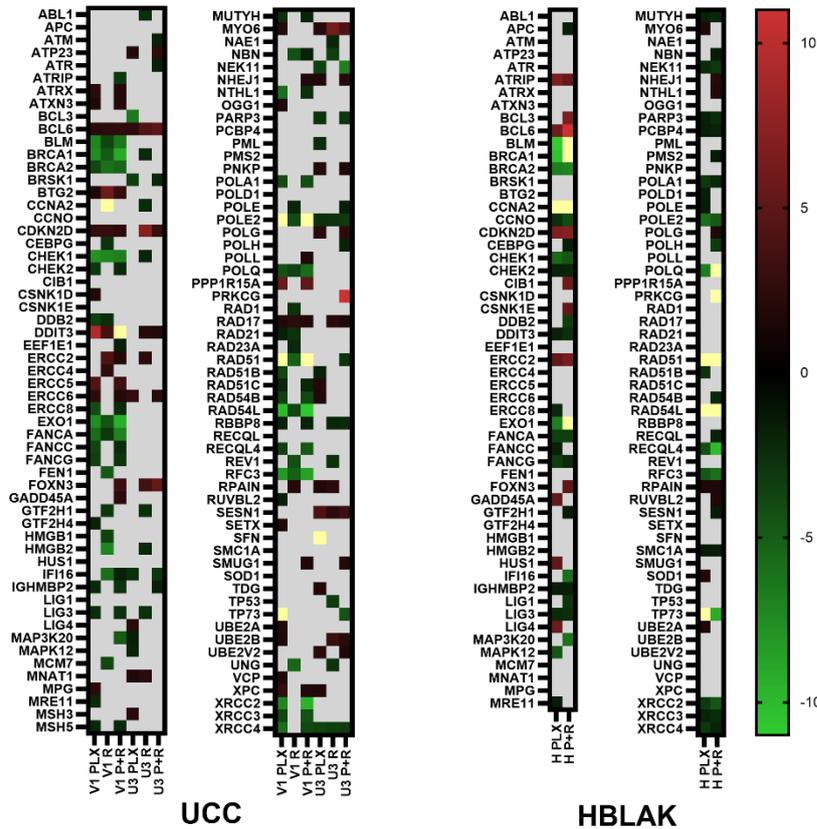


Abb. 4: Darstellung der Expressionsveränderungen der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach einer Behandlung mit Romidepsin, PLX bzw. der Kombination aus beiden. Aufgetragen sind die Gene, die in die DNA-Schadensantwort involviert sind. Aufgetragen sind die Gene, die Teil des Signalweges der Schadensantwort sind. Berechnete Fold change -Werte wurden zur Erstellung der Heatmap verwendet, s. Legende zum Farbgradienten. Grüne Markierung steht für Expressionsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, rote Farbe für Expressionsinduktion. Bei gelben Kacheln lagen die Fold-Change Werte außerhalb der Skala. V1: VM-CUB-1, U3: UM-UC-3, H: HBLAK; PLX: PLX51107-Behandlung, R: Romidepsin-Behandlung, P+R: Kombinationsbehandlung aus PLX und Romidepsin.

Vergleicht man die Effekte zwischen Romidepsin und PLX-Mono-Behandlung fällt bei VM-CUB-1 Zellen auf, dass Romidepsin andere Faktoren der *ERCC*-Familie als PLX induziert. Im Gegensatz wirkt nur Romidepsin vermindern auf *HMGB1/2*, die als Marker für immunogenen Zelltod gelten. Verschiedene Komponenten der *RAD*-Familie werden nur durch PLX reduziert. Bei HBLAK Zellen waren die Genexpressionsveränderungen vielfach vergleichbar mit VM-CUB-1 Zellen.

3.2.2 Effekte der Behandlungen auf die DNA-Reparaturmechanismen

Im Folgendem ist in Abbildung 5 der Einfluss der Behandlungen auf die einzelnen DNA-Reparaturmechanismen zur Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen dargestellt.

Auch bei der Analyse verschiedener DNA-Reparatursignalwege zeigten sich bei der VM-CUB-1 Zelllinie mehr differentiell exprimierte Gene als bei UM-UC-3 Zellen. Ergebnisse der benignen HBLAK-Zellen ähnelten den VM-CUB-1 Ergebnissen bei NER und HRR. Bei

NHEJ, BER und vor allem MMR waren die induzierten Expressionsveränderungen deutlich unterschiedlich bis gegensätzlich. Mehrheitlich über alle Zelllinien und Bedingungen hinweg wurden eher mehr Gene reduziert als induziert. Die meisten Induktionen waren bei NER und NHEJ auffällig, insbesondere DNA-Polymerasen waren betroffen. Polymerasen gehörten jedoch auch zu den Faktoren, die durch Romidepsin anders verändert wurden als durch PLX. Der MMR-Weg war der einzige bei dem PLX und Romidepsin meist vergleichbare Effekte hatten. Bei der homologen Rekombinationsreparatur (HRR), die wesentlich zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen dient, waren auffällig viele Faktoren herunterreguliert. Auffällig hierbei war, dass die HRR-Faktoren vielfach in beiden UC-Zelllinien dereguliert vorlagen, bei anderen Reparaturwegen war durch die Inhibitoren mehr Veränderungen in VM-CUB-1 Zellen induziert. Die inhibitorischen Effekte auf den HRR-Weg fielen stärker für PLX und die Kombination als für Romidepsin auf. Dies könnte entsprechend die Reparaturkapazität negativ beeinträchtigen. Beim NHEJ-Signalweg, der in solchen Fällen eine alternative DNA-Reparaturmöglichkeit darstellt, waren insgesamt wenig Gene differentiell exprimiert.

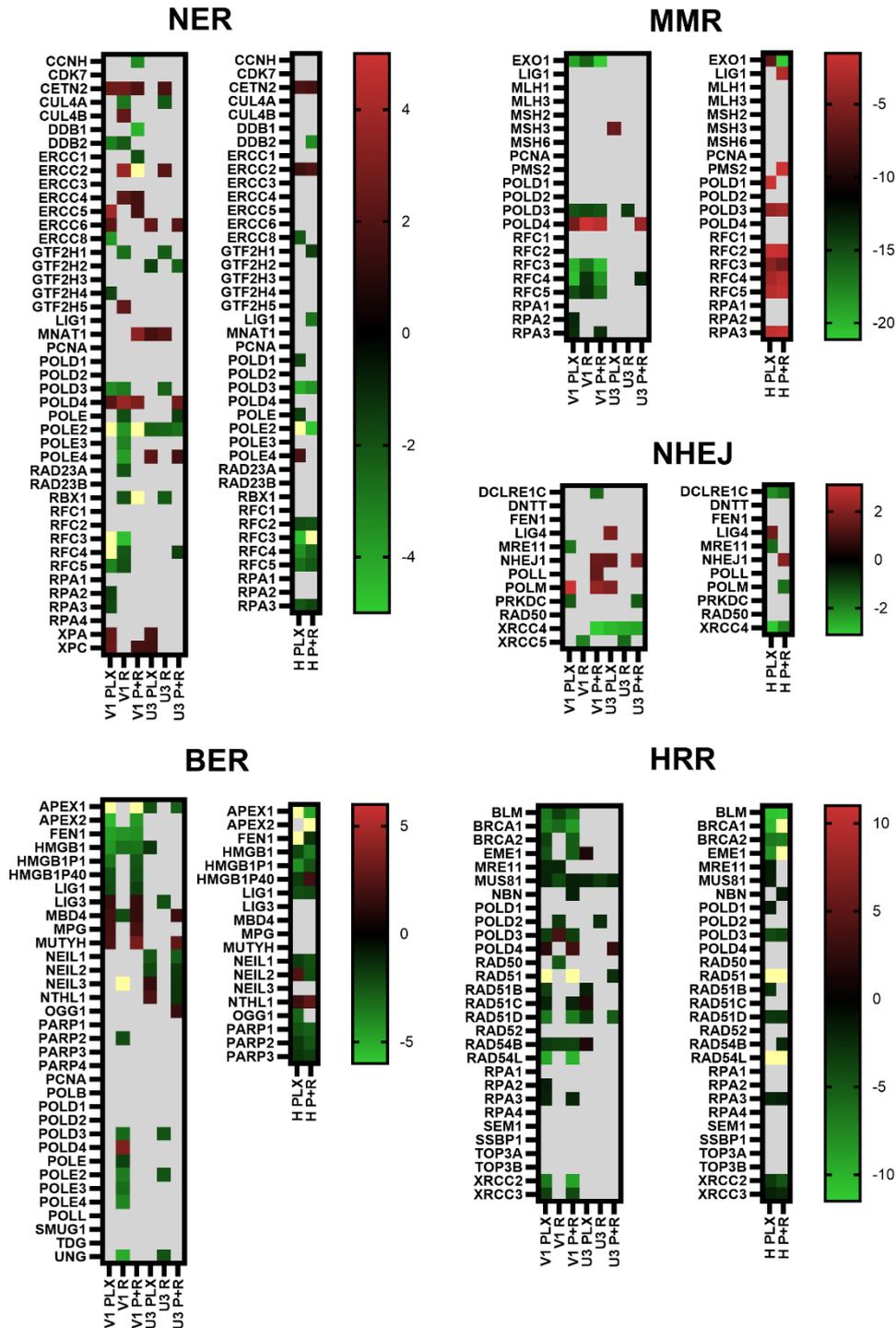


Abb. 5: Darstellung der Expressionsveränderungen der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach einer Behandlung mit Romidepsin, PLX bzw. der Kombination aus beiden. Aufgetragen sind die Gene, die in die DNA- Reparatur involviert sind. Aufgetragen sind die Gene, die Teil des Signalweges der Schadensantwort sind. Berechnete Fold change -Werte wurden zur Erstellung der Heatmap verwendet, s. Legende zum Farbgradienten. Grüne Markierung steht für Expressionsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, rote Farbe für Expressionsinduktion. Bei gelben Kacheln lagen die Fold-Change Werte außerhalb der Skala. V1: VM-CUB-1, U3: UM-UC-3, H: HBLAK; PLX: PLX51107-Behandlung, R: Romidepsin-Behandlung, P+R: Kombinationsbehandlung aus PLX und Romidepsin.

3.2.3 Effekte der Behandlung auf die BRCAness

Da die bisherigen Auswertungen auf eine Defizienz der homologen Rekombinationsreparatur hindeuteten, wurden weitere Vergleiche angestellt. Ein Phänotyp mit einer defizienten HRR wird häufig auch als BRCAness bezeichnet. Bei Tumorarten wie dem Mamma- oder Ovarialkarzinom wird die BRCAness wesentlich durch genetische Veränderungen in *BRCA*- oder anderen HRR-Genen verursacht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine BRCAness Genliste mit den Transkriptom-Ergebnissen verglichen, um festzustellen ob die epigenetischen Inhibitoren durch Herabregulation von Genen künstlich eine BRCAness, unabhängig vom genomischen Hintergrund, induzieren könnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Auffällig hierbei war, dass die assoziierten Gene stärker in beiden untersuchten UC-Zelllinien von differentieller Expression, speziell Reduktion, betroffen waren als in anderen Genlisten, bei denen vor allem bei VM-CUB-1 Zellen Veränderungen auffällig waren. Dies könnte auf eine übergeordnete Relevanz für die molekulare Wirkung der Inhibitoren hinweisen. Die Induktion von BRCAness könnte also ein robuster Zelllinien-übergreifender Wirkmechanismus der Inhibitoren sein. Diese Vermutung bestätigt sich zudem durch die Befunde für die benigne HBLAK -Zelllinie, in der weniger Gene vermindert exprimiert waren. Dies trifft z.B. besonders auf Komponenten der *RAD*-Familie zu. Das Ergebnis für die Kombinationsbehandlung war erneut gemischt, teilweise hatte sie dieselben Effekte wie die Behandlung mit Romidepsin bzw. PLX. Es finden sich auch Gene, die unter allen drei Bedingungen gleichsam verändert waren, z.B. die Reduktion von *CHK1*, *AURKB*, *Cyclinen*, *BRCA1*, *POLQ*, *CENPA* und *PLK4*.

BRCAness

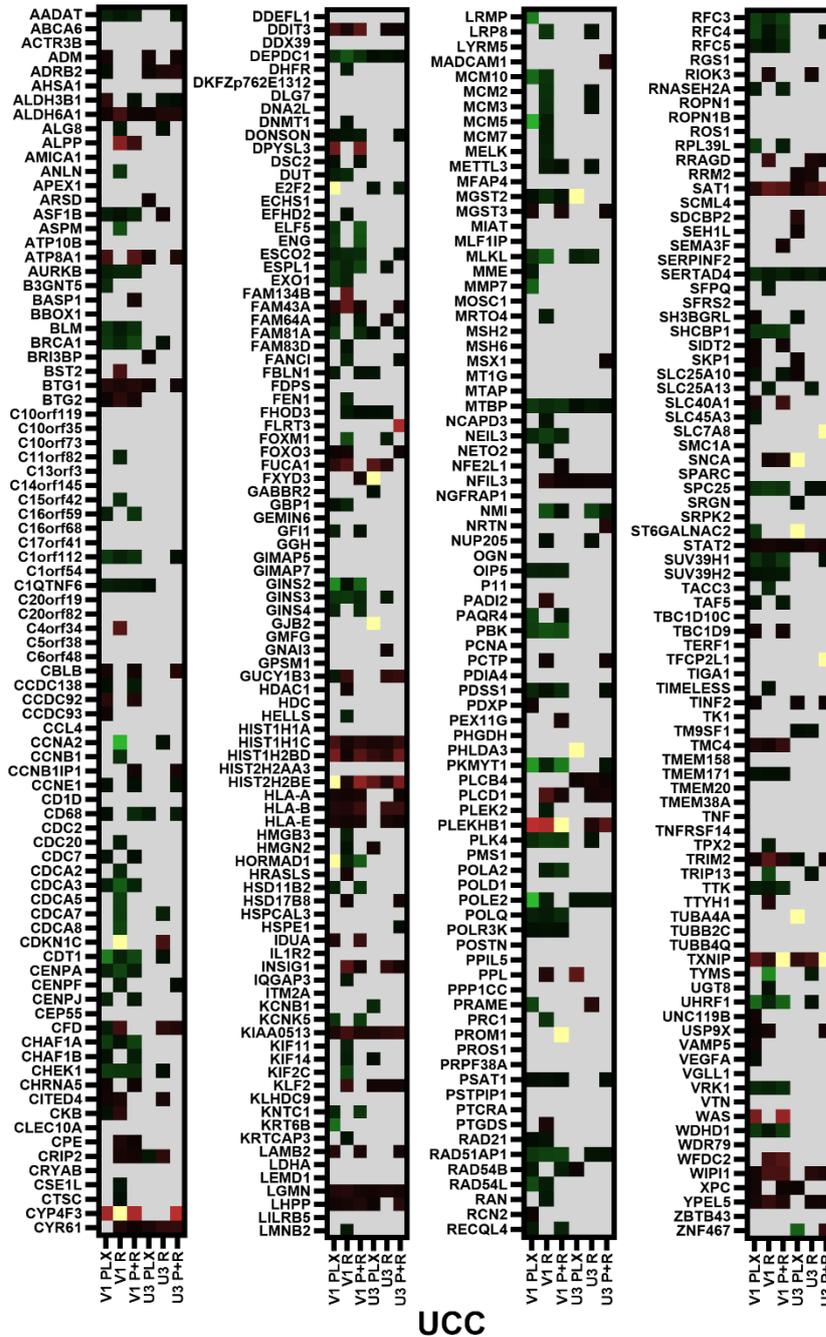


Abb.6: Darstellung der Expressionsveränderungen der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach einer Behandlung mit Romidepsin, PLX bzw. der Kombination aus beiden. Aufgetragen sind die Gene, die in der Ausbildung von BRCAness involviert sind. Berechnete Fold change -Werte wurden zur Erstellung der Heatmap verwendet, s. Legende zum Farbgradienten. Grüne Markierung steht für Expressionsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, rote Farbe für Expressionsinduktion. Bei gelben Kacheln lagen die Fold-Change Werte außerhalb der Skala. V1: VM-CUB-1, U3: UM-UC-3, H: HBLAK; PLX: PLX51107-Behandlung, R: Romidepsin-Behandlung, P+R: Kombinationsbehandlung aus PLX und Romidepsin.

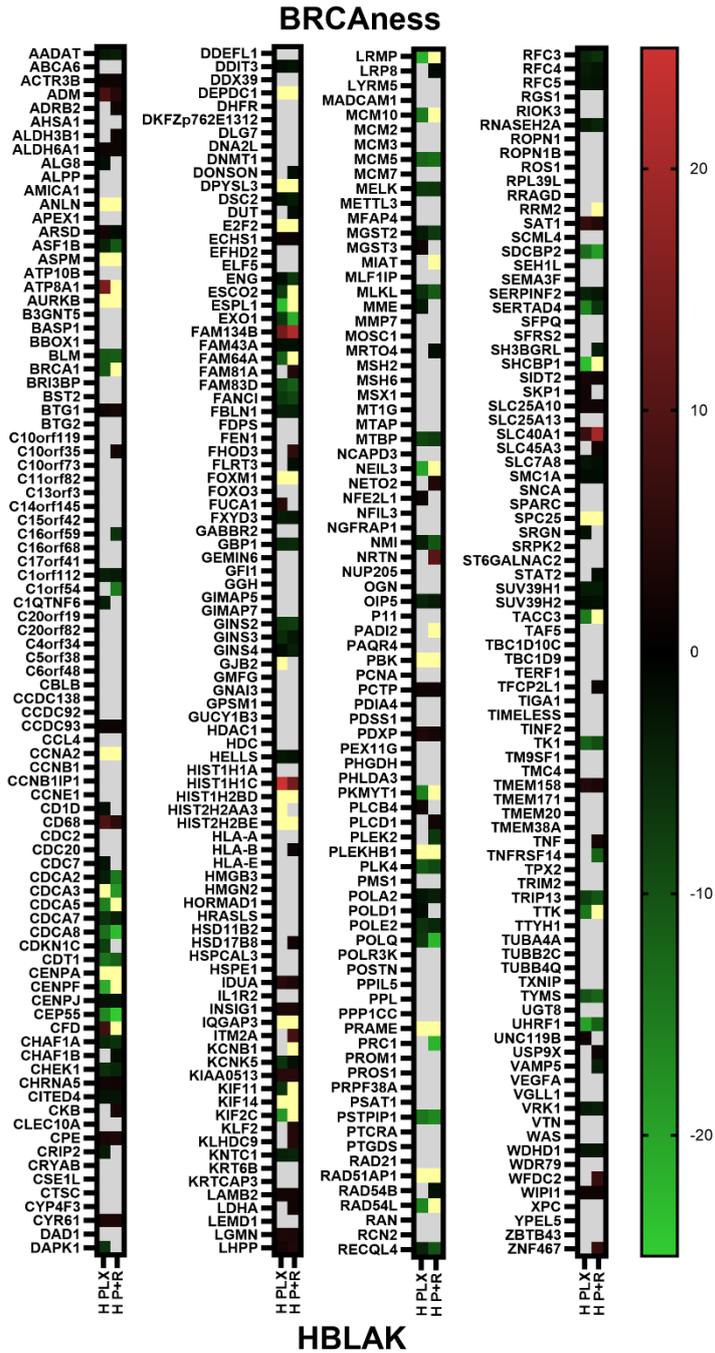


Abb.7: Darstellung der Expressionsveränderungen der Zelllinie HBLAK nach einer Behandlung mit PLX bzw. der Kombination aus PLX und Romidepsin. Aufgetragen sind die Gene, die in der Ausbildung von BRCAness involviert sind. 1Aufgetragen sind die Gene, die Teil des Signalweges der BRCAness sind. Berechnete Fold change -Werte wurden zur Erstellung der Heatmap verwendet, s. Legende zum Farbgradienten. Grüne Markierung steht für Expressionsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, rote Farbe für Expressionsinduktion. Bei gelben Kacheln lagen die Fold-Change Werte außerhalb der Skala. V1: VM-CUB-1, U3: UM-UC-3, H: HBLAK; PLX: PLX51107-Behandlung, R: Romidepsin-Behandlung, P+R: Kombinationsbehandlung aus PLX und Romidepsin.

3.2.4 Effekte der Behandlung auf die Apoptoseregulation

Auswirkungen der epigenetischen Inhibitoren auf die Apoptoseregulation wurde analog untersucht und in Abbildung 8 dargestellt. In einigen Genen des Signalweges kam es zu einer deutlichen Verminderung der Expression in beiden Zelllinien. Am stärksten war diese Verminderung in beiden Zelllinien bei *FAS*, *BCL2*, *BID*, *AKT-Kinasen-Expression*. *C-FLIP* (*CFLAR*) war nur in UM-UC-3 Zellen vermindert. Bei den Genen *PRKAR2B* und *IL1RAP* kam es dagegen, vor allem in UM-UC-3, zu einer starken Induktion. In VM-CUB-1 wurden *TNFRSF10B*, *PIK3R3* und *CHP1* am stärksten induziert. *CASP9* wurde bei fast allen Bedingungen induziert.

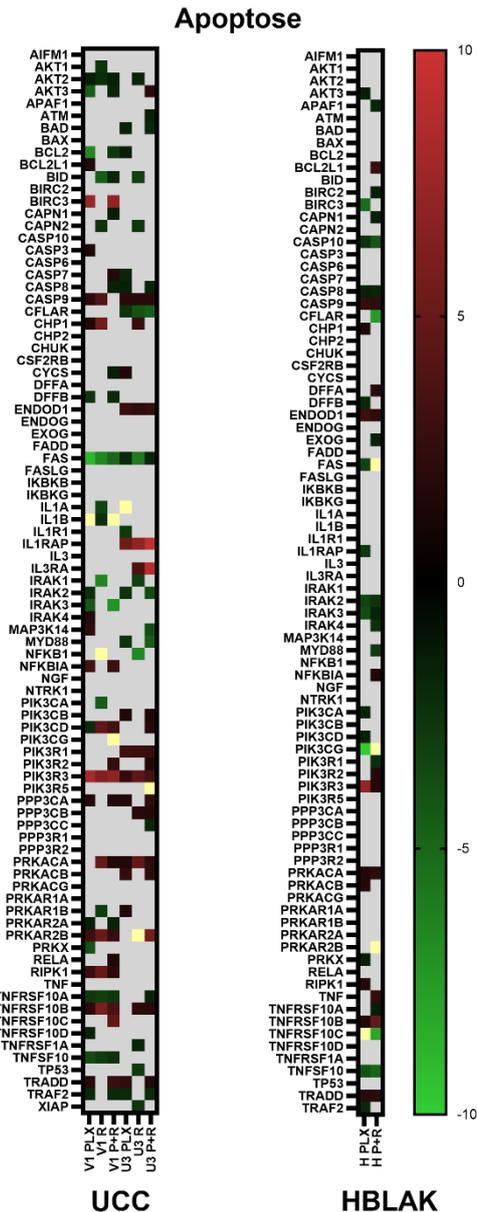


Abb.8: Darstellung der Expressionsveränderungen der Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 nach einer Behandlung Romidepsin, PLX bzw. der Kombination aus beiden. Aufgetragen sind die Gene, die Teil der Apoptoseregulation sind. Berechnete Fold change -Werte wurden zur Erstellung der Heatmap verwendet, s. Legende zum Farbgradienten. Grüne Markierung steht für Expressionsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, rote Farbe für Expressionsinduktion. Bei gelben Kacheln lagen die Fold-Change Werte außerhalb der Skala. V1: VM-CUB-1, U3: UM-UC-3,

H: HBLAK; PLX: PLX51107-Behandlung, R: Romidepsin-Behandlung, P+R: Kombinationsbehandlung aus PLX und Romidepsin.

Es wurden also sowohl anti- wie auch pro-apoptotische Faktoren und Überlebensfaktoren wie AKT-Kinasen durch die Behandlung in UC-Zelllinien reduziert. In benignen HBLAK Zellen waren einige dieser Gene nicht differentiell exprimiert. Die Tumorzellen unterliegen also stärkeren Veränderungen der Apotoseregulation im Vergleich zu benignen HBLAK.

3.3 Validierung der RNAseq Ergebnisse mittels RT-qPCR

Zur Validierung der Transkriptom-Ergebnisse wurden RT-qPCRs mit den Proben durchgeführt. Um die Expression der behandelten Proben mit der Lösungsmittelkontrolle zu vergleichen, wurde anschließend der logarithmierte *Fold Change* der Genexpression berechnet, der die beiden in Relation setzt. Ein logarithmierter *Fold Change* von $> 0,58$ wird als biologisch relevant gewertet.

3.3.1 Untersuchung der DNA-Schadensantwort mittels qPCR

Abbildung 9 zeigt den Einfluss, den die Behandlungen auf die Schlüsselgene der DNA-Schadensantwort haben. PLX bewirkte die stärkste Verminderung der Expression von *ATM* in den UM-UC-3. Bei VM-CUB-1 hingegen hat die Expressionsveränderung mit einem *Fold Change* von 0,5 eine fragliche biologische Relevanz. Im Kontrast dazu stieg die Expression von *ATM* in der Kontrollzelllinie HBLAK. Hier zeigt sich, dass in benignen Zellen die Schadensantwort offensichtlich stärker funktional ist als in den Tumorzelllinien. Gering waren hingegen die Expressionsveränderungen nach der Romidepsin- und Kombinationsbehandlung. Nach Behandlung mit Romidepsin zeigte sich ein leichter Trend zur Induktion von *ATM* in allen Zelllinien.

Auch die Expression von *ATR* wurde durch PLX in UM-UC-3 stärker runterreguliert als in VM-CUB-1. Die Wirkung der Behandlung auf die Expression von *ATR* war insgesamt sehr heterogen mit einer deutlichen Verminderung der Expression in UM-UC-3 durch die PLX- und Kombinationsbehandlung und einem Trend zur Expressionssteigerung durch Romidepsinbehandlung bzw. durch PLX-Behandlung in den HBLAK-Zellen.

Eine sehr heterogene Reaktion auf die Behandlung zeigten die einzelnen Zelllinien auch in Hinblick auf die *CHK1* und *CHK2*-Expression. In VM-CUB-1 führte die Behandlungen mit PLX dazu, dass die sich Expression von *CHK1* und *CHK2* um den dreifachen *Fold Change* verringerte. Auch die Kombinationsbehandlung hatte eine Abnahme der Expression zu Folge. In UM-UC-3 führte die PLX-Behandlung zu einer Verdopplung der *CHK1*-Expression, während die *CHK2*-Expression sich durch die Behandlung halbierte. HBLAK zeigte ein sehr heterogenes Ansprechen auf die Behandlungen mit nur geringen Expressionsveränderungen.

Die Veränderung der *GADD45A* und *GADD45B*-Expression zeigt sich am deutlichsten in VM-CUB-1 nach PLX-Behandlung, während bei UM-UC-3 geringere Expressionsveränderung zu beobachten war. In HBLAK zeigte sich durch die Kombinationsbehandlung eine deutliche Induktion von *GADD45B*.

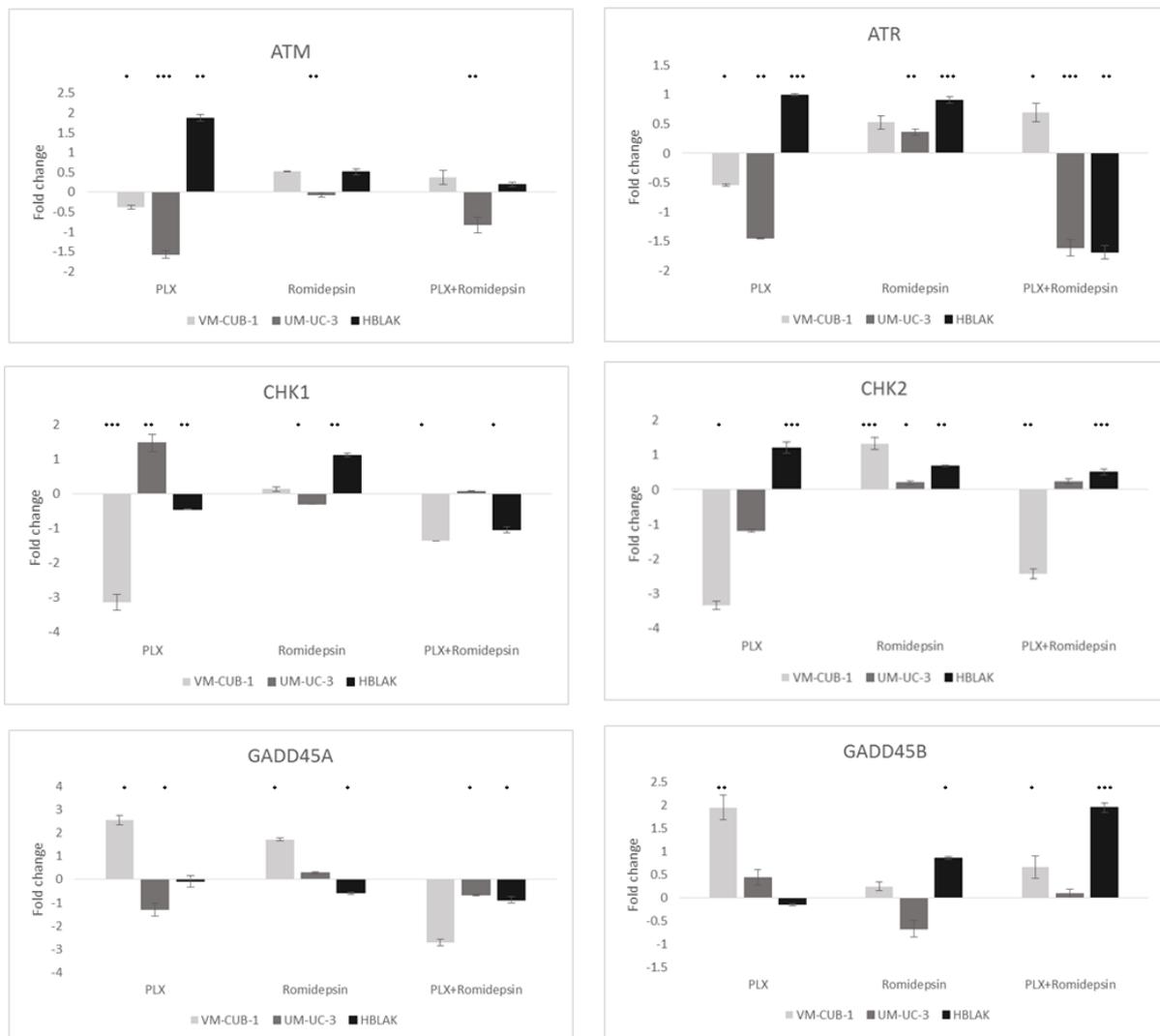


Abb.9: Darstellung der Expressionsveränderung, der in der DNA-Schadensantwort relevanten Gene: *ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2*, *GADD45A* und *GADD45B* nach Inhibitorbehandlung in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK. Die Expression wurde mittels qPCR bestimmt, als Referenzen wurde *TBP* verwendet. Die Expressionsveränderung wird relativ zu der dazugehörigen DMSO-Kontrolle als $\text{Log}_2 \text{ Fold Change}$ angegeben. Das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle entspricht daher 0. Signifikante p-Werte sind als * angegeben. Wobei *** einem p-Wert von $< 0,001$, ** einem p-Wert von $< 0,01$ und * einem p-Wert von $< 0,05$ entspricht. Das Signifikanzniveau wird für die jeweilige Probe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. $n=3$.

3.3.2 Untersuchung der DNA-Reparatur mittels qPCR

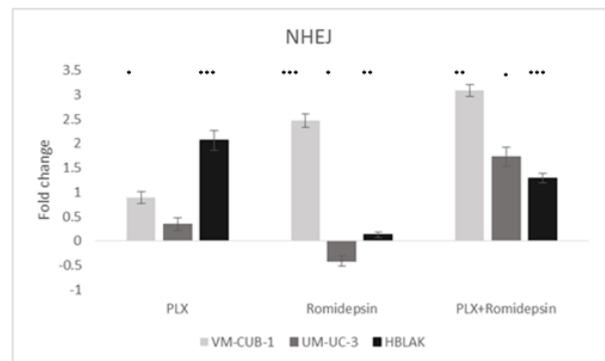
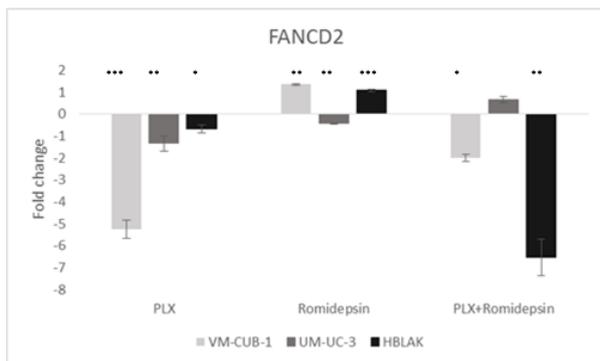
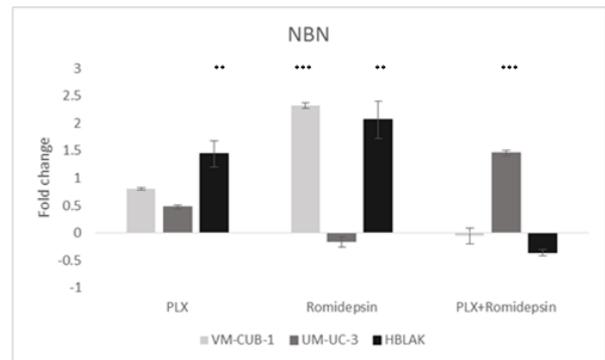
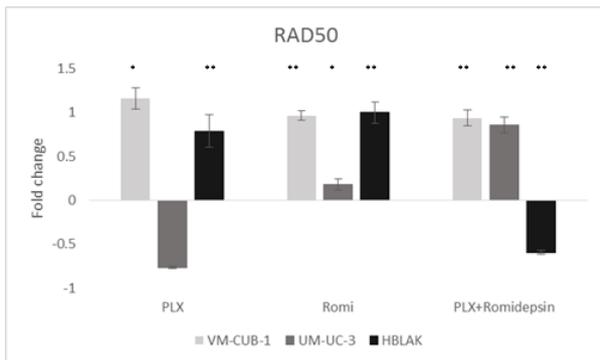
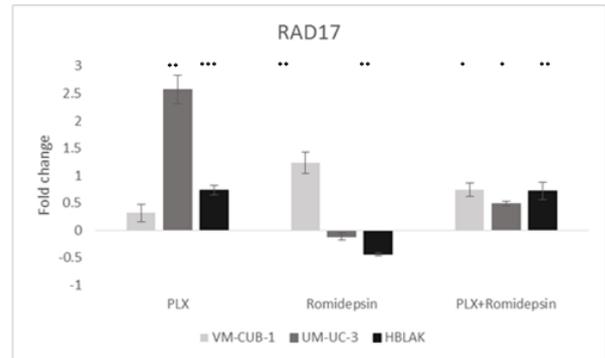
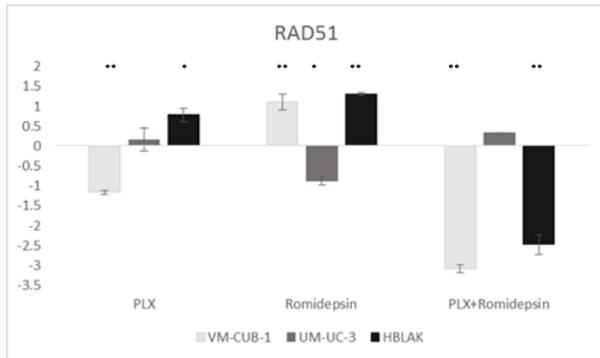
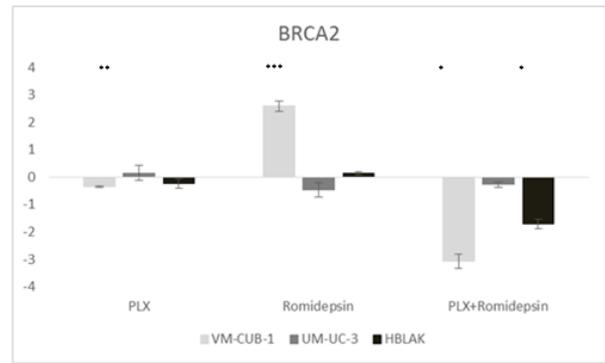
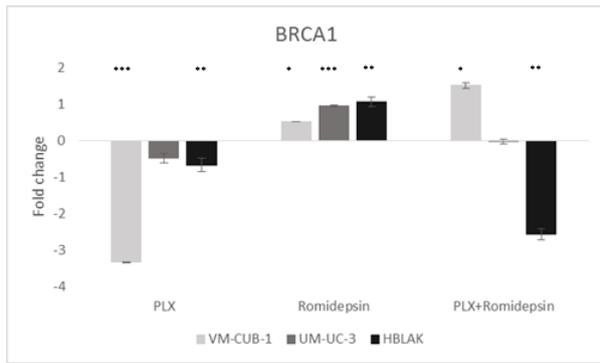
Abbildung 10 zeigt die, durch die Behandlungen mit den Inhibitoren induzierten Veränderungen in der Expression von Genen, die eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden spielen. Die dargestellten Gene sind Faktoren in den einzelnen DNA-Reparaturwegen, die bereits in der Einleitung erläutert wurden. Zudem hatten sich beispielsweise für *BRCA1 und 2* bereits Expressionsveränderungen in den Transkriptom-Ergebnissen gezeigt, sodass diese nochmals validiert werden sollten. Der Einfluss der epigenetischen Inhibitoren auf *PARP1 und 2* ist zudem in Hinblick auf eine mögliche Kombination der epigenetischen Inhibitoren mit einem PARPi relevant.

Wie schon in der Transkriptomanalyse, konnte auch in der qPCR eine Expressionsveränderung von *BRCA1* und 2 nachgewiesen werden. Durch Behandlung mit PLX kam es zu einer verminderten *BRCA1*-Expression in den UCCs und in HBLAK. Am stärksten ausgeprägt war der Effekt bei VM-CUB-1, hier wurde die Expression um den 3-fache Fold Change reduziert. Bei UM-UC-3 und HBLAK waren die Expressionsveränderungen deutlich geringer und zeigen bei Fold Change Werten von -0,5 und -0,6 höchstens einen Trend an. Weniger Einfluss hatte die PLX-Behandlung auf die *BRCA2*-Expression, hier zeigten sich nur eine geringe Verminderung der Expression. Die stärkste Verminderung der Expression konnte hier durch die Kombination von PLX und Romidepsin erzielt werden. Eine Behandlung mit Romidepsin erzeugte eine geringe Expressionssteigerung von *BRCA1* in allen Zelllinien.

Die Expression der Gene *RAD17*, *RAD50*, *NBN* und *NHEJ* wurde durch alle Behandlungen in den Zelllinien in verschiedenem Maße induziert bzw. blieb konstant. Die einzige Ausnahme stellte hier die *RAD50*-Expression in UM-UC-3 nach Behandlung mit PLX dar, diese halbierte sich.

Durch die Behandlung mit PLX und der Kombination vermindert wurden dagegen die Expression der Gene *FANCD2*, *PARP1*, *PARP2* und *ERCC1* in allen Zelllinien. Während die Behandlung mit Romidepsin zu einer Induktion der Genexpression führte. Bei zahlreichen Genen wurden innerhalb derselben Zelllinie oftmals gegenläufige Effekte zwischen PLX und Romidepsin beobachtet. PLX führte häufiger zu Reduktionen.

Die Expression von *RAD51* zeigte in Folge der Behandlungen eine heterogene Veränderung. In VM-CUB-1 halbierte sich, durch die Behandlung mit PLX, die Genexpression. Verstärkt wurde dieser Effekt durch die Kombination mit Romidepsin. Hier sank die Genexpression um den dreifach Fold Change. Wohingegen die Expression in UM-UC-3 auch nach der Behandlung mit PLX und der Kombinationsbehandlung konstant blieb. In HBLAK kam es durch die Einzelbehandlungen mit PLX oder Romidepsin zu einer geringgradigen Induktion. Die Kombinationsbehandlung hatte dagegen eine Verminderung der Expression zur Folge.



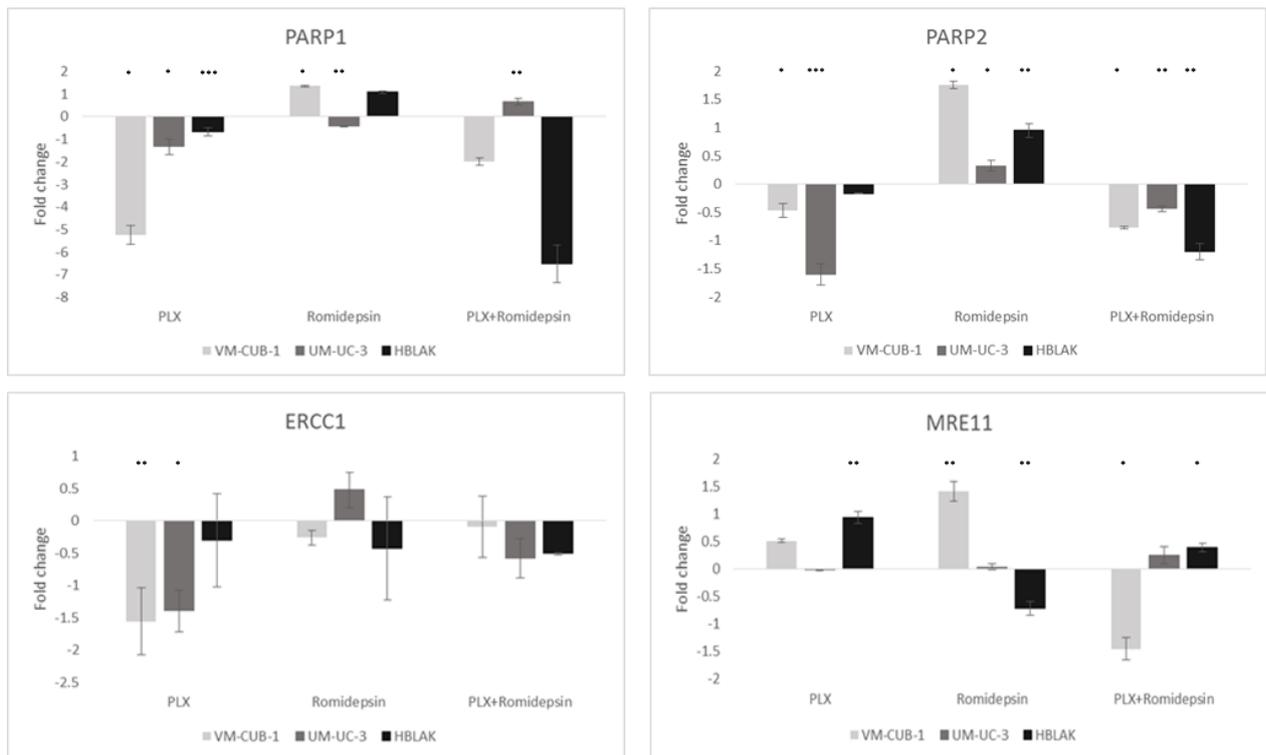


Abb. 10: Darstellung der Expressionsveränderung, der in der Reparatur von DNA-Schäden relevanten Gene: *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *RAD17*, *RAD50*, *NBN*, *FANCD2*, *NHEJ*, *PARP1*, *PARP2*, *ERCC1* und *MRE11* in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK nach Inhibitorbehandlung. Die Expression wurde mittels qPCR bestimmt, als Referenzgen wurde *TBP* verwendet. Die Expressionsveränderung wird relativ zu der dazugehörigen DMSO-Kontrolle als Log₂ *Fold Change* angegeben. Das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle entspricht daher 0. . Signifikante p-Werte sind als * angegeben. Wobei *** einem p-Wert von < 0,001, ** einem p-Wert von < 0,01 und * einem p-Wert von <0,05 entspricht. Das Signifikanzniveau wird für die jeweilige Probe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=3.

3.3.3 Untersuchung der Apoptoseregulation mittels qPCR

Abbildung 11 zeigt die Veränderung der Expression von Genen der Apoptoseregulation. Im Falle der *MCL1*-Expression waren die Veränderung der UC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie gegensätzlich. Die PLX-Behandlung führte in den UCCs zu einer leichten Verminderung, während es bei HBLAK zu einer Induktion der Expression bewirkte. Romidepsin und die Kombinationsbehandlung führten in den UCCs zu einer Induktion mit *Fold Change* Werten von 0,7-1, bei HBLAK zu einer geringen Verminderung der Genexpression. Die *FAS*-Expression der UCCs wurde durch die PLX-Behandlung stark vermindert, dieser Effekt verstärkte sich noch durch die Kombinationsbehandlung. Im Falle der *CASP9* führt die PLX-Behandlung bei UM-UC-3 und HBLAK zu einem Anstieg der Expression, bei VM-CUB-1 zu einer Abnahme. Die Romidepsin und die Kombinationsbehandlung zeigten nur leichte, fraglich relevante Expressionsänderungen. Auch bei Apoptose-assoziierten Genen zeigten sich Unterschiede in der Wirkung von PLX und Romidepsin.

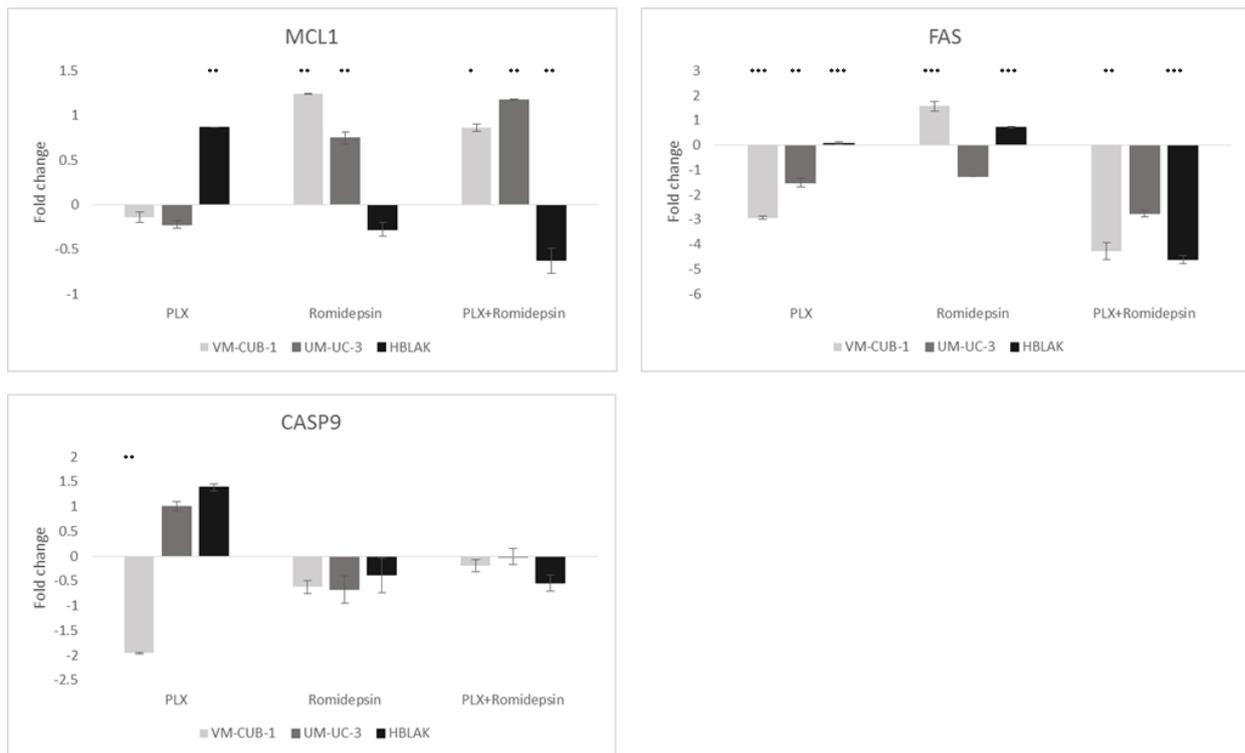


Abb. 11: Darstellung der Expressionsveränderung, der in der Regulation von Apoptose, relevanten Gene: *MCL1*, *FAS* und *CASP9* in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK nach Inhibitorbehandlung. Die Expression wurde mittels qPCR bestimmt, als Referenzgen wurde *TBP* verwendet. Die Expressionsveränderung wird relativ zu der dazugehörigen DMSO-Kontrolle als Log₂ *Fold Change* angegeben. Das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle entspricht daher 0. Signifikante p-Werte sind als * angegeben. Wobei *** einem p-Wert von < 0,001, ** einem p-Wert von < 0,01 und * einem p-Wert von < 0,05 entspricht. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=3.

3.3.4 Untersuchung der Zellzyklusregulation mittels qPCR

Abbildung 12 zeigt zum einen die Veränderung in der Expression von den Zellzyklusregulatoren *CCNB1*, *CCNB2*, *AURKA* und *AURKB*. *CCNB1* und *CCNB2* zeigten nach Inhibitorbehandlung mit PLX und der Kombinationsbehandlung eine Herabregulation der Expression in VM-CUB-1 und HBLAK, während sich die Expression in UM-UC-3 nur leicht vermindert wurde. Die Aurorakinase A (*AURKA*) und die Aurorakinase B (*AURKB*) waren durch die PLX-Behandlung vor allem in VM-CUB-1 stark herabreguliert. In den Zelllinien UM-UC-3 und HBLAK zeigte sich dagegen keine Expressionsveränderung durch die Behandlung. Die Kombinationsbehandlung zeigte häufig ähnliche Effekte wie die PLX-Behandlung.

Nicht unmittelbar an der Zellzyklusregulation beteiligt sind *HEXIM1* und *cMYC*. *HEXIM1* und *cMYC* gelten als Marker für das Ansprechen auf die Behandlung mit BETi. In allen Zelllinien wurde eine starke Expressionssteigerung von *HEXIM1*, durch PLX-Behandlung, induziert. Bei der Kombinationsbehandlung zeigte sich ein vergleichbarer Effekt in den UCCs, in HBLAK kam es zu einer deutlich geringeren Expressionssteigerung. Nach Romidepsinbehandlung zeigte sich, erwartungsgemäß, nur eine geringe Geninduktion in allen Zelllinien. Bei *cMYC* zeigte sich ein heterogenes Ansprechen auf die PLX und Kombinationsbehandlung. Eine Induktion von *cMYC* ließ sich nach PLX-Behandlung in VM-CUB-1 nachweisen, während die anderen Zelllinien kaum Expressionsänderungen zeigten.

Die Kombinationsbehandlung führte zu einer Verringerung der Expression in VM-CUB-1 und zu einer Expressionssteigerung in UM-UC-3.

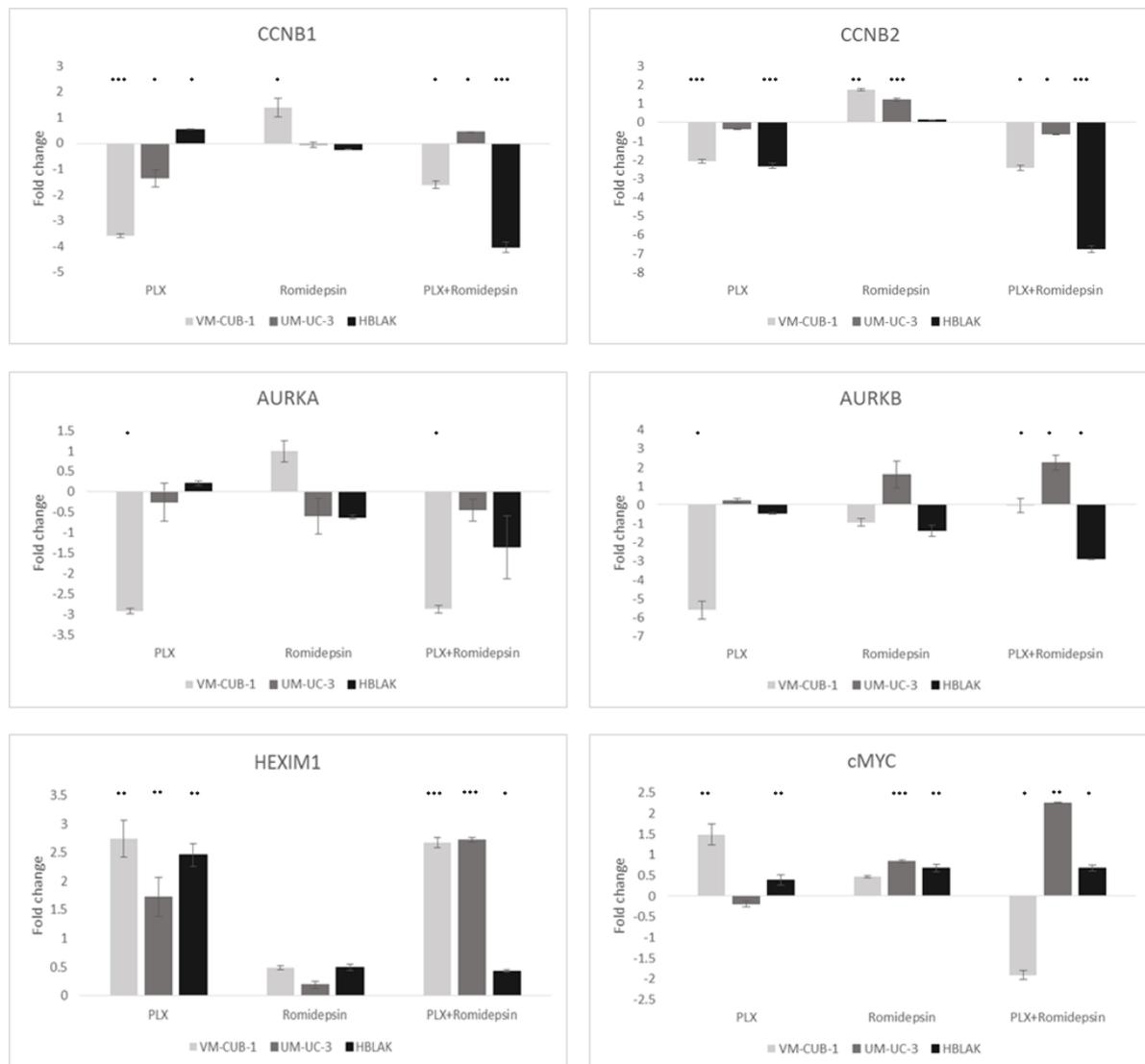


Abb.12: Darstellung der Expressionsveränderung, der in der Regulation des Zellzyklus relevanten Gene, sowie weitere, potenziell durch epigenetische Inhibitoren veränderte, Marker: CCNB1, CCNB2, AURKA, AURKB, HEXIM und cMYC in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK nach Inhibitorbehandlung. Die Expression wurde mittels qPCR bestimmt, als Referenzgen wurde *TBP* verwendet. Die Expressionsveränderung wird relativ zu der dazugehörigen DMSO-Kontrolle als $\text{Log}_2 \text{ Fold Change}$ angegeben. Das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle entspricht daher 0. Signifikante p-Werte sind als * angegeben. Wobei *** einem p-Wert von < 0,001, ** einem p-Wert von < 0,01 und * einem p-Wert von < 0,05 entspricht. Das Signifikanzniveau wird für die jeweilige Probe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=3.

3.3.5 Auswirkung der Inhibitorbehandlung auf das Proteinniveau

Die Effekte der Inhibitorbehandlung auf das Niveau ausgewählter Proteine wurde zusätzlich mittels Western Blot untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Ein deutlich verändertes Proteinniveau konnte bei RAD51 festgestellt werden, hier kam es nach

PLX-Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der Proteinabundanz in den UCCs im Vergleich zur DMSO-Probe. Nach der Behandlung mit Romidepsin kam es ebenfalls zu einer Verminderung, diese war allerdings, verglichen mit der PLX-Behandlung, geringer ausgeprägt. Da bei den HBLAK-Zellen in der DMSO-Probe kein RAD51 nachweisbar war, kann hier keine Aussage über eine eventuelle Abnahme durch die Behandlung getroffen werden.

Das phosphorylierte Histon H2Ax (γ H2Axphos) kann auf das Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen hinweisen und war in allen Zelllinien nach beiden Inhibitorbehandlungen leicht erhöht. Besonders deutlich war die Erhöhung im Fall von UM-UC-3 nach Behandlung mit PLX. Für eine weitere Abklärung des Schadensniveaus müssten immunocytochemische Färbungen durchgeführt werden.

Schwach detektierbar war Cyclin B1, ein Protein der Zellzykluskontrolle, in allen Zelllinien. In den UCCs zeigte sich durch die Inhibitorbehandlung keine Veränderung des Proteinlevels. In HBLAK war Cyclin B1 stärker abundant als in den UCCs, aber auch hier kam es durch die Inhibitorbehandlung nicht zu einer Erhöhung des Proteinlevels.

Cleaved PARP, als Apoptosemarker, war in den UCCs vor allem nach der Behandlung mit PLX erhöht. In HBLAK dagegen zeigte sich keine Erhöhung durch die Behandlung mit den Inhibitoren.

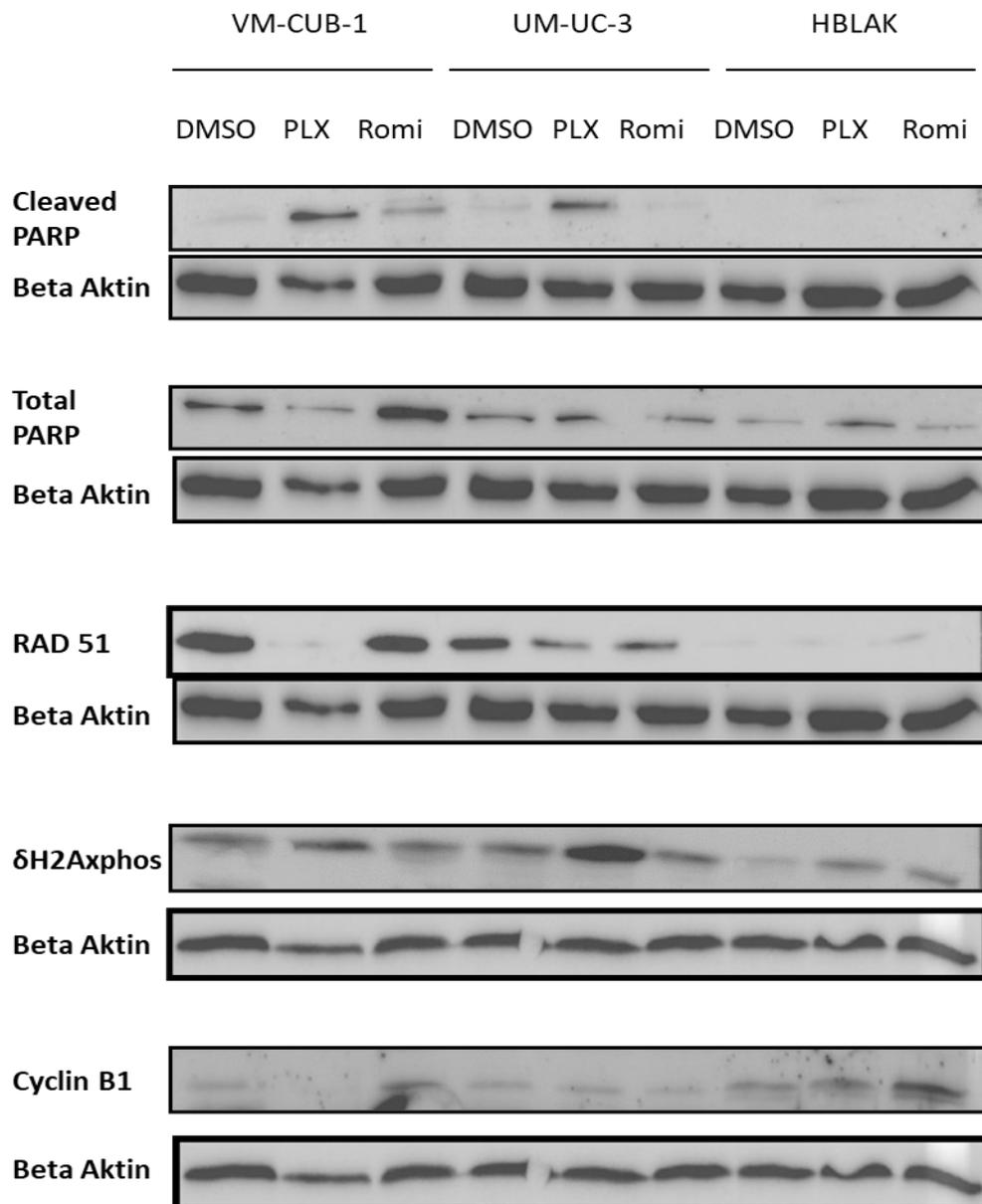


Abb. 13: Western Blot zur Bestimmung der Cleaved PARP, Total PARP, RAD51, γ H2Ax und Cyclin B1 Expression nach Behandlung mit Romidepsin und PLX in den Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK. Die Zellen wurden mit der jeweiligen IC_{50} Konzentration der Zelllinie behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO eingesetzt. Für die Ladungskontrolle wurde Beta Aktin bestimmt.

3.4 Einfluss von Kombinationsbehandlung auf die Viabilität der Zelllinien

Die oben gezeigten Untersuchungen der molekularen Effekte beider epigenetischer Inhibitoren hatte ergeben, dass beide Substanzen teilweise ähnlich, oft aber auch unterschiedliche Effekte auf das Transkriptom von UC-Zellen haben. Die Kombination hatte mäßigen zusätzlichen Effekt. Mit Hinblick auf die DNA-Reparatur zeigte sich, dass vor allem die homologe Rekombination übereinstimmend beeinträchtigt war und ein BRCAness ähnlicher Phänotyp induziert wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellen mit solchen Phänotypen empfindlicher auf DNA-schädigende Substanzen reagieren können. Daher stellte sich die Frage, ob eine kombinierte Behandlung mit Cisplatin- einer

Hauptkomponente des Chemotherapieregimes für das muskel-invasive UC- synergistische Effekte erzielen kann. Zellen mit BRCAness Phänotyp reagieren auch häufig empfindlicher auf Inhibition der DNA-Reparatur, z.B. auf einen PARP-Inhibitor. Daher sollten auch solche Kombinationen zu ihrer Wirkung auf die Viabilität von UC-Zellen untersucht werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Simultanbehandlung, also der gleichzeitigen Gabe aller Substanzen für 72h dargestellt. In der Literatur gab es für BET-Inhibitoren auch Hinweise darauf, dass eine sequentielle Behandlung- z.B. im Sinne eines epigenetischen Primings- effektiver sein könnte. Für die Kombination aus einem dualen epigenetischen mit Gemcitabin wurde dies bei Zellen eines Adenomkarzinom des Pankreas berichtet (Zhang et al., 2020). Daher wurden auch einzelne Kombinationen sequenziell getestet, stellten sich aber nicht als vorteilhaft heraus und sind am Ende des Ergebnisteils gezeigt (s. Abb. 30-34).

Die Effekte verschiedener Kombinationsbehandlungen wurden mittels MTT-Viabilitätstest nach einer 72 h Behandlung der Zellen bestimmt. Aus den Daten wurde neben der Dosiswirkungs-Kurve zudem mittels Chou-Talalay Analyse ein *combination index* ermittelt, der hier mittels *combination index plot* dargestellt wird und Aussagen über die Synergie einer Wirkstoffkombination ermöglicht.

3.4.1 Wirkung der Behandlung mit PLX und Romidepsin auf die Zellviabilität

Zunächst sollte die Wirkung der Kombination aus Romidepsin und PLX untersucht werden, die auch auf molekulare Effekte mittels RNAseq untersucht worden war.

Bei der in Abbildung 14 dargestellten Kombination von PLX und Romidepsin lässt sich, vor allem in den UCCs, eine sehr effektive Abtötung der Zellen beobachten. Die Zellen wurden hierbei mit festen Verhältnissen eines Vielfachen der Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Dosis behandelt, z.B. $0,5x IC_{50} Romi + 0,5x IC_{50} PLX$. Im Falle von VM-CUB-1 wurden bei der Kombinationsbehandlung, ab einer Wirkstoffkonzentration, die der Hälfte des IC_{50} -Wertes entspricht, alle Zellen abgetötet. Bei UM-UC-3 war das bei einer Wirkstoffkonzentration, die dem IC_{50} entspricht der Fall. Allerdings wirkte die Kombination auch sehr effektiv auf die Kontrollzelllinie HBLAK, da diese empfindlich auf den BET-Inhibitor PLX reagieren. Eine stärker synergistische Wirkung einer Kombination in einem niedrigeren Dosisbereich als $1x IC_{50}$ wäre also wünschenswert, damit die Dosierung von PLX zugunsten der benignen HBLAK-Zellen reduziert werden kann.

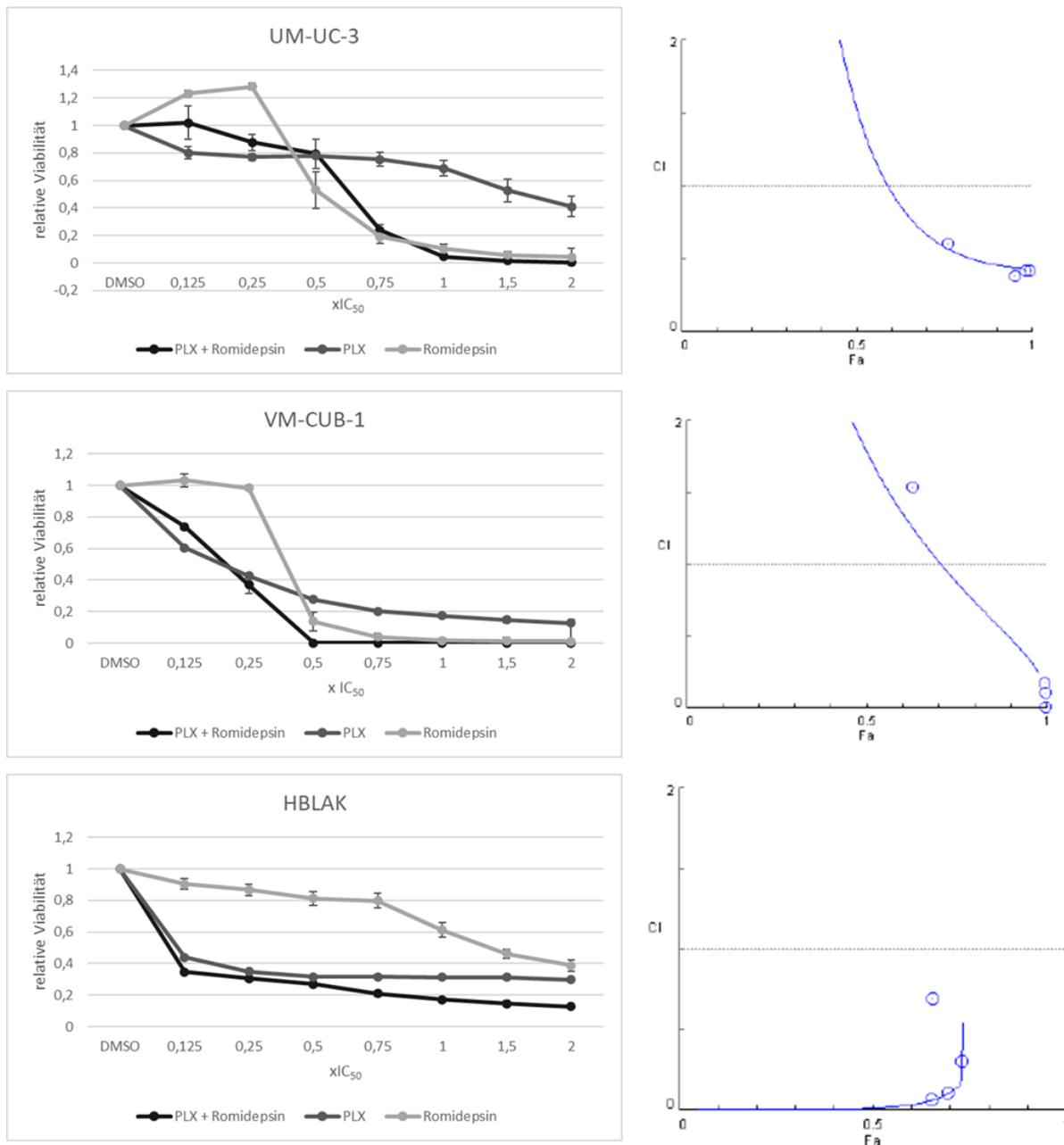


Abb.14: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des *combination index plot* (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung PLX und Romidepsin für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI<1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI>1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.4.2 Wirkung der Behandlung mit TW09 und Cisplatin auf die Zellviabilität.

Zunächst sollte getestet werden, ob ein dualer BET- HDAC-Inhibitor synergistisch mit Cisplatin wirkt. Mit TW09 war dies ohne technische Triple-Behandlung möglich, da es sich bei TW09 um einen Dual-Inhibitor aus JQ1 und dem Klasse I HDAC-Inhibitor Entinostat handelt. Die in Abbildung 15 dargestellte Kombination aus TW09 und Cisplatin zeigte in

beiden UCCs eine synergistische Wirkung in hohen Konzentrationen und eine antagonistische Wirkung im Bereich von niedrigeren Konzentrationen. Durch eine Kombination der Wirkstoffe konnte, vor allem bei hohen Konzentrationen, eine verbesserte Tötung der UCCs erreicht werden. Anders verhielt es sich bei den HBLAKs, hier zeigte sich eine antagonistische Wirkung in allen Konzentrationsstufen und ein geringeres Absterben der Zellen durch die Kombinationsbehandlung als durch Cisplatin alleine. Im *combination index plot* sind nicht alle Konzentrationen dargestellt, da einige CIs größer als 2 und somit nicht mehr auf dem Graphen dargestellt werden. Diese Kombination hatte also günstige Effekte und sollte in zukünftigen Arbeiten weiter im Detail untersucht werden. Da in der vorliegenden Arbeit ein Fokus auf den Substanzen PLX und Romidepsin lag, wurden im Folgenden deren Kombinationen weiter untersucht.

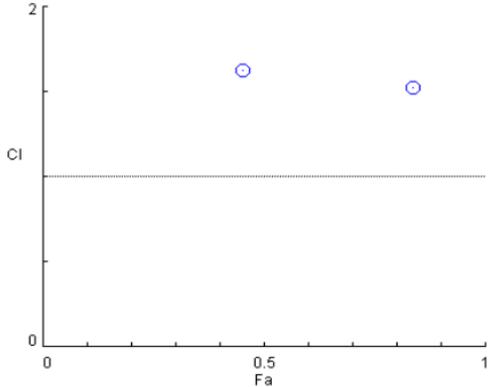
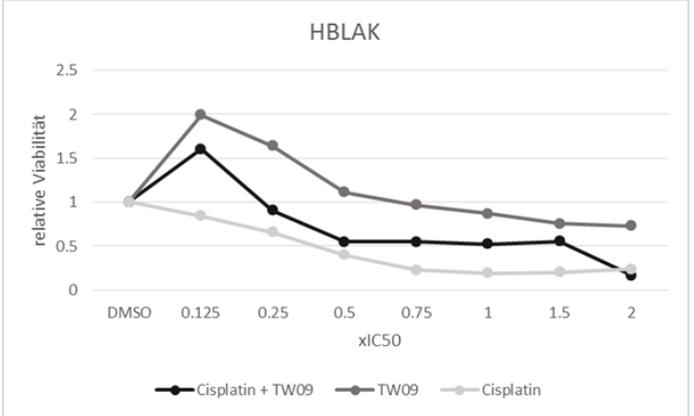
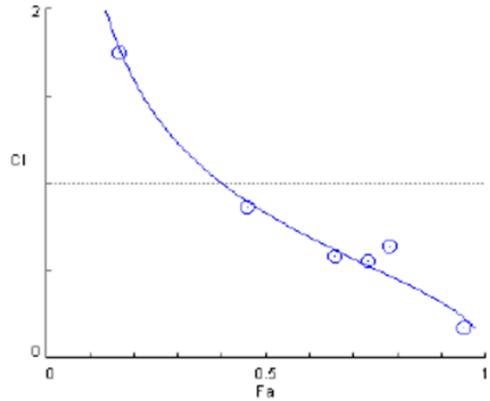
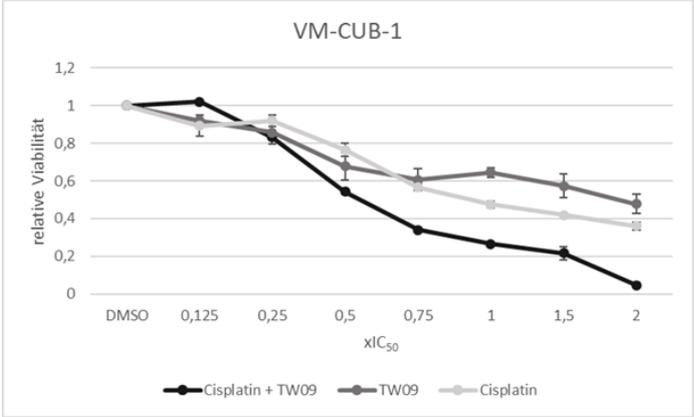
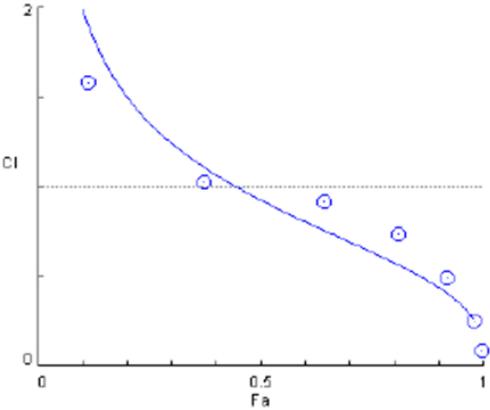
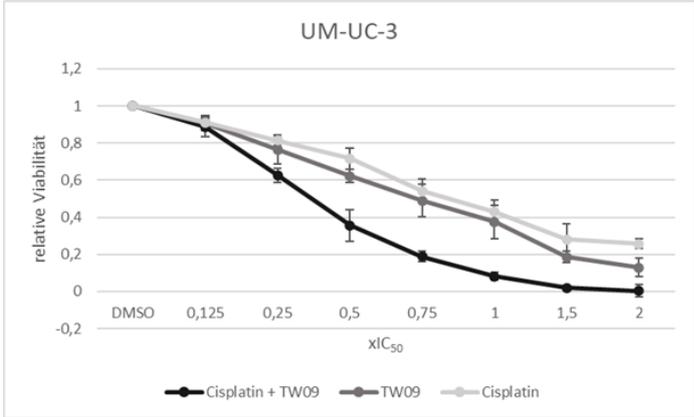
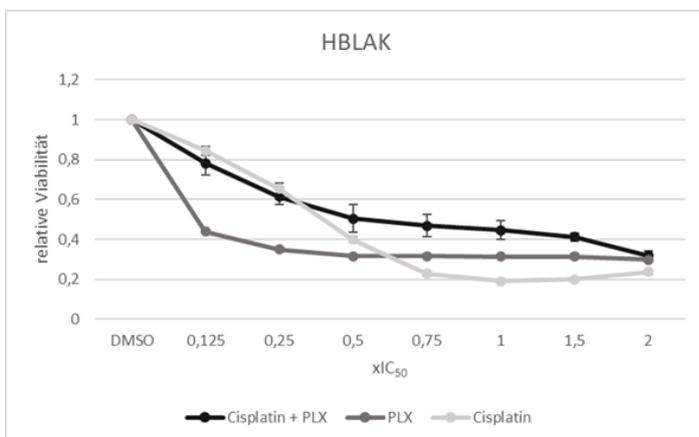
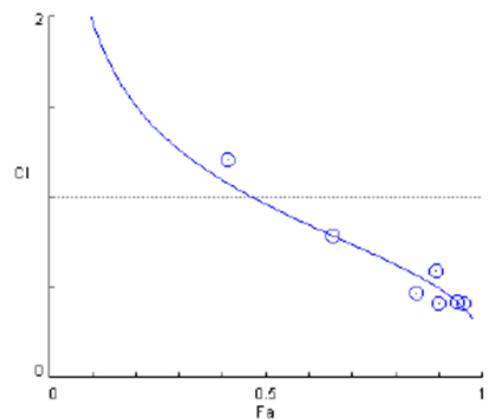
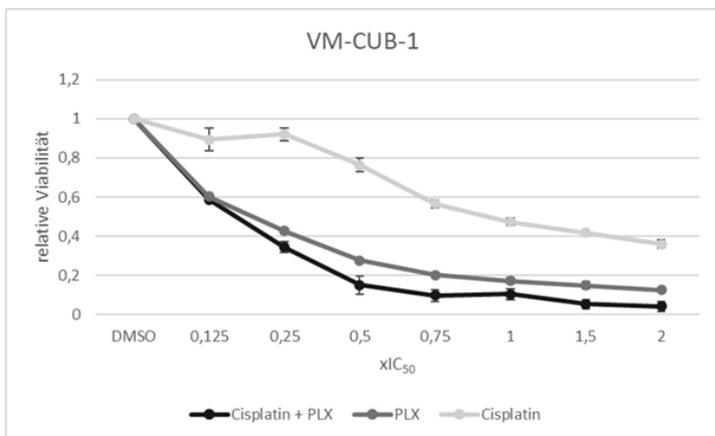
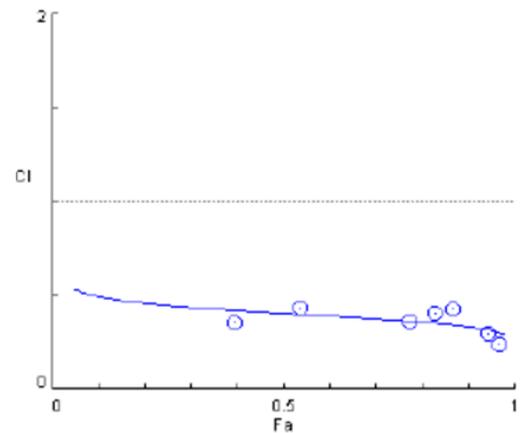
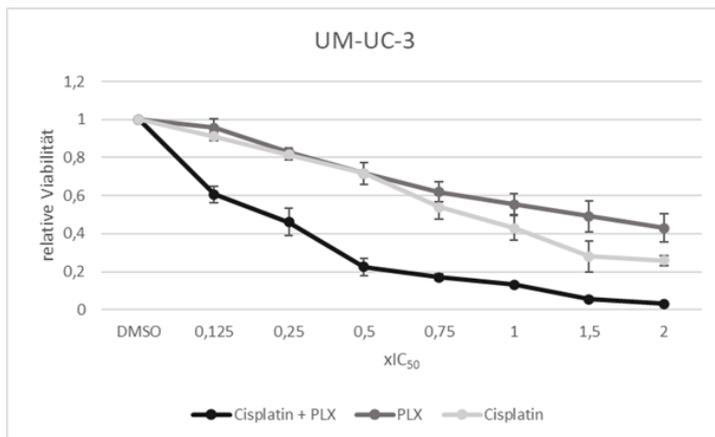


Abb.15: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des *combination index plot* (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung TW09 und Cisplatin für 72 h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI < 1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI > 1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.4.3 Wirkung der Behandlung mit Cisplatin und PLX auf die Zell Viabilität

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Kombination von PLX mit einem potenziell synergistisch wirkenden Wirkstoff untersucht werden sollte, wurde zunächst PLX mit Cisplatin als DNA-schädigende Substanz untersucht.



Kein combination index plot bei CI > 2

Abb.16: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung PLX und Cisplatin für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI < 1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI > 1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

Die, in Abbildung 16 dargestellte Kombination aus PLX und Cisplatin, zeigte sich in den UCCs bei allen Dosispunkten hoch synergistisch. Vor allem in den UM-UC-3 Zellen erwies sich die Kombination, im Vergleich zu den Einzelbehandlungen, als sehr effektiv. Etwas geringer war der Effekt bei den VM-CUB-1 Zellen, da hier die alleinige PLX-Behandlung schon sehr effektiv war. Gegensätzlich war der Effekt in der Kontrollzelllinie HBLAK, hier war die Kombinationsbehandlung am wenigsten toxisch und zeigte in allen Konzentrationen

eine antagonistische Wirkung mit einem CI >2, so dass keine Messpunkte im Diagramm dargestellt werden konnte. Diese Kombination könnte also eine sinnvolle Kombinationsbehandlung für das UC sein und sollte zukünftig weiter untersucht werden.

3.4.4 Wirkung der Behandlung mit Romidepsin und Cisplatin auf die Zellviabilität

Analog wurde die Kombination aus Romidepsin und Cisplatin untersucht. Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigten sich geringere synergistische Effekte als bei der Kombinationsbehandlung mit PLX und Cisplatin. Auch wenn es bei Konzentrationen ab dem 0,75-fachen des IC_{50} zu einer effektiven Abtötung der Zellen kam, sind die synergistische Effekte hier schwächer und zeigten sich hier vor allem in höheren Konzentrationen bei VM-CUB-1 und teilweise auch bei HBLAK. UM-UC-3 wies nur schwache synergistische Reaktionen auf die Behandlung auf, im Falle der geringeren Konzentrationen waren sogar antagonistische Effekte nachweisbar. Somit war die Kombination mit dem HDAC-Inhibitor weniger erfolgsversprechend als die mit dem BET-Inhibitor.

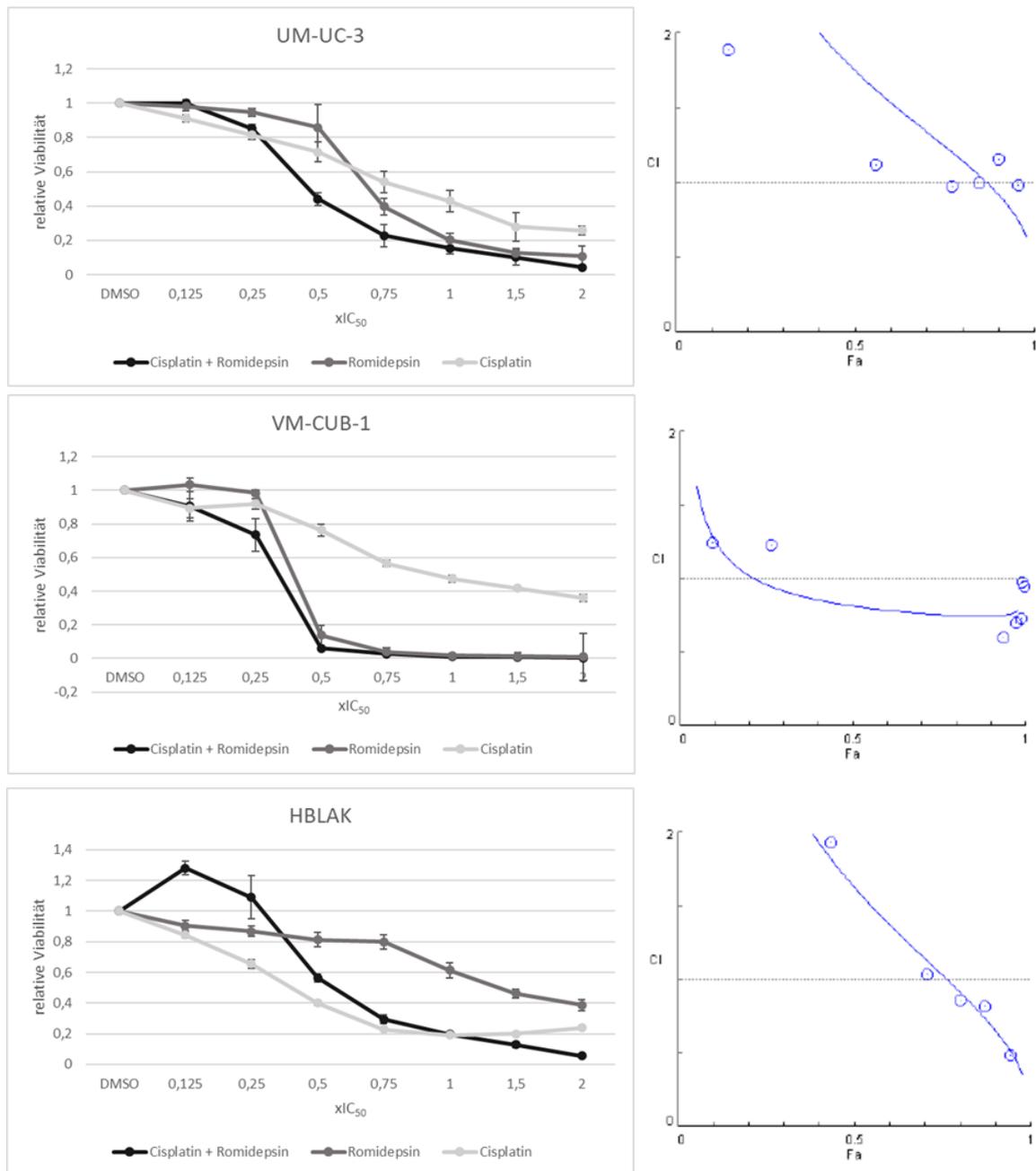


Abb.17: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung Romidepsin und Cisplatin für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: fraction affected, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: combination index. Ein CI<1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI>1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.4.5 Wirkung der Behandlung mit PLX und dem PARP-Inhibitor Talazoparib auf die Zellviabilität

Als weiterer Ansatz für eine Kombinationsbehandlung wurde die durch PLX induzierte BRCaness herausgearbeitet. Um diese für einen synergistischen Effekt zu nutzen, wurde PLX mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib kombiniert.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, wirkte die Kombination aus PLX und Talazoparib in allen untersuchten Zelllinien synergistisch, insbesondere in UM-UC-3. Bei VM-CUB-1 war die antagonistische Wirkung schwächer aber ebenfalls nachweisbar, in dieser Zelllinie war die alleinige Wirkung von PLX bereits stärker. Auffällig war zudem, dass eine Einzelbehandlung mit Talazoparib in beiden Zelllinien der UCCs, außer in hoher Konzentration, nur einen geringen Effekt auf das Überleben der Zellen hatte. Anders verhielt es sich mit den HBLAK Zellen, hier verminderte die Einzelbehandlung Talazoparib die Viabilität der Zellen bereits deutlich. Auch hier wies die Kombinationsbehandlung einen synergistischen Effekt in allen Konzentrationsstufen auf. Diese Kombination ist also sehr effektiv für die Reduktion der Zellviabilität, müsste aber genauer zu möglichen Dosisreduktionen untersucht werden, um benigne HBLAK Zellen weniger zu schädigen. Auch die Wirkung nicht fixer Verhältnisse des IC_{50} sollte untersucht werden.

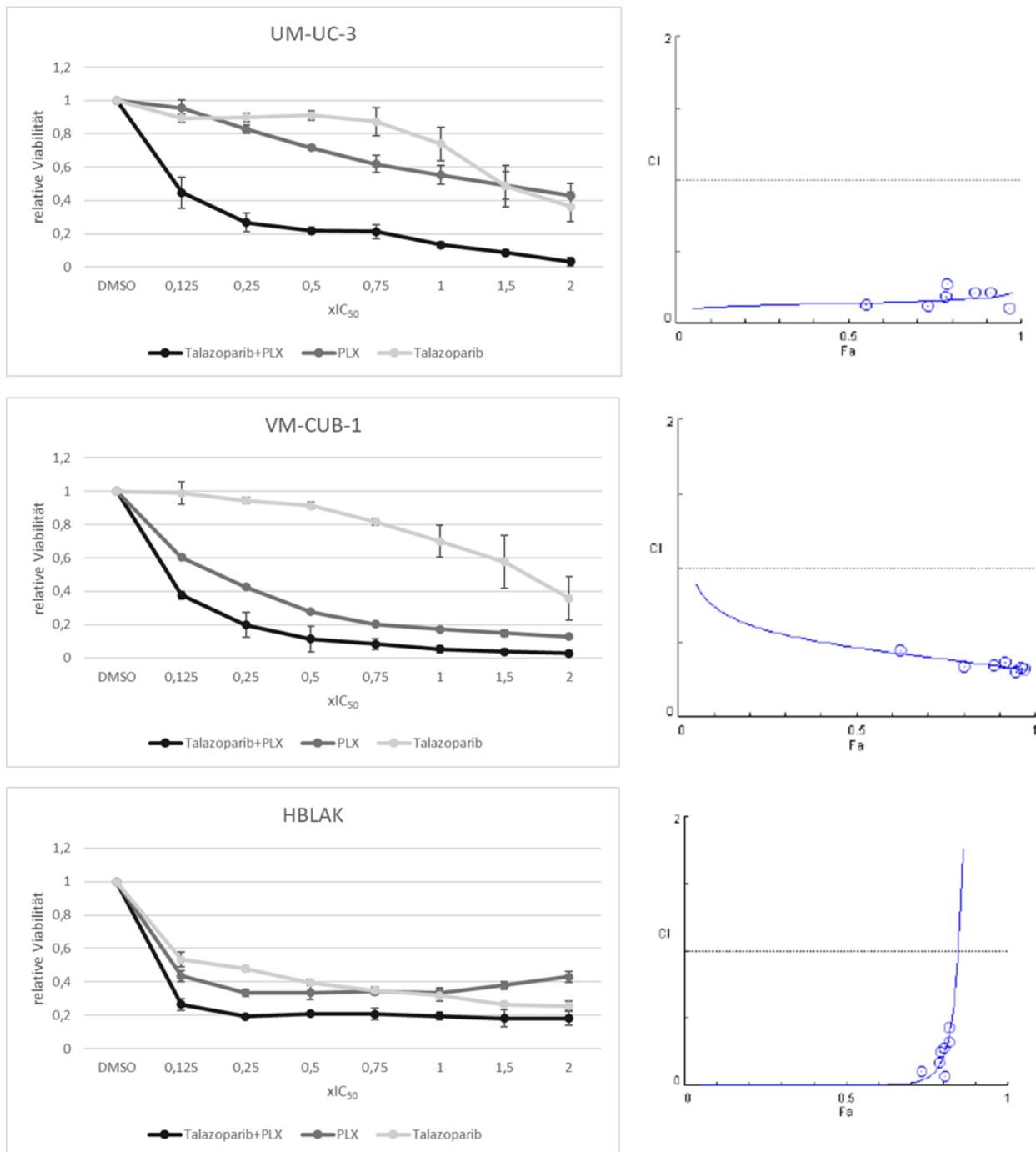


Abb.18: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des *combination index plot* (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung mit PLX und Talazoparib für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI<1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI>1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.4.6 Wirkung der Behandlung mit Romidepsin und Talazoparib auf die Kurzzeitproliferation

Analog zu der Kombination mit PLX wurde die Kombination aus Romidepsin und Talazoparib untersucht (Abb. 19). In der Kombination konnte, bei VM-CUB-1, wie auch bei

UM-UC-3, eine synergistische Wirkung der Behandlung festgestellt werden. Die Einzelbehandlung mit Talazoparib hatte auf die UCCs auch in diesem Versuch wenig Einfluss, während eine Einzelbehandlung mit Romidepsin, auch ohne eine Kombination mit Talazoparib, bereits zu einer effektiven Abtötung der Zellen führte. Bei dem Vergleich der Kombinationsbehandlung aus Romidepsin und Talazoparib mit der Kombination aus PLX und Talazoparib, fällt auf, dass die synergistischen Effekte in der Kombination mit PLX in beiden Zelllinien der UCCs stärker waren, vor allem in UM-UC-3, obwohl diese Zelllinie weniger sensitiv gegenüber einer Monobehandlung mit PLX ist, als VM-CUB-1 Zellen. In der Kontrollzelllinie hat die Behandlung in niedrigeren Konzentrationen antagonistische Wirkung, in Konzentrationen ab dem 0,75-fachen der IC_{50} -Konzentration wirkte die Kombination synergistisch. Mit dieser Kombination ergibt sich also ein vergleichbares Problem mit der Notwendigkeit einer Dosisreduktion zur Schonung von normalen Urothelzellen.

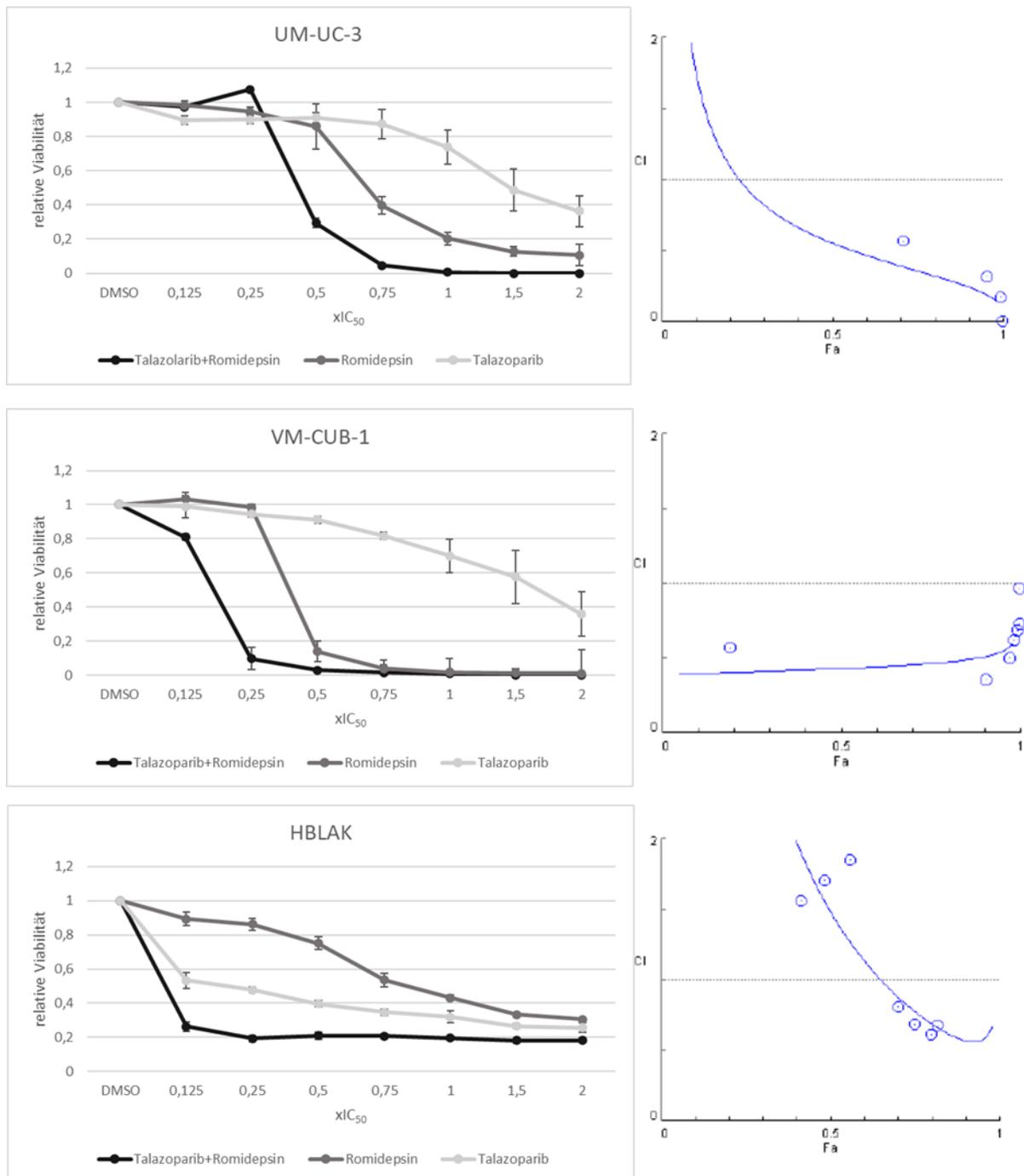


Abb.19: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung mit Romidepsin und Talazoparib für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI<1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI>1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.4.7 Wirkung der Behandlung mit einer reduzierten Dosis epigenetischer Inhibitoren auf die Zellviabilität

Durch die bisherigen Analysen konnten also hoch effektive, synergistische Kombinationsbehandlung identifiziert werden, die jedoch bei festen Dosisverhältnissen

auch relevant toxisch auf benigne HBLAK-Zellen wirkten. Daher sollte im Folgenden geprüft werden, ob auch nicht feste Dosisverhältnisse, speziell mit reduzierten Dosierungen der epigenetischen Inhibitoren, vergleichbar wirksam sein könnten für die Viabilitätsreduktion von UC-Zellen. Dazu wurde mit einer gleichbleibenden Konzentration an Talazoparib (der für alle Zelllinien bestimmte IC_{50} -Wert von $1 \mu\text{M}$) und einer sich steigernden Konzentration an PLX bzw. Romidepsin behandelt. Ziel war es die Effekte einer Behandlung unabhängig von dem IC_{50} der einzelnen Zelllinie zu beurteilen. Im Fall von UM-UC-3 lagen sämtliche PLX-Konzentrationen unter dem Zelllinien spezifischen IC_{50} von $8,8 \mu\text{M}$. Durch die Kombination mit einem $1 \mu\text{M}$ Talazoparib konnte die Effektivität der Behandlung jedoch verbessert werden und eine relative Viabilität von unter 10 % erzielt werden. Bereits bei einer sehr niedrigen Dosierung von PLX ($0,5 \mu\text{M}$), was nur 5,6 % der zelllinienspezifischen IC_{50} -Konzentration entspricht, eine relative Viabilität von 20 % erzielt werden (Abb. 20). Im Falle von VM-CUB-1 und HBLAK, Zelllinien, die eine deutlich geringere IC_{50} -Konzentration aufweisen als UM-UC-3, führte bereits eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ PLX zu einer relativen Viabilität von unter 20 %. Bei PLX-Konzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ konnte die Effektivität der Behandlung jedoch durch die Kombination mit Talazoparib zusätzlich gesteigert werden, so dass auch hier Dosisreduktionen mit niedrigerer Normaltoxizität effektiv waren (Abb. 20).

Bei der Kombinationsbehandlung mit Romidepsin ergab sich ein vergleichbares, wenn auch weniger deutliches Ergebnis. Bei Konzentrationen unter 2 nM Romidepsin konnte die Kombinationstherapie die Effektivität der Behandlung auf die Zelllinie UM-UC-3 in geringem Maß steigern, bei Konzentrationen über 2 nM glichen sich die Effekte der Kombinationstherapie und der Einzeltherapie Romidepsin an. In den Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK glich die Effektivität der Einzeltherapie mit Romidepsin der Kombinationstherapie.

Zusammengefasst deutet sich also eher ein therapeutisches Fenster mit reduzierter Nebentoxizität für die PLX-basierten Kombinationen an.

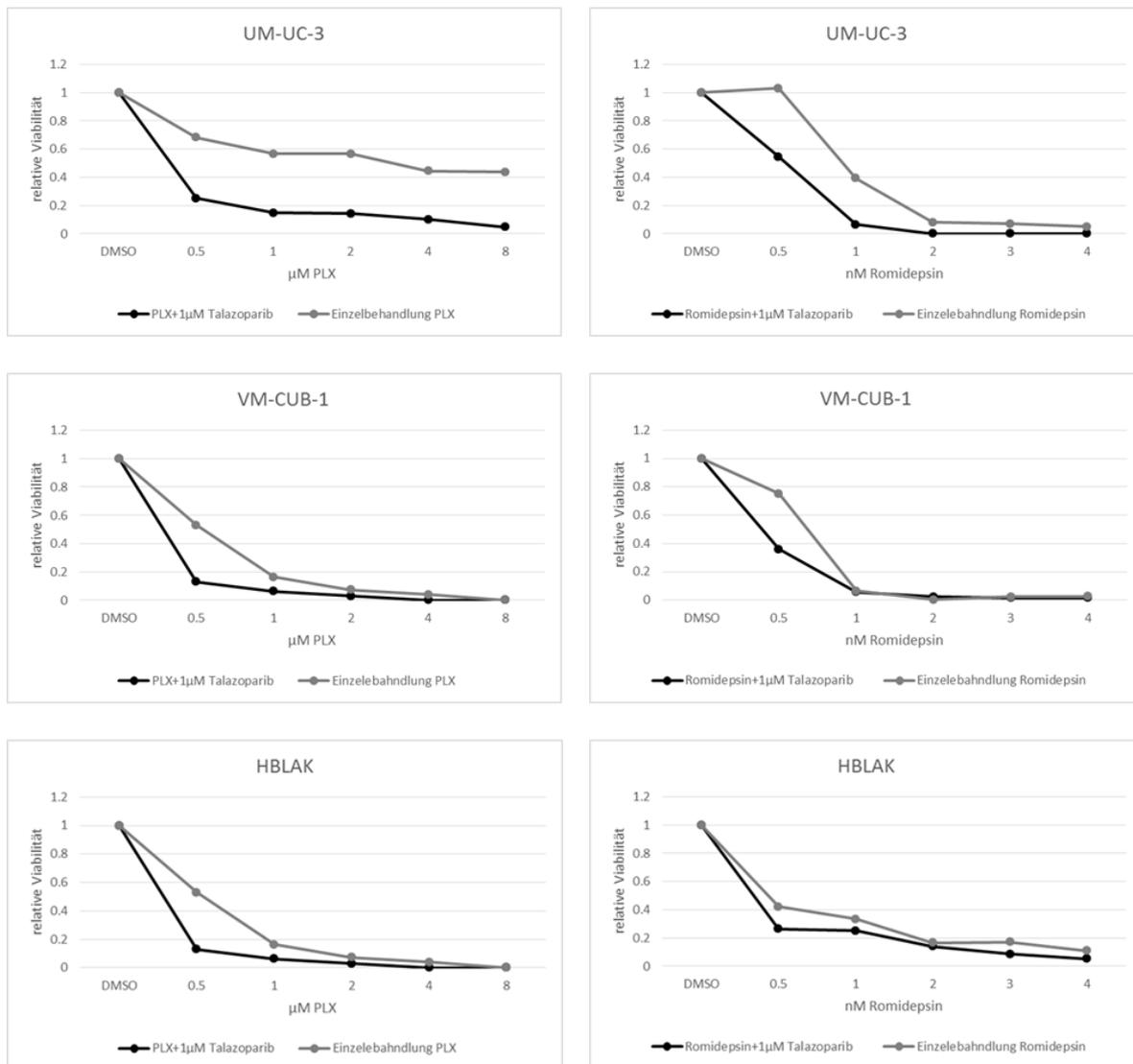


Abb. 20: Bestimmung der Zellviabilität (links) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach simultaner Kombinationsbehandlung mit Romidepsin und jeweils 1 μM Talazoparib (rechts) und PLX mit jeweils 1 μM Talazoparib (links) für 72h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.5 Wirkung von Kombinationsbehandlung auf die Langzeitproliferation der Zelllinien

Nachdem in Viabilitätstests sowohl Cisplatin wie auch Talazoparib als geeignete synergistisch wirkende Kombinationspartner für PLX herausgearbeitet wurden, wurden Klonogenitätstests durchgeführt, um den Effekt auf die Langzeitproliferation zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen mit dem den jeweiligen Wirkstoffen für 72 h behandelt und danach erneut verdünnt ausgesät, sodass sich die Einzelzellen erneut zu Kolonien auswachsen mussten. Nach zwei Wochen erfolgte das Fixieren und Färben der Zellen.

3.5.1 Wirkung der Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib in voller und reduzierter Dosierung auf die Langzeitproliferation

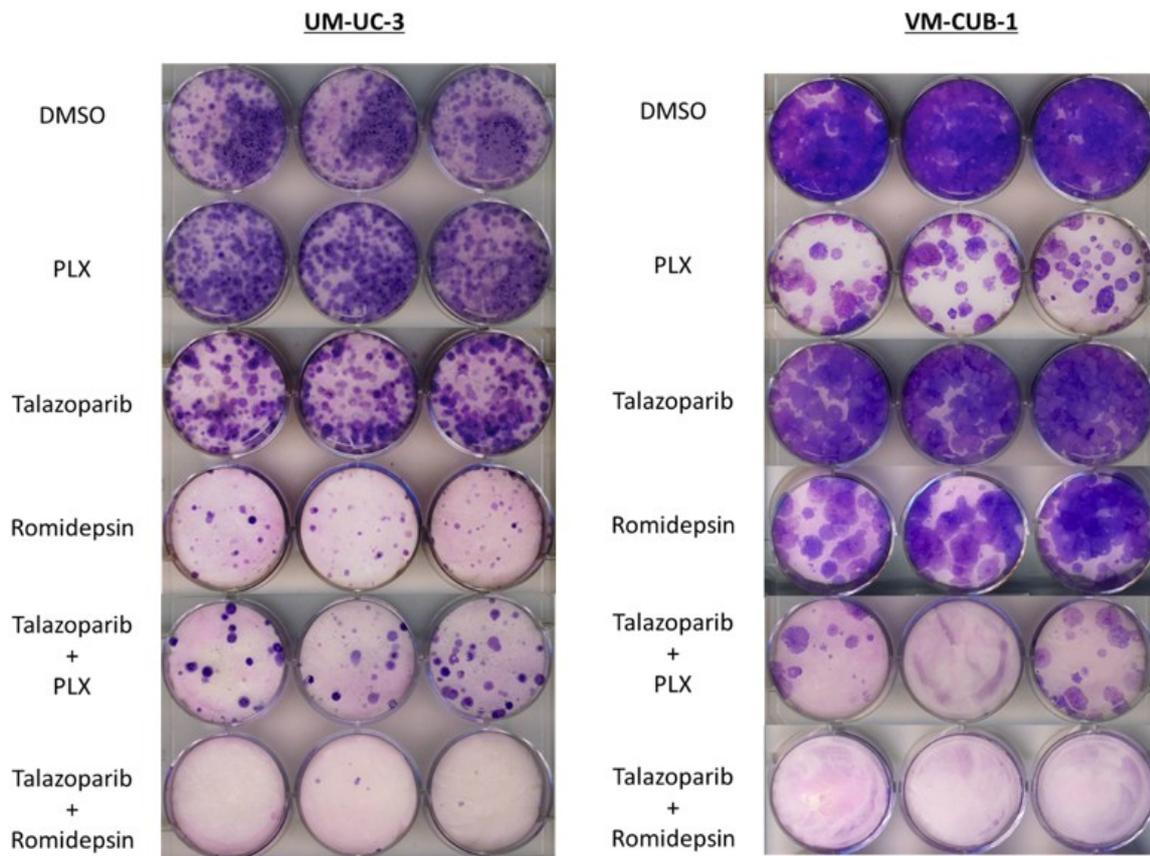


Abb.21: Giemsa-Färbung der Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit der IC_{50} Dosis von PLX, Romidepsin und Talazoparib. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 72 h, die Wirkstoffkonzentration entsprach dem IC_{50} der jeweiligen Zelllinie. Anschließend wurden die Zellen erneut in geringer Zellzahl ausgesät. Nach einer zweiwöchigen Inkubation erfolgte die Giemsa-Färbung. Die Lösungsmittelprobe wurde mit DMSO behandelt.

In Abbildung 21 sind Ergebnisse der Klonogenitätstests der Einzel- und Kombinationsbehandlung mit einer Wirkstoffkonzentration, die dem IC_{50} der Zelllinie entspricht, dargestellt. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse nach Behandlung mit einer reduzierten Konzentration, die dem 0,5-fachen der IC_{50} Dosis der Zelllinie VM-CUB-1 entspricht. Durch die Einzelbehandlungen mit PLX oder Talazoparib wurde die Proliferation bei beiden Wirkstoffkonzentrationen begrenzt gehemmt. Die Kombinationsbehandlung aus PLX und Talazoparib führte bei beiden UC-Zelllinien zu einer deutlich stärkeren Hemmung des Koloniewachstums im Vergleich zu der Einzelbehandlung. Diese Hemmung war bei beiden Konzentrationen nachweisbar.

Die Einzelbehandlung mit Romidepsin wurde nur mit der erhöhten Konzentration durchgeführt. Im Falle von UM-UC-3 hemmte sowohl die Einzel wie auch die Kombinationsbehandlung das Koloniewachstum effektiv. Im Fall von VM-CUB-1 scheint vor allem die Kombinationsbehandlung die Proliferation der Zellen zu hemmen.

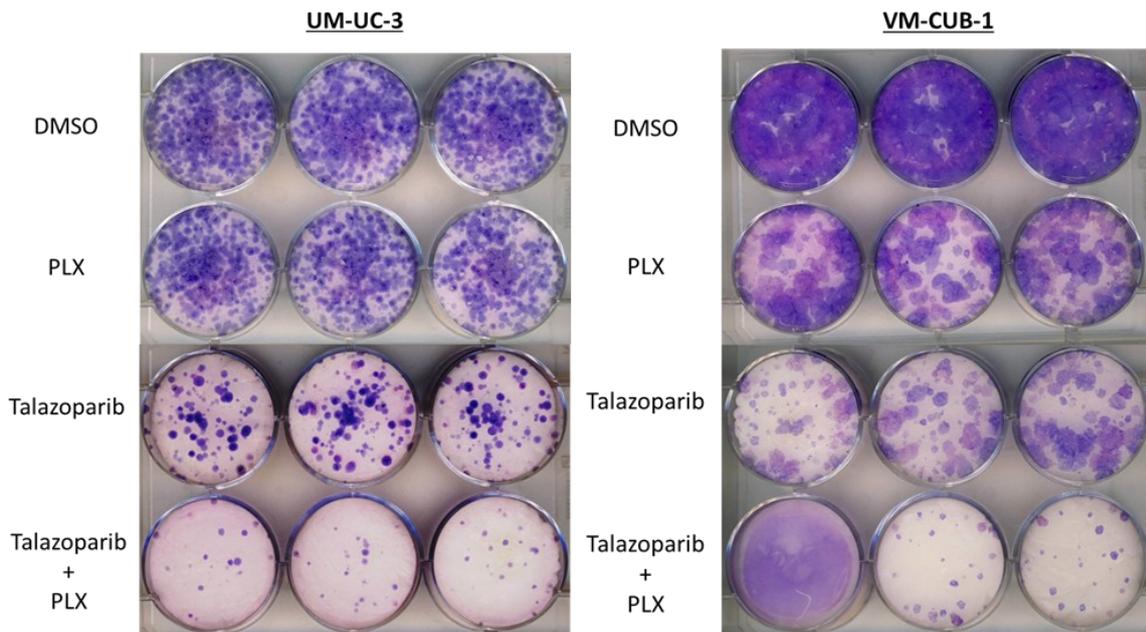


Abb. 22: Giemsa-Färbung der Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit reduzierter Dosis von PLX und Talazoparib. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 1 μM PLX und 0,5 μM Talazoparib für 72h. Anschließend wurden die Zellen erneut in geringer Zellzahl ausgesät. Nach einer zweiwöchigen Inkubation erfolgte die Giemsa-Färbung. Die Lösungsmittelprobe wurde mit DMSO behandelt.

3.5.2 Wirkung der Behandlung mit PLX und Cisplatin auf die Langzeitproliferation

Abbildung 23 stellt Ergebnisse der Klonogenitätstests nach Behandlung der Zellen mit Cisplatin und PLX dar. Die Zellen wurden hierbei mit einer reduzierten Wirkstoffkonzentration von 2,5 μM Cisplatin behandelt, das entspricht für VM-CUB-1 dem 0,5 fachen des IC_{50} für Cisplatin und bei UM-UC-3 dem 0,4 fachen des IC_{50} . In beiden Zelllinien hemmten die Einzelbehandlungen mit PLX und Cisplatin das Zellwachstum mäßig. Durch die Kombination von PLX und Cisplatin konnte eine deutlich gesteigerte Hemmung des Zellwachstums in beide Zelllinien erzielt werden, trotz der Reduktion der Wirkstoffkonzentration in der Behandlung.

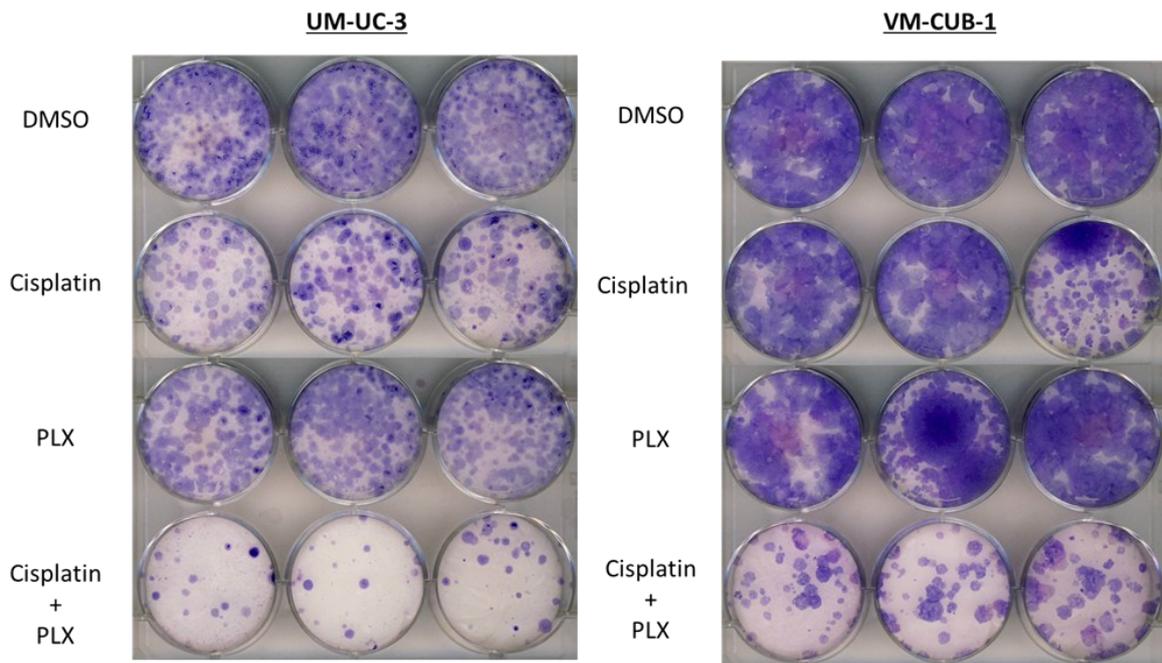


Abb.23: Giemsafärbung der Zelllinien VM-CUB-1 und UM-UC-3 nach Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit PLX und Cisplatin. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 1 μ M PLX und 2,5 μ M Cisplatin für 72 h. Anschließend wurden die Zellen erneut in geringer Zellzahl ausgesät. Nach einer zweiwöchigen Inkubation erfolgte die Giemsafärbung. Die Lösungsmittelprobe wurde mit DMSO behandelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Kombination von PLX und Talazoparib und auch die Kombination von PLX und Cisplatin zu einer effektiven Hemmung der Langezeitproliferation führt. Dieser Effekt ist auch bei reduzierten Dosierungen nachweisbar. Die Kombination mit Talazoparib schien jedoch überlegen.

3.6 Effekte der Kombinationsbehandlungen auf die Apoptoseinduktion

Um den Einfluss, den die Einzel und Kombinationsbehandlung auf die Apoptoseinduktion der Zelle haben, zu untersuchen, wurden Apoptosemessungen mittels FACS-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit Propidium-Iodid und einem Annexin V-Konjugat gefärbt. Abbildung 24 zeigt beispielhaft ein Diagramm, einer solchen Apoptose-Messung. Sie teilt die Zellen in lebendige, früh-apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zustände ein.

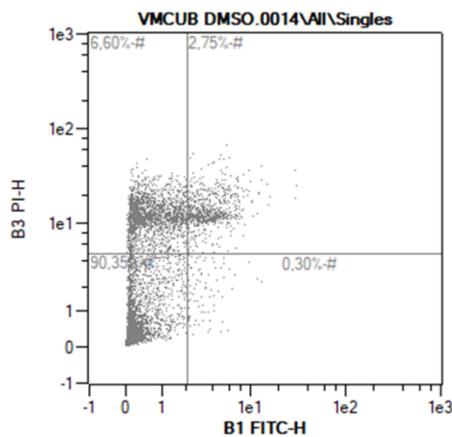


Abb.24: Beispiel-Diagramm einer Zelltodmessung mittels FACS. Die im unteren linken Quadranten lokalisierten Punkte, zeigen die vitalen Zellen, die im oberen linken Quadranten die nekrotischen Zellen, die im unteren rechten Quadranten die früh-apoptotischen Zellen und die im oberen rechten Quadranten die spät-apoptotischen Zellen.

3.6.1 Apoptoseinduktion nach Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib

In den Voruntersuchungen zur Langzeit- und Kurzzeitviabilität, hat sich die Kombination eines epigenetischen Inhibitors mit Talazoparib, als ein vielversprechender Kombinationspartner für epigenetische Inhibitoren gezeigt. Weiterführend wurde deswegen, für ein besseres Verständnis über die genaue Wirkung der Kombinationsbehandlung mit reduzierten Dosen, auf die Apoptoseinduktion untersucht.

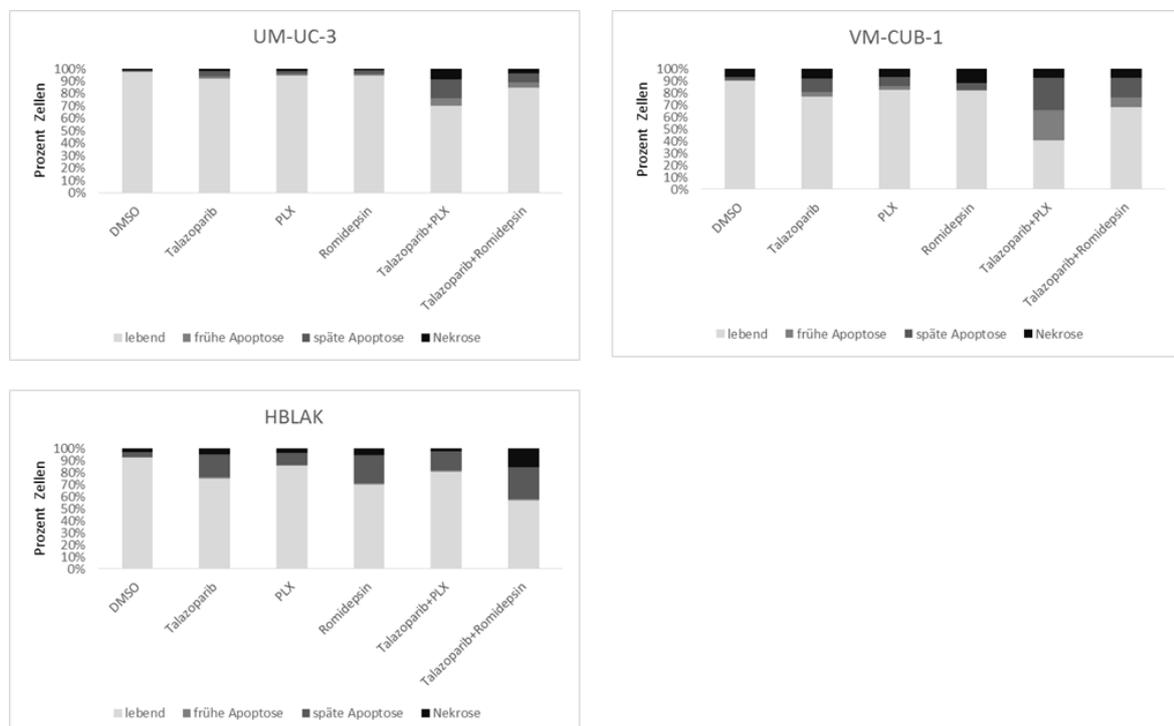


Abb.25: Wirkung der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Apoptoseinduktion der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK. Behandlung der Zellen mit 1 nM Romidepsin, 0,6 µM PLX und 0,5 µM Talazoparib für 72 h. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

Abbildung 25 zeigt die Wirkung der Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Romidepsin/ PLX und Talazoparib auf die Apoptoseinduktion in den Zellen. In beiden UCC-Zelllinien zeigte sich, im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle, eine leichte Apoptoseinduktion durch die Einzelbehandlungen mit PLX, Romidepsin oder Talazoparib. Im Falle von UM-UC-3 sank die Zahl der vitalen Zellen von 97 % auf 94 %, bei VM-CUB-1 sanken die vitalen Zellen von 90 % auf 76-82 %. Eine deutlich stärkere Induktion der Apoptose wurde durch eine Kombinationsbehandlung, vor allem durch die Kombination PLX und Talazoparib, erreicht. Durch die Behandlung kam es zu einem starken Anstieg der früh- und spät-apoptotischen Zellen. Bei UM-UC-3 stieg der Anteil der früh-apoptotischen Zellen von 0,3 % auf 6 % und der Anteil der spät-apoptotischen Zellen von 1,1 % auf 14 %. Bei VM-CUB-1 stiegen die früh-apoptotischen Zellen von 0,3 % auf 24 % und die spät-apoptotischen Zellen von 2,7 % auf 27 %. Auch die Kombinationsbehandlung aus Romidepsin und Talazoparib induzierte Apoptose, allerdings weniger stark als die Kombination von PLX mit Talazoparib. In den HBLAK Zellen wiederum zeigten die Behandlungen andere Effekte. Hier kam es vor allem zur Steigerung des Anteils spät-apoptotischer Zellen, sowohl durch die Einzelbehandlungen wie auch durch die Kombinationsbehandlungen. Dieser Effekt war bei der Kombination aus Romidepsin und Talazoparib am stärksten ausgeprägt, diese Behandlung führte auch zu einer Verfünffachung der nekrotischen Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Auch hier zeigte sich also die Kombination von Talazoparib mit PLX gegenüber einer Kombination mit Romidepsin überlegen.

3.6.2 Apoptoseinduktion nach Behandlung mit PLX und Cisplatin

Analog zu Talazoparib wurde auch die Kombinationsbehandlung aus PLX und Cisplatin untersucht, auch im Hinblick auf die Frage, ob sich eine der Kombinationsbehandlungen überlegen zeigt. Da in den Voruntersuchungen, die Kombination aus PLX und Cisplatin, der aus Romidepsin und Cisplatin überlegen war, wurde hier ausschließlich die Kombination PLX plus Cisplatin mit reduzierter Dosierung untersucht.

In Abbildung 26 ist die Wirkung der Behandlung mit PLX und Cisplatin auf die Zelllinien dargestellt. Auf UM-UC-3 zeigte die Behandlung, welche hier mit der Konzentration deutlich unter den IC_{50} -Werten von 8,8 μ M PLX und 4 μ M Cisplatin lag, die geringste Wirkung. Durch die Behandlung war lediglich ein leicht gesteigerter Anteil spät-apoptotische Zellen (Anstieg von 0,07 % auf 5 %) zu beobachten. Auf VM-CUB-1, als Zelllinie mit geringeren IC_{50} -Werten für PLX und Cisplatin, hatte die Behandlung einen deutlich stärkeren Effekt, jedoch nicht viel stärker als die PLX-Monobehandlung. Bei der Kombinationsbehandlung war eine Verdreifachung der nekrotischen Zellen und eine Verzehnfachung der spät-apoptotischen Zellen nachweisbar. Bei der Zelllinie HBLAK kam es zu einer Verfünffachung der spät-apoptotischen Zellen, während der Anteil der früh-apoptotischen nur leicht anstieg und im Falle der nekrotischen Zellen fast konstant blieb. Die Kombination mit Cisplatin war also der mit dem PARP-Inhibitor nicht überlegen. Im Falle der UCCs, vor allem bei UM-UC-3, zeigte sich bei der Behandlung mit Talazoparib und PLX, sogar eine deutlich effektivere Induktion der Apoptose als bei der Kombinationsbehandlung mit Cisplatin, während es gleichzeitig, durch Talazoparib, zu einer geringeren Beeinträchtigung der HBLAK Zellen kam.

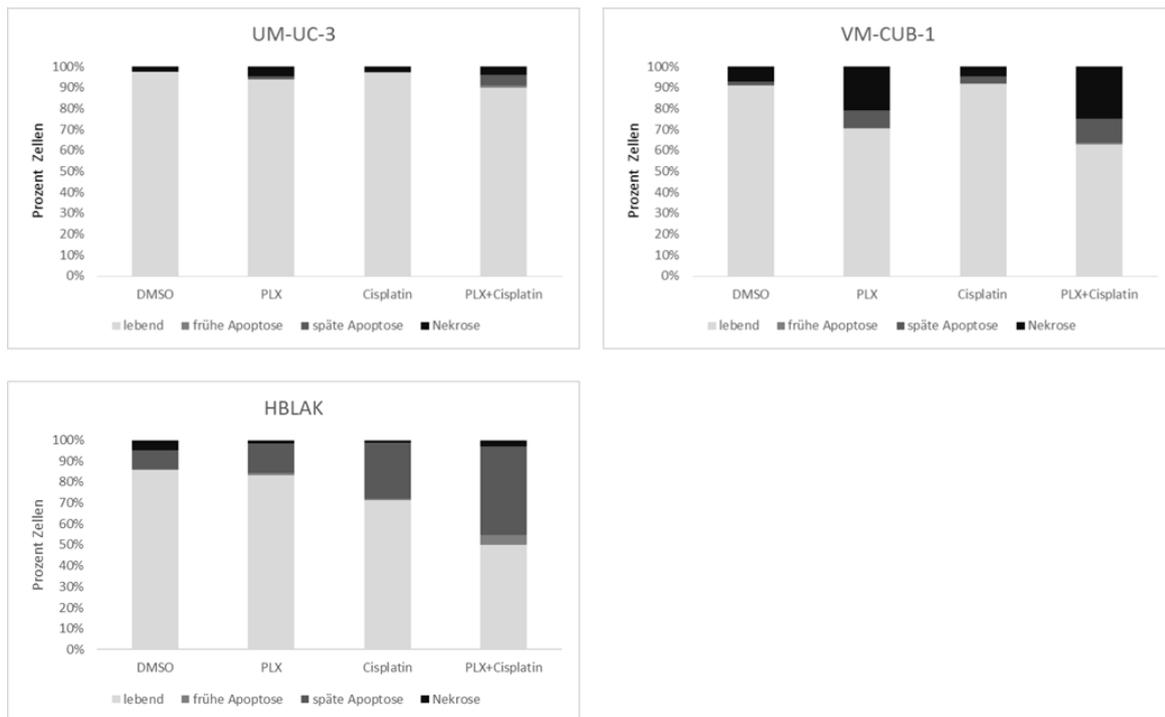


Abb.26: Wirkung der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf die Apoptoeinduktion der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK. Behandlung der Zellen mit 1 μ M PLX und 1,5 μ M Cisplatin für 72 h. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

3.7 Effekte der Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus

Zur Untersuchung des Einflusses von Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus wurde analog eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit Propidium-Iodid in Nicoletti-Puffer gefärbt. Abbildung 27 zeigt beispielhaft ein Diagramm zur Bestimmung der einzelnen Phasen im Zellzyklus und dem Anteil der Zellen, die sich in den einzelnen Phasen befinden.

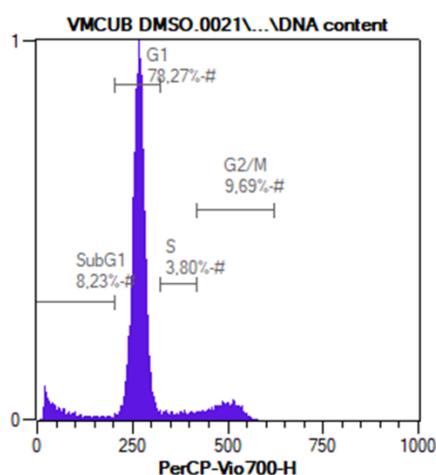


Abb.27: Beispiel-Diagramm einer Zellzyklusanalyse mittels FACS. SubG1-Zellen als Indiz für Zelltodinduktion, G1-, S- und G2/M-Phase sind dargestellt.

3.7.1 Zellzyklus nach Behandlung mit PLX, Romidepsin und Talazoparib

Analog zu den Apoptosemessungen, wurden die vielversprechendsten Kombinationspartner einer Zellzyklusanalyse unterzogen. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse dargestellt. In der Zelllinie UM-UC-3 kam es durch die Behandlung zu einer deutlichen Steigerung der G2/M-Fraktion. Das war besonders ausgeprägt nach der Behandlung mit Talazoparib bzw. PLX und Talazoparib, hier kam es zu einer Steigerung von 9 % in der Lösungsmittelkontrolle auf 38 % bzw. 52 %. Auch die Kombinationsbehandlung mit Talazoparib und Romidepsin hatte einen Anstieg der Fraktion auf 33 % zur Folge. Durch die Behandlung mit PLX und Talazoparib kam es zudem zu einem Anstieg der SubG1-Fraktion von 0,7 % auf 24 %.

In VM-CUB-1 war die Veränderung der Sub-G1-Fraktion die eindrücklichste Veränderung, die durch alle Behandlungen ausgelöst wurde. Bei einem Anteil von 8 % in der Lösungsmittelprobe, war der Anstieg nach der Behandlung mit Talazoparib und der mit Talazoparib und PLX besonders stark ausgeprägt, mit einem Anstieg auf 30 % bzw. 69 %. Auch kam es über alle Behandlungen hinweg zu einer Abnahme der Zellen in der G1-Phase.

Die HBLAK-Zellen führten die Behandlung mit Romidepsin zu einem Anstieg der Zellen in der S-Phase von 11 % auf 27 %, gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Zellen in der G1-Phase, wie auch bei der Kombinationsbehandlung mit Romidepsin und Talazoparib. Die anderen Behandlungen hatten kaum Einfluss auf den Anteil der Zellen in der G1- und S-Phase. Die Behandlung Romidepsin und Talazoparib führte zudem zu einem Anstieg der SubG1-Fraktion von 0,2 % auf 23 %. Die Behandlung mit PLX und Talazoparib führte hingegen kaum zu Veränderung im Zellzyklus der Zelllinie. Auch bei dieser Messung scheint letztere Kombination sehr günstige Effekte zu haben.

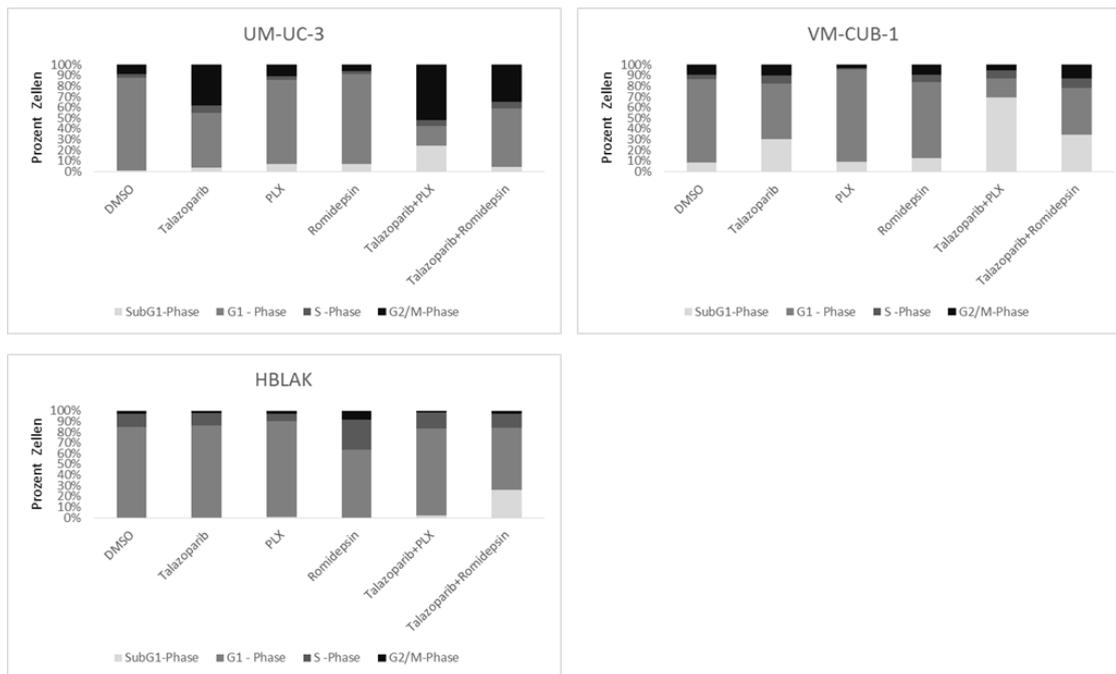


Abb.28: Wirkung der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK. Behandlung der Zellen mit 1 nM Romidepsin, 0,6 μ M PLX und 0,5 μ M Talazoparib für 72 h. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

3.7.2 Zellzyklus nach Behandlung mit PLX und Cisplatin

In Abbildung 29 ist der durchflusszytometrisch bestimmte Einfluss der Behandlung mit PLX und Cisplatin auf den Zellzyklus in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK dargestellt. In UM-UC-3 hatte die Behandlung einen Anstieg von Zellen in der SubG1-Phase zur Folge. Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt bei der Kombinationsbehandlung, die einen Anstieg der SubG1-Fraktion von 0,7 % auf 31 % bewirkte. Auch kam es durch die Kombinationsbehandlung zu einem Anstieg der Zellen in der S-Phase um das 4-fache und in der G2/M-Phase um das 2,5-fache. Die Einzelbehandlungen zeigten die gleichen Effekte auf den Zellzyklus, wenn auch schwächer ausgeprägt. In der Zelllinie VM-CUB-1 zeigten sich dagegen nur geringer Zellzyklusveränderungen in Folge der Behandlung. Ein moderater Anstieg der SubG1-Phase konnte bei allen Behandlungen beobachtet werden sowie ein moderater Abfall der G1-Phase. Anders der Effekt, den die Behandlung auf die HBLAK Zellen hatte. Hier führte die Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der G2/M-Fraktion. Am deutlichsten ausgeprägt war das nach der Behandlung mit Cisplatin. Ein Anstieg von 7,5 % auf 43 % war zu verzeichnen.

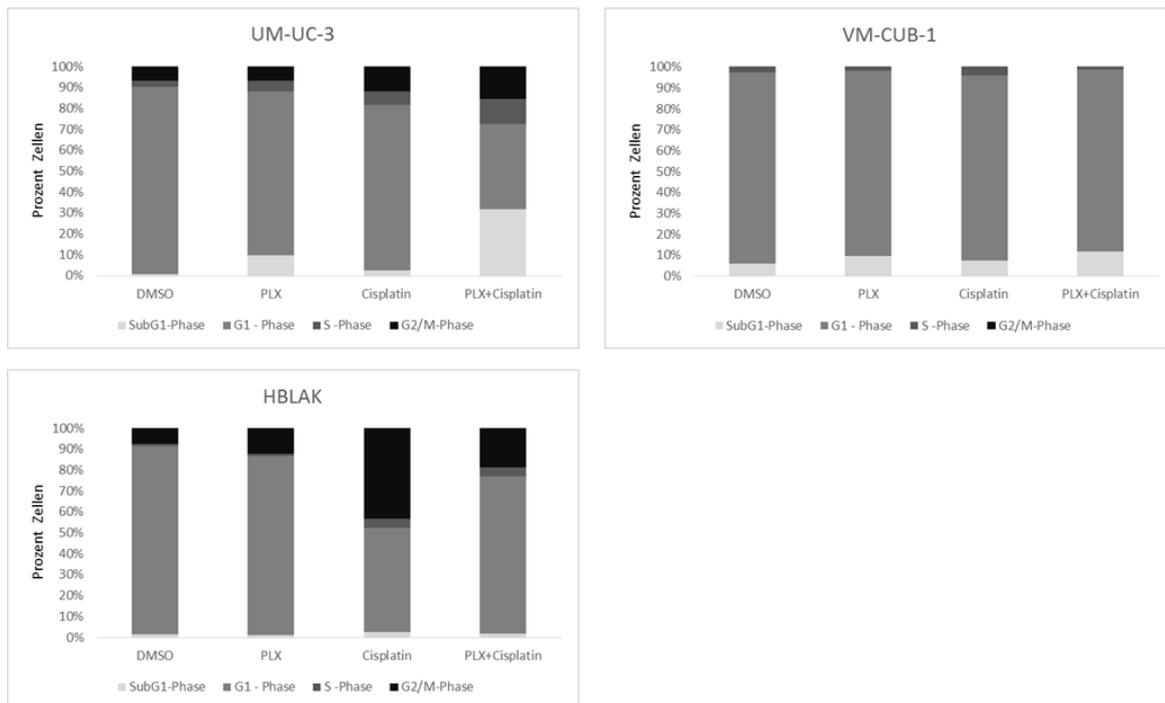


Abb. 29: Wirkung der Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK. Behandlung der Zellen mit 1 μM PLX und 1,5 μM Cisplatin für 72 h. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich, ähnlich wie bei der Apoptosemessung, eine Überlegenheit der PLX/Talazoparib-Kombination gegenüber der PLX/Cisplatin-Kombination ableiten. Hervorzuheben ist hier erneut, dass nur ein geringer Effekt auf die HBLAK Zelle, nachgewiesen werden konnte.

3.8 Einfluss einer sequenziellen Kombinationsbehandlung auf die Zellviabilität

Da in der Literatur für einzelne Substanzen Anhaltspunkte gab, dass eine mögliche Steigerung der Effektivität durch eine sequentielle Behandlung erreicht werden könnte, werden im Folgenden, ergänzende Ergebnisse sequentieller Behandlungen dargestellt.

3.8.1 Behandlung mit Gemcitabin und PLX 24 h später

Ein erster Versuch einer sequenziellen Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin wurde unternommen, basierend auf einer Studie zum Pankreaskarzinom, die Vorteile einer solchen Kombination mit epigenetischen Inhibitoren wie z. B. TW09 aufgezeigt hatte. (Zhang et al., 2020). Da Gemcitabin auch bei der Behandlung von Urothelkarzinomen eingesetzt wird, schien das, in der Theorie, auch eine sinnvolle Kombination für die Behandlung von UCCs.

In Abbildung 30 ist der Effekt der sequenziellen Behandlung mit Gemcitabin und PLX dargestellt. Hierbei wurden die Zellen initial mit Gemcitabin behandelt und 24 Stunden später mit PLX. In den UCCs wies die kombinierte Behandlung keine starke synergistische Wirkung auf. Im *combination index plot* von UM-UC-3 zeigte bei niedrigen Dosierungen eine antagonistische Wirkung der Behandlung. In den HBLAK Zellen war in höheren

Dosierungen eine synergistische Wirkung nachweisbar. Eine wesentliche Effektsteigerung war also nicht abzuleiten.

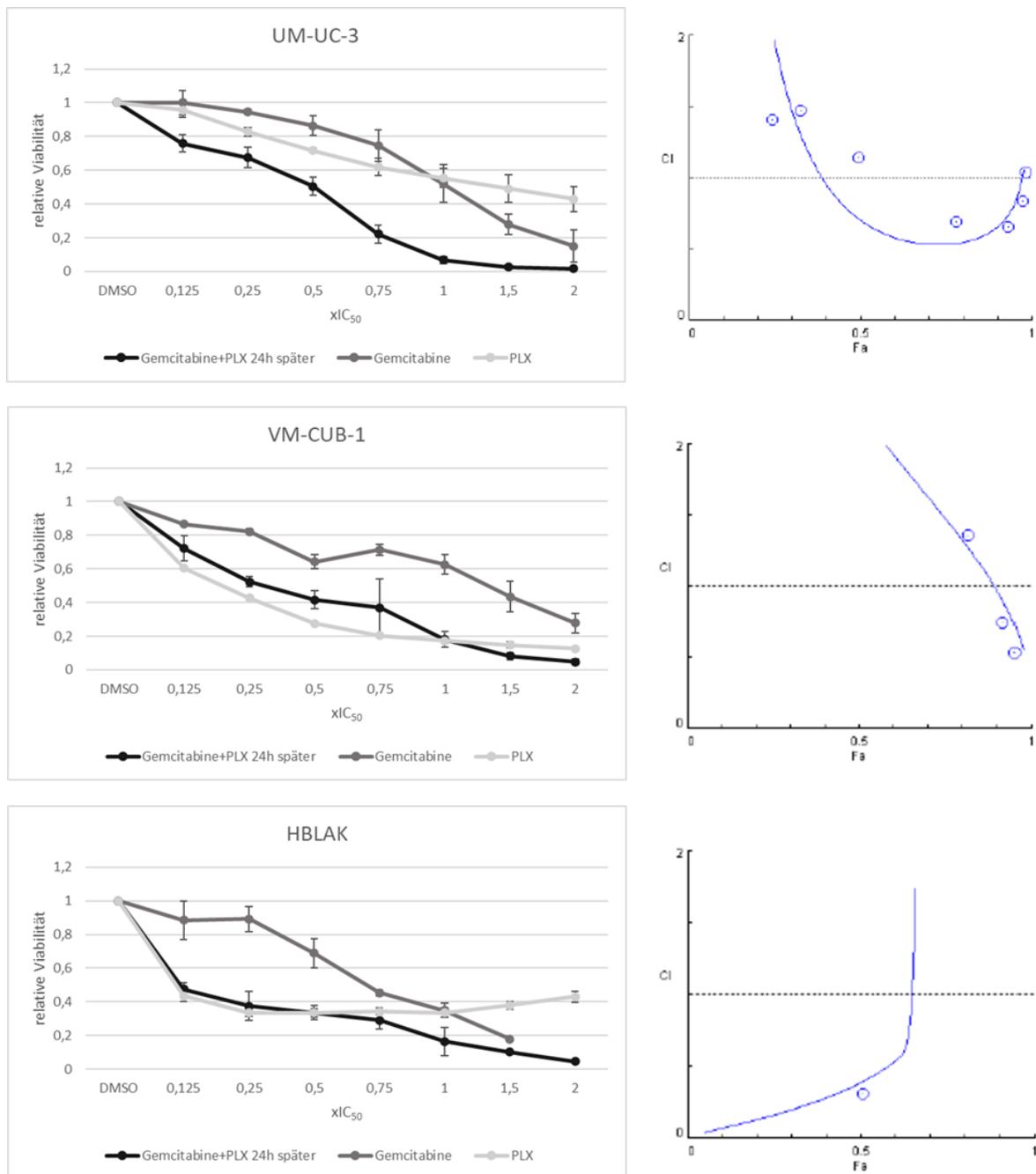


Abb. 30: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des *combination index plot* (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach sequentieller Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine und PLX 24 h später. Die Behandlung erfolgte für insgesamt 72 h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI < 1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI > 1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

3.8.2 Sequenzielle Behandlung mit Cisplatin und TW09

In Kapitel 3.8.1 konnte keine vielversprechende Synergie aus einer Kombination mit Gemcitabin abgeleitet werden. Von daher sollten weitere Kombinationen geprüft werden, die sich in den simultanen Behandlungen bereits als synergistisch erwiesen hatten. Auch sollte geprüft werden, ob die Reihenfolge der sequenziellen Behandlung einen Einfluss auf das Ergebnis hat, sodass sowohl eine Behandlungsreihe mit dem Chemotherapeutikum als ersten Wirkstoff, wie auch eine Behandlungsreihe mit dem epigenetischen Inhibitor als ersten Wirkstoff durchgeführt wurde. Als epigenetischer Inhibitor wurde TW09 eingesetzt, in Analogie zu einer Arbeit zum Pankreaskarzinom mit sequentieller Behandlung (Zhang et al., 2020).

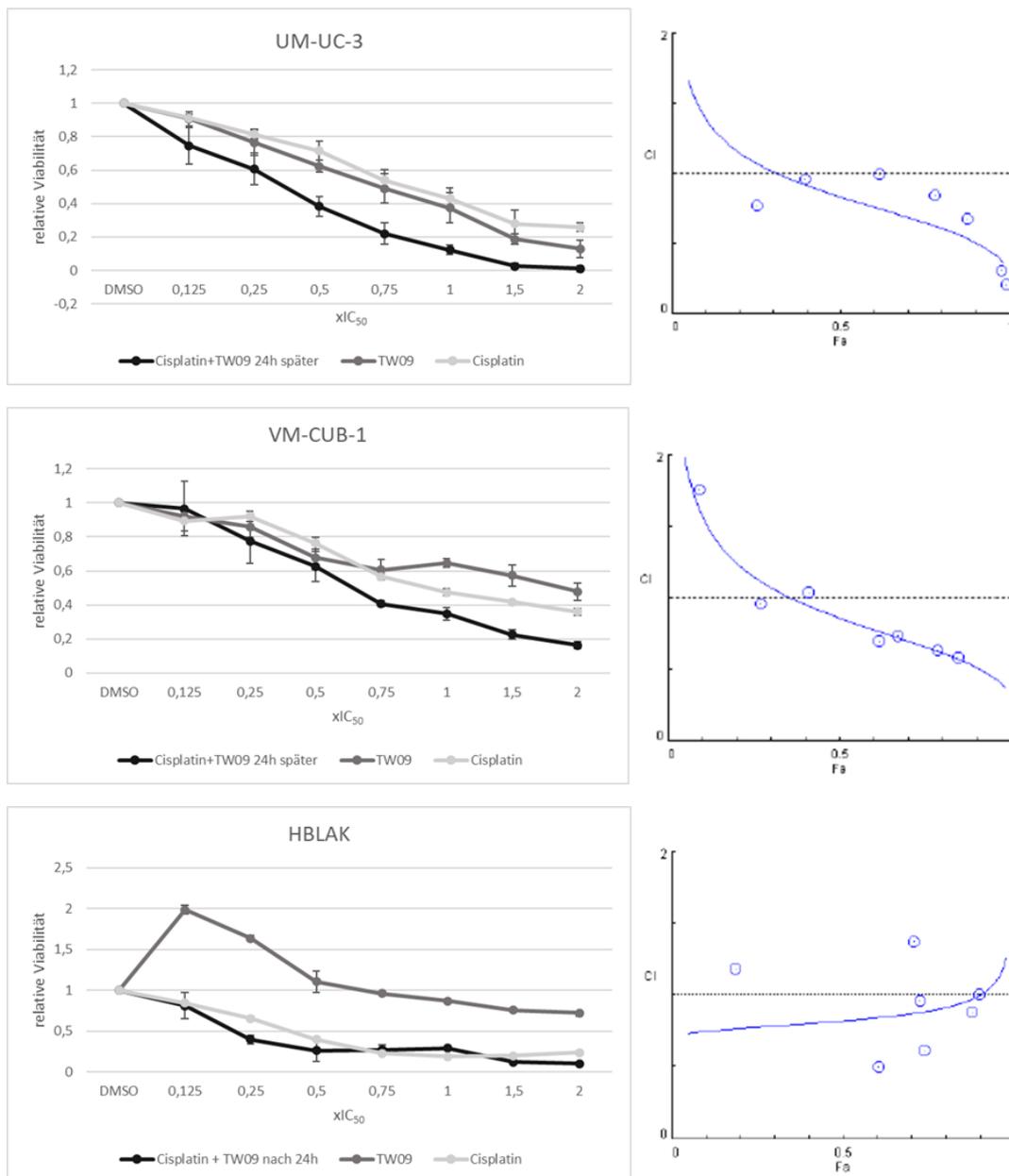


Abb. 31: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach sequentieller Kombinationsbehandlung mit Cisplatin als ersten Wirkstoff und TW09 24 h später. Die Behandlung erfolgte für insgesamt 72 h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa:

fraction affected, IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein $CI < 1$ spricht für eine synergistische Wirkung, ein $CI > 1$ für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. $n=4$.

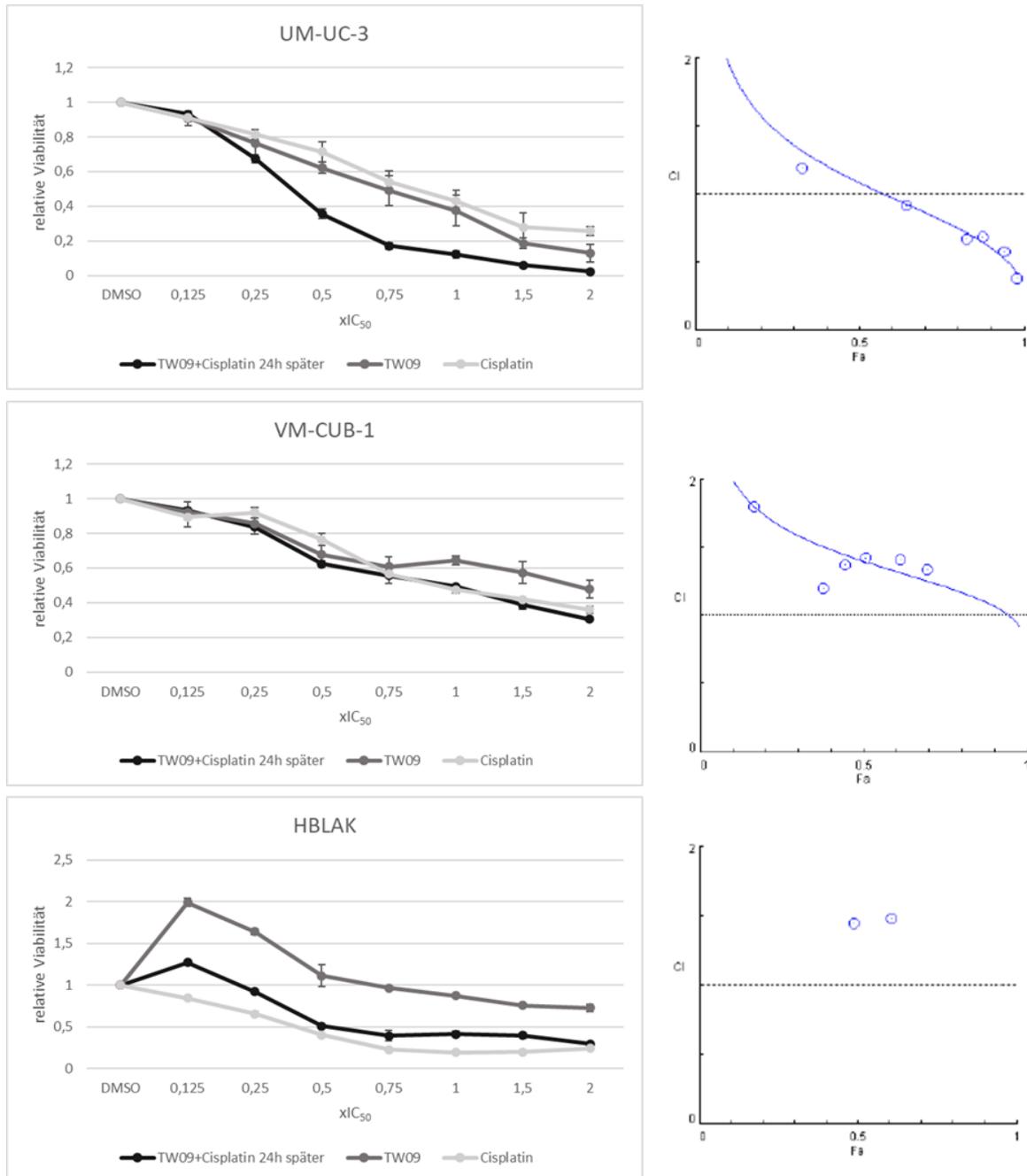


Abb. 32: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des *combination index plot* (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach sequentieller Kombinationsbehandlung mit TW09 als ersten Wirkstoff und Cisplatin 24 h später. Die Behandlung erfolgte für insgesamt 72 h. Die Berechnung der relativen Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. F_a : *fraction affected*, IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein $CI < 1$ spricht für eine synergistische Wirkung, ein $CI > 1$ für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. $n=4$.

Die in Abbildung 31 dargestellte sequenzielle Kombination aus Cisplatin und TW09 wirkt in allen Zelllinien bei niedrigen Konzentrationen antagonistisch, während sie bei höheren Konzentrationen eine additive bis leicht synergistische Wirkung zeigt. Die in Abbildung 32 gezeigte Behandlung mit TW09 und der Cisplatinbehandlung 24 später, zeigt eine vorwiegend antagonistische Wirkung in allen Zelllinien. Insgesamt war also die sequenzielle Behandlung der simultanen unterlegen.

3.8.3 Sequenzielle Behandlung mit PLX und Cisplatin Analog zu der Kombination von Cisplatin und TW09 wurde eine sequentielle Behandlung mit Cisplatin und PLX geprüft. Auch bei diesen Wirkstoffen wurden zwei Behandlungsreihen durchgeführt – eine beginnend mit dem Chemotherapeutikum, die andere mit dem epigenetischen Inhibitor.

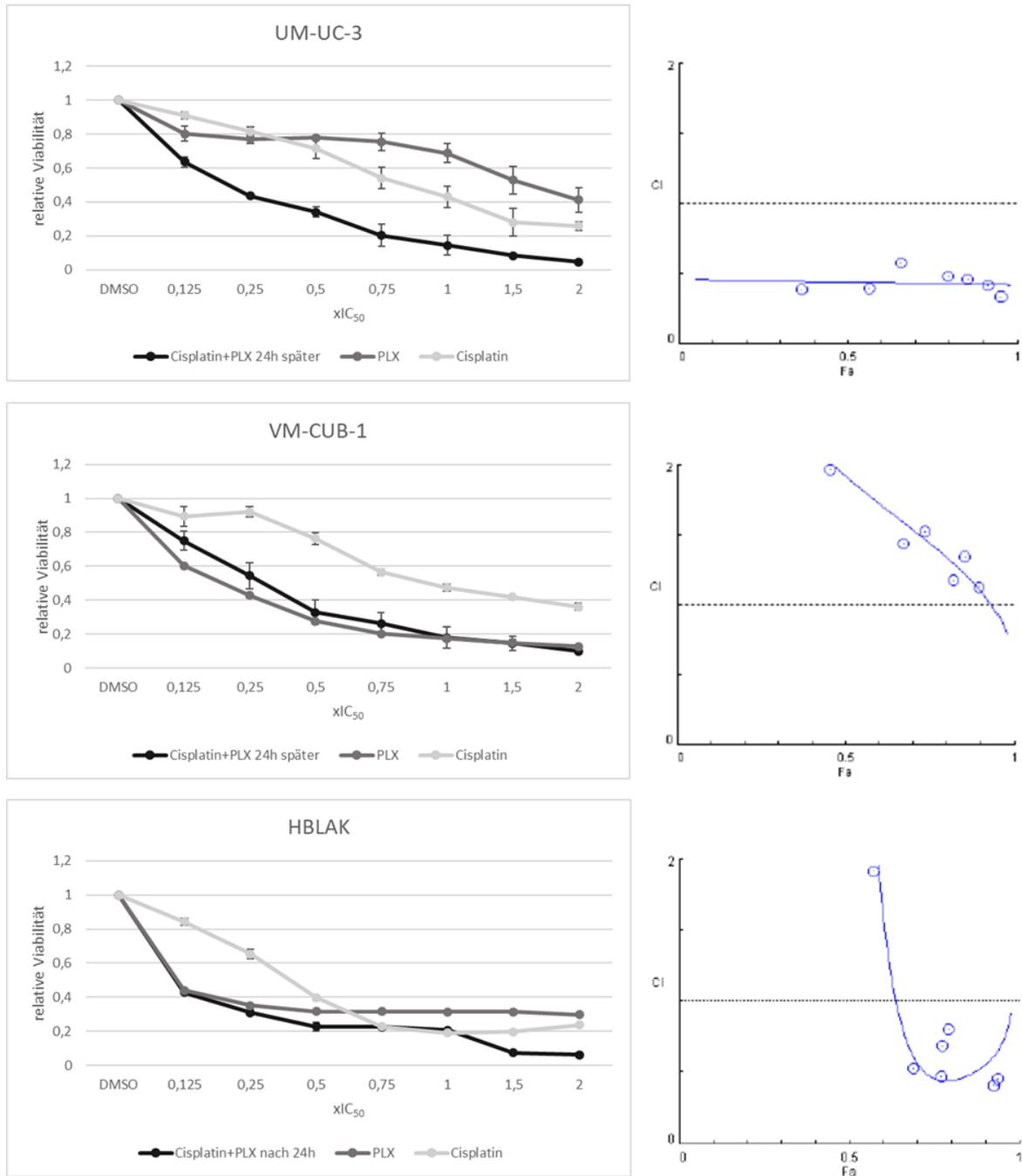
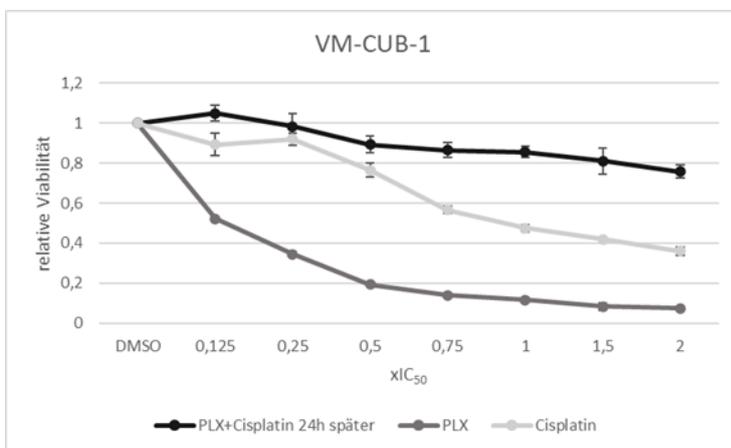
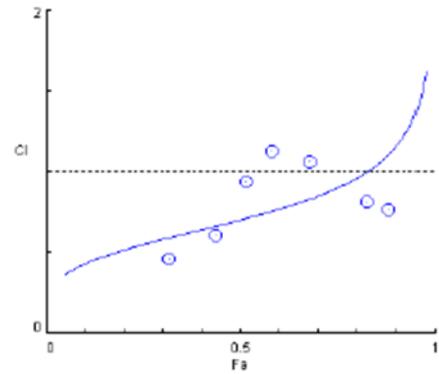
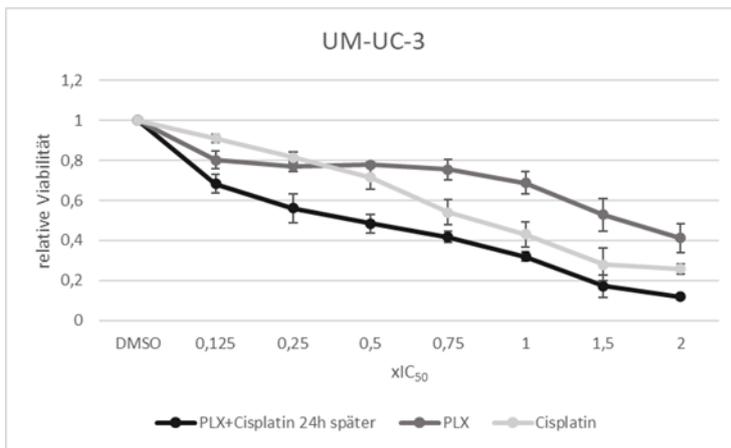


Abb. 33: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach sequentieller Kombinationsbehandlung mit Cisplatin als ersten Wirkstoff und PLX 24 h später. Die Behandlung erfolgte für insgesamt 72 h. Die Berechnung der relative Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI < 1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI > 1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.



Kein combination index plot bei CI>2

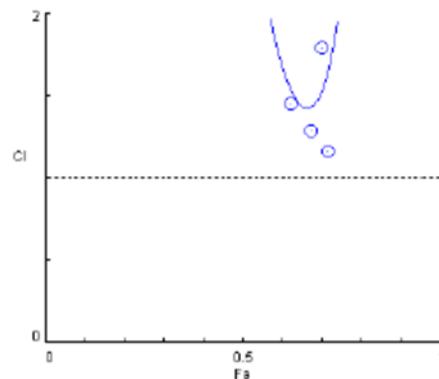
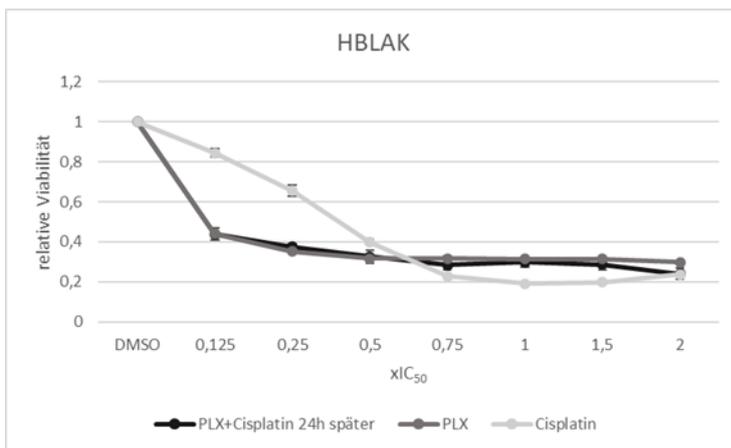


Abb. 34: Bestimmung der Zellviabilität (links) und des combination index plot (rechts) der Zelllinien VM-CUB-1, UM-UC-3 und HBLAK nach sequentieller Kombinationsbehandlung mit PLX als ersten Wirkstoff und Cisplatin 24 h später. Die Behandlung erfolgte für insgesamt 72 h. Die Berechnung der relative Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur DMSO- Lösungsmittelkontrolle. Fa: *fraction affected*, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, CI: *combination index*. Ein CI<1 spricht für eine synergistische Wirkung, ein CI>1 für eine antagonistische. Die Standardabweichung versteht sich als Populations-SD. n=4.

Die Abbildung 33 zeigt die sequenzielle Behandlung mit Cisplatin und 24 h später mit PLX, diese wirkt in allen Konzentrationen leicht synergistisch in der Zelllinie UM-UC-3. In der anderen UC-Zelllinie hingegen wirken alle Konzentrationen der Behandlung antagonistisch.

Auch die in Abbildung 34 dargestellte sequenzielle Behandlung mit PLX und Cisplatin 24h später, wirkt größtenteils antagonistisch in den Zelllinien. In den sequentiellen Behandlungen zeigt sich die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum 24 h vor dem epigenetischen Inhibitor, der umgekehrten Behandlung überlegen. Insgesamt war aber keine der sequentiellen Behandlungen der simultanen Behandlung überlegen, sodass die Wirkung der sequentiellen Behandlung in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wurde.

4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, die Wirkung des BETi PLX und des HDACi Romidepsin auf UCCs zu charakterisieren und daraus mögliche Kombinationstherapien abzuleiten, die in der Behandlung des UC wirkungsvoller und nebenwirkungsärmer sind als die etablierten Therapien. Die Ratio für den Einsatz von epigenetischen Inhibitoren war die Vielzahl von epigenetischen Veränderungen im UC. Im UC wird sowohl das BET-Protein BRD4 (Wu et al., 2016; Yan et al., 2014) wie auch Klasse I HDACs (Pinkerneil et al., 2017; Robertson et al., 2017) überexprimiert. Der BETi JQ1 ist bereits gut charakterisiert, und es hat sich für UCCs in der Zellkultur und im Mausmodell eine Inhibition der Zellproliferation sowie eine Steigerung der Induktion von Apoptose nach Behandlung mit JQ1 gezeigt, jedoch auch mit Nebenwirkungen (Li et al., 2019; Wu et al., 2016). Diese Limitationen wurden durch PLX teilweise aufgebrochen, da PLX über ein günstigeres Nebenwirkungsprofil verfügt (Ozer et al., 2018). In anderen Tumorentitäten konnte bereits eine Wirksamkeit von PLX nachgewiesen werden. In Melanomen konnte für PLX unter Zellkulturbedingungen und im Mausmodell eine Hemmung des Tumorwachstums und eine Veränderung der Genexpression nachgewiesen werden (Erkes et al., 2019; Tiago et al., 2020). Auch zeigte PLX eine Wirksamkeit in der Behandlung von verschiedenen Leukämieformen (Lee et al., 2021; Ozer et al., 2018). Eine Charakterisierung der Wirkung von PLX auf UCCs wurde bis jetzt noch nicht durchgeführt, somit ist das mögliche Potenzial von PLX in der Therapie des UCs noch nicht hinreichend erforscht. Die nachgewiesene Wirkung des BETi JQ1 auf UCCs und das verbesserte klinische Wirkprofil von PLX haben Potenzial für eine effektive und besser verträgliche Therapie. Auch die Wirkung des HDACi Romidepsin auf UCCs als Monotherapie wurde schon in Vorarbeiten untersucht. Hierbei zeigte sich eine antiproliferative Wirkung von Romidepsin durch Induktion von Apoptose und eines Zellzyklusarrests (Fan et al., 2008; Pinkerneil et al., 2016).

4.1 Die molekulare Wirkung von epigenetischen Inhibitoren, die auf Histonacetylierung abzielen

Bei den epigenetischen Inhibitoren stellt sich zum einen die Frage nach dem Potenzial einer Monotherapie für das UC. In anderen Tumorentitäten wurde eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet. Zum anderen stellt sich die Frage nach einer möglichen Kombinationstherapie von PLX mit einem anderen epigenetischen Inhibitor oder anderen sinnvollen Kombinationspartnern, die idealerweise bereits in der klinischen Anwendung sind. In diesem Zusammenhang steht vor allem die nicht-kanonische Wirkung von PLX im Vordergrund. Das bedeutet, dass die DNA-Schädigung und Inhibition der DNA-Reparatur sowie das damit verbundene Potenzial zur Sensitivierung der Krebszellen gegenüber Inhibitoren der DNA-Reparatur oder DNA-schädigenden Substanzen untersucht werden

sollen. Um die Frage nach dem effektivsten Therapieansatz unter Verwendung von epigenetischen Inhibitoren zu klären, erfolgte eine detaillierte Analyse der Behandlung von UCCs mit Romidepsin und PLX. Ebenso wurde geprüft, ob die Kombination zweier epigenetischer Inhibitoren zu einer potenziellen Verstärkung der erwünschten antitumoralen Wirkungen führt.

4.1.1 PLX hemmt die Zellproliferation, induziert Apoptose und vermindert die Reparaturkapazität von DNA-Schäden

In der Monobehandlung zeigte PLX schon in niedrigen Konzentrationen eine starke Wirkung im Sinne einer Hemmung der Zellproliferation und Veränderung der Genexpression von VM-CUB-1 Zellen. Ein deutlich geringer Effekt zeigt sich oftmals auf die UM-UC-3 Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die für die Sensitivität von UM-UC-3 für den BETi JQ1 vorliegen. Auch gegenüber der Behandlung mit diesem Inhibitor zeigte sich UM-UC-3 als eine der resistenteren Ziellinien, mit einem IC_{50} -Wert, der 14-mal höher war als der von VM-CUB-1 (Hölscher et al., 2018). Diese benötigten hohen Konzentrationen stehen im Kontrast zur Wirkung von PLX auf die Kontrollzelllinie. Deren IC_{50} -Konzentration ist niedriger als die der UCCs. Es ist also davon auszugehen, dass die PLX-Behandlung toxisch auf das normale Urothel wirkt. Diese Toxizität und das gleichzeitige schlechte Ansprechen von UM-UC-3 machen eine alleinige PLX-Behandlung in ausreichender Dosis zur effektiven Abtötung aller Krebszellen potenziell sehr toxisch für die normalen Zellen.

Bei Behandlung mit der jeweiligen IC_{50} Konzentration, konnte ein Ansprechen auf PLX in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. *HEXIM1*, als Marker für eine Antwort auf BET-Inhibition (Berenguer-Daize et al., 2016), zeigt sich in allen Zelllinien - sowohl den UCCs als auch HBLAK- induziert. Der Klonogenitätstest zeigte, dass die langfristige Proliferation nach der Behandlung mit PLX sowohl in den UCCs als auch in den HBLAK reduziert war. Die antiproliferative Wirkung von PLX auf Tumorzellen ließ sich bereits in anderen Tumorentitäten nachweisen. In primären Zellkulturen des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms zeigte sich ein reduziertes Zellwachstum und eine reduzierte *c-MYC* Expression. Zudem hat sich eine Inhibition des Tumorwachstums in vivo am Mausmodell gezeigt (Zhu et al., 2019). Auch im Nierenzellkarzinom und malignen Melanom konnte in der Zellkultur und in vivo in Xenografts eine Hemmung des Tumorwachstums nachgewiesen werden (Wan et al., 2020) (Tiago et al., 2020). Es zeigten sich jedoch klare Unterschiede in den benötigten PLX-Konzentrationen, um die antiproliferative Wirkung in den verschiedenen Tumorentitäten zu erzielen. Während das anaplastische Schilddrüsenkarzinom eine IC_{50} -Konzentration von 1 μ M aufwies, zeigten sich beim Nierenzellkarzinom IC_{50} -Konzentration von 7-10 μ M. Im malignen Melanom wurden Konzentration von 1 μ M JQ1 und 2 μ M PLX angewendet; diese zeigten vergleichbare Effekte auf die Zellen. Das maligne Melanom scheint sensitiver auf PLX zu reagieren als die Zelllinien des Nierenzellkarzinoms und teilweise die UCCs, die heterogene IC_{50} -Werte aufweisen, abhängig von der einzelnen Zelllinie. Ein Vergleich mit HBLAK-Zellen ist in diesem Kontext nicht möglich, da in den genannten Arbeiten keine Normalzelllinien inkludiert wurden.

Eine divergente Reaktion zwischen den UCCs und den HBLAK Zellen nach PLX-Behandlung zeigte sich in der Apoptoseinduktion und der Zellzyklusregulation. In der Zellzyklusregulation der UCC zeigte sich eine Akkumulation in subG1, wohingegen die HBLAK-Zellen eine Akkumulation in G2/M zeigten. Der G2/M Arrest stellt hier einen

physiologischen Mechanismus im Zellzyklus dar, indem Zellen mit DNA-Schäden am Eintritt in die Mitose gehindert werden (Stark & Taylor, 2004). In Tumorzellen hingegen konnte bereits in anderen Tumorentitäten wie dem Glioblastom eine Induktion von einem subG1 Arrest durch Behandlung mit dem BET-Inhibitor JQ1 gezeigt werden (Zhang et al., 2021). In den UCCs zeigte sich zudem, in den FACS-Daten, eine Apoptoseinduktion nach PLX-Behandlung. Auch hier ist der Effekt auf Zelllinie VM-CUB-1 deutlich größer als der auf die Zelllinie UM-CU-3.

Neben den FACS-Analysen zeigte sich im Western Bot auch eine unterschiedlich hohe Abundanz von *cleaved* PARP. *Cleaved* PARP bezeichnet das, durch Caspasen gespaltene, PARP-Enzym. Hierdurch verliert das Enzym seine Funktion. Dieser Prozess ist Teil der Apoptose und *Cleaved* PARP gilt als Marker für Apoptose (Kaufmann et al., 1993; Soldani & Scovassi, 2002). Im Western Blot ließ sich nach Behandlung mit PLX in den UCCs *cleaved* PARP nachweisen. In HBLAK Zellen hingegen konnte keine PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Es ist also davon auszugehen, dass PLX auf HBLAK vor allem über Induktion eines Zellzyklusarrest wirkt und weniger über eine Apoptoseinduktion, was potenziell günstig für eine reduzierte Toxizität auf gesundes Gewebe wäre.

Eine weitere nicht-kanonische Wirkung von PLX ist die Induktion von DNA-Schäden und die gleichzeitige Hemmung deren Reparatur. Diese Wirkung ist in UCCs bislang wenig untersucht. Grundsätzlich ist die Funktion von BRD4 in der Reparatur von DNA-Schäden, bereits in der Literatur beschrieben (Donati et al., 2018; Floyd et al., 2013). Hiernach erfüllt BRD4, neben der Funktion in der Transkriptionsregulation, auch noch eine Schlüsselrolle in der Regulation der Reparatur von DNA-Schäden. In Prostatakarzinomzellen konnte BRD4 als Regulator von radiogen bedingten DNA-Doppelstrangbrüchen identifiziert werden. Eine Hemmung von BRD4 führte zu einem Anstieg von phosphoryliertem H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Li et al., 2018). In anderen Tumorentitäten konnte bei einer Behandlung mit JQ1 zudem eine Reduktion von *BRCA2* als wichtiger Bestandteil des HR-Reparaturweges nachgewiesen werden (Garcia et al., 2018). Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt für die Bedeutung von BRD4 in der DNA-Reparatur.

Nach der Behandlung mit PLX zeigte sich in den UCCs, vor allem in VM-CUB-1, eine verminderte Expression von Faktoren des HR- und NER- Reparaturweges. Zudem zeigte sich eine verminderte *PARP*-Expression. In den HBLAK Zellen zeigte sich dieser Effekt weniger stark ausgeprägt, oder es lag teilweise sogar eine Induktion der Gene vor.

Insgesamt lässt sich über alle Effekte von PLX in den UCCs feststellen, dass die Wirkung auf die Zelllinie UM-UC-3 deutlich geringer ausgeprägt war. Es konnte allerdings die Hemmung von DNA-Reparaturwegen und damit verbunden die Induktion einer BRCAness der UCCs nachgewiesen werden, was PLX zu einem vielversprechenden Kombinationspartner für Wirkstoffe macht, die DNA-Schäden induzieren oder die Reparatur solcher hemmen. Die Induktion einer BRCA-Defizienz durch BETi hat sich schon in anderen Tumorentitäten als wirksam erwiesen. Beim triple-negativen Mammakarzinom konnte, unter Zellkulturbedingungen, durch die Behandlung mit dem BETi JQ1, eine Resistenz gegen PARP-Inhibitoren überwunden werden. Auch hier liegt die Verminderung der *BRCA*-Expression und eine damit verbundene Unterdrückung der DNA-Reparatur zu Grunde (Juan et al., 2022).

4.1.2 Romidepsin senkt die Zellviabilität und induziert Apoptose

In Urothelkarzinomen sind die Klasse 1 Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 häufig überexprimiert (Niegisch et al., 2013; Poyet et al., 2014; Witt et al., 2009). Diese Alteration

ist der Hintergrund für eine Behandlung der Zellen mit einem Klasse 1 HDAC Inhibitor wie z.B. Romidepsin. In Vorarbeiten zu UCC konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition mit einem selektiven Klasse 1 HDAC wie Romidepsin eine bessere antitumoröse Wirkung zeigt als ein pan-Inhibitor, der unselektiv alle HDAC-Klassen hemmt (Pinkerneil et al., 2016; Pinkerneil et al., 2017). Auch konnte in Vorarbeiten bereits eine Wirksamkeit von Romidepsin in der Behandlung von UCCs unter Zellkulturbedingungen gezeigt werden (Pinkerneil et al., 2016).

Nach einer Behandlung mit Romidepsin konnte eine Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden, im Sinne einer antiproliferativen Wirkung auf die UCCs. Bei den HBLAK Zellen war diese antiproliferative Wirkung weniger stark ausgeprägt. Das deckt sich mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, bei denen eine geringe zytotoxische Wirkung auf die HBLAK-Zellen im Vergleich zu den UCCs nachgewiesen wurde (Pinkerneil et al., 2016). In der Literatur ist zudem eine Zellzyklusveränderung durch Romidepsin in UCCs beschrieben; hier zeigte sich nach einer Behandlung mit dem Wirkstoff eine Akkumulation der Zellen in der G2/M Phase (Hoffmann et al., 2021). Dieser Effekt konnte in den aktuellen FACS-Analysen nicht reproduziert werden. Hier zeigte sich nach der Romidepsinbehandlung nur eine sehr geringe Veränderung des Zellzyklus. Grund dafür könnte die unterschiedliche Konzentration der Behandlung sein. In der entsprechenden Arbeit wurden die Zellen vor der Analyse mit der jeweiligen IC_{50} -Konzentration behandelt, wohingegen die Zellen in dieser Arbeit in einer reduzierten Konzentration, nämlich mit der halben IC_{50} Konzentration von VM-CUB-1 behandelt wurden. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Analyse der Apoptoseinduktion; diese wurde nach der Behandlung mit der gleichen reduzierten Dosis an Wirkstoff durchgeführt. Hier zeigt sich lediglich eine diskrete Induktion von Apoptose in den UCCs, in den HBLAK-Zellen zeigt sich dagegen eine deutlich gesteigerte Fraktion an spätapoptotischen Zellen.

In Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der DNA-Reparaturmechanismen zeigt sich, im Gegensatz zur PLX-Behandlung, jedoch keine Herabregulation von *BRCA1* oder *PARP 1* und *2*, was in der Folge eine weniger effektive Kombinationsbehandlung bedingen könnte. In der Zusammenschau der Ergebnisse wirft die Wirkung der Monotherapie mit Romidepsin auf HBLAK Zellen ähnliche Probleme auf wie schon die Monobehandlung mit PLX. Auch hier ist die IC_{50} der UCCs mehr als doppelt so hoch wie die der HBLAK Zellen (Hölscher et al., 2018). Aus diesem Grund lohnt es sich, die potenziellen synergistischen Effekte einer Kombinationsbehandlung zu untersuchen, um durch diese eine Verbesserung der Wirkung auf die Krebszellen und eine Möglichkeit zur Dosisreduktion zu erzielen.

Der Wirkstoff PLX zeigte in der Monobehandlung eine günstigere Wirkung als Romidepsin, da hier die Faktoren der DNA-Reparatur, wie *BRCA 1* und *PRAP 1* und *2*, herabreguliert werden.

4.1.3 Die Kombinationstherapie mit PLX und Romidepsin ist der Monobehandlung nicht überlegen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung aus dem BETi der 1. Generation (JQ1) und Romidepsin synergistische Effekte hat, wodurch eine Apoptose in UCCs induziert werden kann. Gleichzeitig zeigte sich ein deutlich geringerer Effekt auf benigne Zellen, unter anderem HBLAK (Hölscher et al., 2018). Aufgrund dessen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Kombinationsbehandlung mit Romidepsin und PLX, um zu zeigen, ob hier ein vergleichbarer synergistischer Effekt nachgewiesen werden kann. Die Synergieanalysen der Vitalitätsdaten ergaben jedoch nur einen limitierten synergistischen

Effekt und eher in höheren Dosisbereich ($1 \times IC_{50}$), so dass eine Dosisreduktion kaum möglich wäre. Auch in den Ergebnissen der RNAseq und der qPCR-Validierung konnte kein wesentlicher synergistischer Effekt gezeigt werden. Zum einen zeigte sich insgesamt kein stärkerer Effekt auf die Induktion von Apoptose und Herabregulierung der DNA-Reparaturmechanismen in den UCCs im Vergleich zu der Monobehandlung mit PLX. Darüber hinaus zeigte sich ein deutlicher Effekt auf die HBLAK Zellen, welche potenziell mit einer höheren Toxizität für gesunde Zellen vergesellschaftet, sein könnten. Dieser Effekt auf HBLAKs kann dadurch erklärt werden, dass der IC_{50} -Wert von HBLAK deutlich geringer ist als bei den UCCs; wenn man PLX mit einer geringen Gesamttoxizität einsetzen möchte, muss insgesamt die Konzentration von PLX reduziert werden, um die gesunden Zellen entsprechend zu schonen. Dies kann durch Wirkstoffkombinationen erreicht werden, die eine synergistische Wirkung auf die UCCs zeigten, für die Kombination aus PLX und Romidepsin war dies nicht möglich.

4.2 Zelluläre Wirkung von Romidepsin und PLX in Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin bzw. Talazoparib

Die Kombinationsbehandlung zur Verbesserung der Wirksamkeit einer Therapie ist in der Medizin ein häufig angewandtes Konzept. Aufgrund der im Kapitel 4.1 dargestellten Limitationen der Einzelbehandlungen mit epigenetischen Inhibitoren, ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung einer effektiveren Behandlung, die gleichzeitig weniger toxisch ist für das normale Urothel. Auf Grund der Erkenntnisse zur Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf DNA-Schädigung und -Reparatur wurden Kombinationen mit Cisplatin und mit dem PARP-Inhibitor Talazoparib untersucht.

4.2.1 Die Kombinationsbehandlung aus Cisplatin und PLX/ Romidepsin zeigt synergistische Effekte auf die UCCs

Aus den bisherigen Limitationen der Chemotherapie beim UC ergibt sich der Bedarf die Therapieeffizienz zu verbessern. Die in Kapitel 4.1.1 dargestellten Effekte der PLX-Therapie auf die DNA-Reparatur, insbesondere den NER und den HR-Reparaturweg, könnten die Grundlage für eine potenziell synergistische Wirkung zwischen einem epigenetischen Inhibitor und Cisplatin sein, welches über eine Quervernetzung der DNA mutagen wirkt und bereits in der leitliniengerechten Therapie des Urothelkarzinoms eingesetzt wird. Eine Limitation der Cisplatin-basierten Chemotherapie ist die Entwicklung von Resistenzen, was im Verlauf zum Therapieversagen führen kann (Galluzzi et al., 2012). Dieser Chemoresistenz liegen verschiedene Mechanismen zugrunde, diese wurden bereits in Kapitel 1.1.1. besprochen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren das Potenzial hat diese Resistenz zu überwinden und die Therapie mit Cisplatin dadurch wirksamer zu machen. Die nicht kanonischen Effekte von epigenetischen Inhibitoren, insbesondere PLX, haben hierbei das Potenzial die Zellen für Cisplatin zu sensitivieren. Das legen, die in Kapitel 4.1.1. beschriebenen Genexpressionsveränderungen durch die Einzelbehandlungen mit PLX, nahe. Eine effektive Reparatur, der von Cisplatin induzierten DNA-Schäden, kann ein Mechanismus der Resistenzbildung sein (Galluzzi et al., 2012). Diese Reparatur geschieht zu einem großen Teil über die NER (Shuck et al., 2008). In der Literatur wurde bereits der Zusammenhang zwischen einer erhöhten NER-Kapazität und einer Cisplatinresistenz hergestellt (Duan et al., 2020; Ferry et al., 2000; Li et al., 2000). Erfreulicherweise konnte

durch die Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren die Genexpression von Komponenten des NER-Signalwegs signifikant reduziert werden. Bei der Behandlung mit PLX war dieser Effekt am stärksten, was für eine potenziell stärkere Hemmung des NER-Weges spricht. Nach der Behandlung mit Romidepsin zeigten sich jedoch mehr Expressionsveränderungen in UM-UC-3 als nach der Behandlung mit PLX. In diesem Fall könnte Romidepsin einen günstigeren Effekt in der Behandlung von UM-UC-3 haben. Auch die PCR-Validierung ergab potenziell günstige Effekte auf die NER-Reparatur. Die PLX-Behandlung führte hier zu einer verminderten *ERCC1*-Expression in VM-CUB-1 und UM-UC-3. *ERCC1* ist ein Protein der NER; die *ERCC1*-Expression ist einer der limitierenden Faktoren der DNA-Reparatur durch NER (Ahmad et al., 2008). In UCCs wurde ein Zusammenhang zwischen einer verminderten *ERCC1*-Expression und einer verbesserten Prognose bei Patienten, die mit einer cisplatinhaltigen Chemotherapie behandelt wurden, festgestellt (Bellmunt et al., 2007). Nach der Romidepsin- oder Kombinationsbehandlung konnte keine derartige Expressionsverminderung von *ERCC1* festgestellt werden.

Ein weiterer wichtiger Reparaturmechanismus im Kontext der Cisplatinresistenz ist der HR-Reparaturweg. Krebsarten, die etwa aufgrund von einer BRCA1/2-Mutation eine HR-Defizienz aufweisen, sind empfindlicher gegenüber einer Therapie mit Cisplatin (Farmer et al., 2005). Umgekehrt können vormals cisplatinsensible Krebszellen durch eine Wiedererlangung der HR-Kompetenz eine Resistenz gegen Cisplatin entwickeln (Sakai et al., 2008). In der Einzelbehandlung mit PLX konnte bereits eine verminderte Expression von Schlüsselgenen der HR-Reparaturweg in Transkriptomanalyse und der qPCR nachgewiesen werden, wobei der Effekt bei PLX deutlich stärker ausgeprägt war als bei Romidepsin.

Aufbauend auf diesen Grundlagen für eine potenziell synergistische Wirkung der beiden Wirkstoffe ließ sich diese im Viabilitätsassay und der Synergieanalyse entsprechend nachweisen. Hier zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit PLX und Cisplatin ein starker synergistischer Effekt, vor allem in den UM-UC-3 Zellen. In VM-CUB-1 ließ sich ebenfalls eine Synergie feststellen, diese allerdings erst in den höheren Konzentrationsstufen. Bemerkenswerterweise konnte eine solche Synergie in den HBLAK Zellen nicht nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, gerade in den höheren Konzentrationen, sogar eine schwächere Wirkung der Kombinationsbehandlung als in den Einzelbehandlungen. Ein vergleichbarer Effekt konnte durch die Behandlung mit Romidepsin nicht erzielt werden; hier zeigte sich nur in den höheren Konzentrationsstufen ein leichter synergistischer Effekt, insbesondere in VM-CUB-1. Allerdings zeigte sich der Effekt auch in den HBLAK Zellen und war insgesamt deutlich schwächer als nach PLX-Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Alteration der DNA-Reparatur, die vor allem nach der Einzelbehandlung mit PLX nachgewiesen werden konnte, in der Folge zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin führt. Diese Sensitivierung zeigt sich weniger stark in den HBLAK Zellen, was zu der geringen Alteration des HR- und NER-Reparaturweges von HBLAK-Zellen nach der Einzelbehandlung passt.

4.2.2 Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt synergistische Effekte auf die UCCs

Abweichend von der Standardtherapie mit Cisplatin gibt es in der Literatur Hinweise auf weitere vielversprechende Kombinationsmöglichkeiten der epigenetischen Inhibitoren. Zu nennen wäre hier zum einen der PARP-Inhibitor (PARPi). Es konnte bereits ein synergistischer Effekt zwischen dem PARPi Talazoparib und dem BETi I-BET762 unter

Zellkulturbedingungen bei Krebszellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen werden (Fiorentino et al., 2020). Der PARPi Talazoparib ist in den USA bereits für die Behandlung von mehreren Tumorentitäten zugelassen, die eine BRCA-Keimbahnmutation aufweisen, wie z.B. das Ovarialkarzinom, das Mammakarzinom oder das Prostatakarzinom (Hoy, 2018). In Deutschland ist Talazoparib bereits für die Behandlung des HER2-negativen, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinoms mit einer BRCA-Keimbahnmutation und für Behandlung des kastrationsrefraktären, metastasierten Prostatakarzinom in einer Kombination mit Enzalutamid, zugelassen (European Medicines Agency, 2019).

In der Einzelbehandlung, ohne eine Kombination mit einem epigenetischen Inhibitor, zeigte die Behandlung mit Talazoparib nur mäßige Effekte auf Viabilität der UCCs und HBLAK-Zellen mit einem IC_{50} vom 1 μ M.

Die Kombination von PLX und Talazoparib zeigte im Viabilitätsassay über 72h eine deutliche Abnahme der Zellviabilität durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung. Auch zeigte sich eine synergistische Wirkung über alle Konzentrationsstufen. Herauszustellen ist hier, dass die deutlichste synergistische Wirkung bei der Zelllinie UM-UC-3 festzustellen war. Da diese Zelllinie weniger sensitiv gegenüber einer PLX-Monobehandlung war, scheint die Kombinationsbehandlung Potenzial für die Überwindung der Resistenzmechanismen von UM-UC-3 zu haben. Dies bedeutet eine potenzielle Senkung der benötigten Wirkstoffkonzentration zur effektiven Behandlung, was zu einer Schonung von gesunden Zellen führen würde. In den HBLAK Zellen zeigte sich der synergistische Effekt weniger ausgeprägt.

In der Langzeitproliferation war, selbst mit einer reduzierten Wirkstoffkonzentration, eine Reduktion des Zellwachstums nach der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung nachweisbar.

Hintergrund für den gemessenen synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung kann hier die Beeinflussung des HR- und NHEJ-Reparaturweges sein. Wie bereits im vorherigen Kapitel dargestellt, hemmt PLX den HR-Reparaturweg, vor allem in UCCs. Zudem zeigt sich ein Verlust von *PARP 1* und *PARP 2*. Es konnte bereits durch Patel et al. gezeigt werden, dass die Inhibition von PARP, und resultierend daraus eine Inhibition des NHEJ-Reparaturweges, eine zytotoxische Wirkung auf Zellen mit einer HRR-Defizienz hat (Patel et al., 2011). In diesem konkreten Fall könnte die, durch Talazoparib ausgelöste, NHEJ-Defizienz zu einer Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen führen. Unrepariert können aus Einzelstrangbrüchen im weiteren Verlauf Doppelstrangbrüche hervorgehen. Durch die von PLX ausgelöste HR-Defizienz können diese nicht mehr effizient repariert werden, was in der Folge zum Zelltod führt. Dieser Effekt wird als „synthetische Letalität“ bezeichnet und beschreibt eine Interaktion zwischen zwei Genen, von denen die Defizienz in einem der Gene nicht letal für die Zelle ist, die simultane Defizienz der beiden Gene ist jedoch letal für die Zelle (O'Neil et al., 2017). Dieser synergistische Effekt zwischen einem BETi und einem PARPi wurde bereits in anderen Tumorentitäten beschrieben. Im Xenograft Modell des ductalen Pankreaskarzinoms zeigte sich nach Behandlung mit JQ1 und dem PARPi Olaparib eine Inhibition des Tumorwachstums. Zudem zeigte sich eine erhöhte Konzentration von γ H2AX als Marker für DNA-Schäden; dies ging einher mit der gleichzeitigen verminderten Expression der DNA-Reparaturproteinen RAD51 und Ku80 (Miller et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor dem Hintergrund des oben beschriebenen Mechanismus der synthetischen Letalität, die Kombination aus PLX und Talazoparib eine

starke synergistische Wirkung auf die UCCs hat. Da die Synergie in den HBLAK Zellen deutlich geringer war, scheint diese Synergie tumorspezifisch zu sein.

4.2.3 Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt weniger starke synergistische Effekte auf die HBLAK Zellen

In den Viabilitätsassays konnte eine tumorspezifische Synergie nachgewiesen werden, wodurch diese tumorspezifische Synergie begründet ist, bedarf weiterer Betrachtung. In den HBLAK Zellen konnte im Western Blot nach PLX-Behandlung keine vermehrte PARP-Spaltung, als Marker für Apoptose festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den UCCs nach PLX-Behandlung eine PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die toxische Wirkung von PLX bei den HBLAK Zellen, weniger über die Induktion von Apoptose vermittelt wird als bei den UCCs. Diese divergente Reaktion auf eine Behandlung mit PLX konnte bereits in Zelllinien des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms nachgewiesen werden. Hier zeigte sich zwar ein reduziertes Tumorstadium bei, im Vergleich zu den UCCs, geringen Konzentration von PLX von 1 μM . Jedoch war auch hier die Apoptoseinduktion variabel abhängig von der Zelllinie (Zhu et al., 2019). Eine geringe Apoptoserate in den HBLAK-Zellen, im Vergleich zu den UCCs wäre eine mögliche Erklärung für die geringere Toxizität. Einschränkend ist allerdings zu beachten, dass in der zitierten Studie von Zhu et al. ausschließlich Karzinomzellen verwendet wurden und keine benignen Kontrollen. Die vermehrte Apoptoseinduktion in den UCCs im Vergleich zu den HBLAK Zellen, passt zu dem vermehrten Nachweis von phosphoryliertem γH2AX in den UCCs nach Behandlung mit PLX. Es konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes γH2AX , neben der Rekrutierung von Reparaturmolekülen bei DNA-Doppelstrangbrüchen, auch mit der Induktion von Apoptose assoziiert sein kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass γH2AX mit der caspase-aktivierten DNAase interagiert und für die Fragmentation und Degeneration der DNA, die im Rahmen der Apoptose stattfindet, notwendig ist (Lu et al., 2006).

Auch muss in diesem Zusammenhang Beachtung finden, dass die Behandlungskonzentration, mit denen die HBLAK Zellen behandelt wurden, teilweise unterhalb der halbletalen Dosis der HBLAK Zellen lagen, es ist also nicht geklärt, inwiefern eine Steigerung der Dosis zu einer vermehrten Abtötung der Zellen oder Entwicklung einer Synergie führen würde.

4.2.4 Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und Romidepsin zeigt sich der Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX unterlegen

In der kombinierten Behandlung mit Romidepsin und Talazoparib konnte eine solche Synergie in den UCCs nicht nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Wirkung von Romidepsin in der Einzelbehandlung und dem Prinzip der synthetischen Letalität als Ratio für die synergistische Wirkung von PLX und Talazoparib ist das ein erwartbares Ergebnis. Nach der Einzelbehandlung mit IC_{50} - Dosen Romidepsin war in der qPCR-Validierung keine Herabregulierung von *PARP 1 und 2* oder von *BRCA 1 oder 2* nachzuweisen, sodass in der Folge nicht von einer ausreichenden Hemmung des HR-Reparaturweges auszugehen ist. In der Literatur gibt es zwar Hinweise, dass in gewissen Tumorentitäten, wie dem Prostatakarzinom und dem Ewingsarkom, unter Zellkulturbedingungen eine Kombinationsbehandlung aus einem PARPi und einem HDACi zu einer synthetischen Letalität und damit einer verbesserten Wirksamkeit der Wirkstoffe führt (Ramos et al., 2023;

Yin et al., 2018). Es ist jedoch fraglich, ob diese Ergebnisse unmittelbar auf die vorliegende Fragestellung anwendbar sind, da es sich hier um andere Tumorentitäten handelt und andere Wirkstoffe verwendet wurden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden nur die Kombination aus Talazoparib und PLX in mehr Kombinationen und Konzentrationen weiter untersucht.

4.2.5 Sequenzielle Behandlung mit PLX/ TW09 und Cisplatin verbessert nicht die Effektivität der Behandlung

Basierend auf einer Arbeit von Zhang et al., wonach eine sequentielle Applikation von dem epigenetischen Inhibitor TW09 und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin im Vergleich zu der simultanen Gabe einen zusätzlichen antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen des Pankreaskarzinom hatte (Zhang et al., 2020), wurde auch eine sequentielle Behandlung der Zelllinien durchgeführt. Gemcitabin ist neben Cisplatin Bestandteil der Erstlinien beim metastasierten Urothelkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)). Bei TW09 handelt es sich um einen dualen BET/ HDAC-Inhibitor.

Die Untersuchungen wurden zum einen mit dem in der Originalarbeit verwendeten dualen Inhibitor TW09 durchgeführt und zum anderen mit PLX. Bei keinem der Wirkstoffkombinationen konnte der von Zhang et al. beschriebene synergistische antitumoröse Effekt reproduziert werden; es zeigte sich allerdings eine Verstärkung des synergistischen Effektes in den HBLAK Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine sequenzielle Behandlung der Zellen nicht weiter untersucht.

4.2.6 Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX zeigt auch in reduzierter Dosierung synergistische Effekte auf die UCCs

In den Kombinationsbehandlungen in dieser Arbeit hat sich die Kombination aus Talazoparib und PLX als die wirksamste Kombination erwiesen, sodass diese Behandlung folgend weiter untersucht wurde. Das Ziel für eine mögliche Kombinationsbehandlung ist zum einen die effektive Abtötung der Tumorzellen und zum anderen die Schonung des gesunden Gewebes. Letzteres wäre durch den Synergieeffekt über eine Reduktion der Dosis in der Behandlung zu erreichen. Um zu evaluieren, ob und in welchem Maße der synergistische Effekt, der in den vorhergegangenen Untersuchungen nachgewiesen wurde, eine Reduktion der Dosis möglich macht, wurden im Folgenden eine Behandlung mit einer für alle Zelllinien gleichen Dosis des epigenetischen Inhibitors und jeweils 1 μ M Talazoparib durchgeführt.

In diesen Behandlungen zeigte sich trotz der reduzierten Dosierung von Talazoparib und PLX weiterhin eine deutliche Reduktion der Zellviabilität. Die Dosierung von 1 μ M Talazoparib, lag bei allen Zelllinien unterhalb der IC₅₀ Konzentration. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl bei der Langzeitproliferation wie auch bei der Kurzzeitproliferation. Besonders bemerkenswert waren die Ergebnisse der Viabilitätsanalyse der Zelllinie UM-UC-3 nach Behandlung mit PLX und Talazoparib. Obwohl 4/5 Behandlungskonzentrationen von PLX deutlich unter der zelllinienspezifischen IC₅₀-Konzentration von 8 μ M lagen, zeigte sich bereits in den niedrigen Konzentrationsstufen eine deutliche Reduktion der Zellviabilität durch die Kombinationsbehandlung, auch wenn die angewendete PLX-Konzentration nur 1/16 des IC₅₀ betrug. Auch bei den Zelllinien HBLAK und VM-CUB-1 zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zellviabilität, obwohl keine so deutliche Überlegenheit der

Kombinationsbehandlung gegenüber der Einzelbehandlung deutlich wurde, wie bei UM-UC-3. Es kann also gefolgert werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit PLX und Talazoparib und der daraus entstehende Synergismus der Wirkstoffe eine deutlich effektivere Abtötung der Tumorzellen bewirkt und somit eine deutliche Dosisreduktion erlauben würde. Es bleibt noch offen, ob eine Konzentration gefunden werden kann, die die HBLAK Zellen in großen Teilen schont und gleichzeitig eine ausreichende Abtötung der UCCs bewirkt. Hierfür müssten folgend noch Experimente mit niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt werden und perspektivisch auch noch andere benigne Kontrollen untersucht werden.

Ein deutlicher Effekt auf beide UC-Zelllinien durch die Kombinationsbehandlung mit PLX und Talazoparib war auch auf die Langzeitproliferation nachweisbar. Hier zeigte sich sowohl bei VM-CUB-1 wie auch bei UM-UC-3 eine deutliche Inhibition der Langzeitproliferation im Vergleich zu den Einzelbehandlungen nach 14 Tagen. Hier ist nach 14 Tagen das Zellwachstum fast vollständig unterdrückt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Kombination aus PLX und Talazoparib auch in reduzierter Dosis weiterhin effektiv zu einer Abtötung von Tumorzellen führt und sowohl die Kurzzeit- wie auch die Langzeitproliferation hemmt.

4.2.7 Die Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX induziert Apoptose und induziert ein G2/M-Arrest in den UCCs

Weiterführend wurde mittels FACS-Analyse die Wirkung auf Apoptoseinduktion und Zellzyklusregulierung weiter untersucht. Zum Vergleich wurde die ebenfalls synergistische Kombinationsbehandlung aus PLX und Cisplatin untersucht.

Bei den Apoptosemessungen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung mit Talazoparib, verglichen mit der Kombinationsbehandlung mit Cisplatin. Bei Talazoparib zeigte sich in den UCCs ein deutlicher Anstieg der frühen und späten Apoptose; diese zeigte sich deutlich weniger in HBLAK. Das steht im Kontrast zu der Behandlung mit Cisplatin; hier zeigt sich in HBLAK von allen drei Zelllinien die deutlichste Induktion der Apoptose. Das hängt am ehesten mit der Empfindlichkeit von HBLAK Zellen gegenüber Cisplatin zusammen, es zeigte sich nämlich schon in der Einzelbehandlung mit Cisplatin eine deutliche Zunahme der Zellfraktion in der späten Apoptose. Gleichzeitig zeigt die Behandlung mit Cisplatin einen deutlich geringeren Effekt auf die UCCs.

Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich in der Zellzyklusanalyse. Hier zeigten sich für die UCCs, vor allem bei UM-UC-3, ein deutlicher G2/M-Arrest der Zellen durch die Kombinationstherapie mit Talazoparib. Bei den HBLAK-Zellen ließ sich dieser Effekt nicht in derselben Ausprägung beobachten. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich wieder bei der cisplatinhaltigen Kombinationsbehandlung. Hier reagierten die HBLAK-Zellen mit einem deutlichen G2/M-Arrest, während die UCCs deutlich geringe Alterationen im Zellzyklus aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Talazoparib und PLX in diesem Falle zum einen die deutlich schonendere Kombination für die normalen HBLAK Zellen war und zum andern, in Hinblick auf Apoptoseinduktion und Zellzyklusveränderungen, die deutlich größere Wirkung auf die UCCs, insbesondere UM-UC-3 hatte.

4.3 Schlussfolgerung: Epigenetische Inhibitoren sensitivieren UCCs für eine Behandlung mit Cisplatin und PARPi

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass epigenetische Inhibitoren, insbesondere der BETi PLX, das Potenzial haben, UCCs gegenüber einer cisplatinhaltigen Therapie zu sensitivieren. Allerdings zeigte sich in diesem Zusammenhang weiterhin das Problem der starken Toxizität der Therapie gegenüber normalen Urothelzellen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass PLX in einer simultanen Behandlung UCCs durch eine Veränderung der DNA-Reparaturmechanismen und Induktion von BRCAness für eine Therapie mit einem PARPi sensitivieren kann. Dieses würde eine Behandlung von nicht BRCA-mutierten Tumoren mit einem PARPi ermöglichen. Diese Behandlung zeigt sich in den UCCs hoch synergistisch, gleichzeitig wirkte sie deutlich weniger toxisch auf die Kontrollzelllinie. In dieser Kombination könnte ein vielversprechender neuer Therapieansatz liegen, der im nächsten Schritt in vivo am Mausmodell weiter untersucht werden sollte.

5 Literaturverzeichnis

- Agarwal, N., Azad, A. A., Carles, J., Fay, A. P., Matsubara, N., Heinrich, D., Szczylik, C., De Giorgi, U., Young Joung, J., Fong, P. C. C., Voog, E., Jones, R. J., Shore, N. D., Dunshee, C., Zschabitz, S., Oldenburg, J., Lin, X., Healy, C. G., Di Santo, N., . . . Fizazi, K. (2023). Talazoparib plus enzalutamide in men with first-line metastatic castration-resistant prostate cancer (TALAPRO-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, *402*(10398), 291-303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01055-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01055-3)
- Ahmad, A., Robinson, A. R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Weisberg, D. B., Hasty, P., Hoeijmakers, J. H., & Niedernhofer, L. J. (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, *28*(16), 5082-5092. <https://doi.org/10.1128/mcb.00293-08>
- Alfred Witjes, J., Lebet, T., Comp erat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Hernández, V., Espin os, E. L., Dunn, J., Rouanne, M., Neuzillet, Y., Veskim ae, E., van der Heijden, A. G., Gakis, G., & Ribal, M. J. (2017). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, *71*(3), 462-475. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.020>
- Arnemann, J. (2019). Homologe Rekombination. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 1143-1143). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3504
- Bellmunt, J., Paz-Ares, L., Cuello, M., Cecere, F. L., Albiol, S., Guillem, V., Gallardo, E., Carles, J., Mendez, P., de la Cruz, J. J., Taron, M., Rosell, R., & Baselga, J. (2007). Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol*, *18*(3), 522-528. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl435>
- Berenguer-Daize, C., Astorgues-Xerri, L., Odore, E., Cayol, M., Cvitkovic, E., Noel, K., Bekradda, M., MacKenzie, S., Rezai, K., Lokiec, F., Riveiro, M. E., & Ouafik, L. (2016). OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays in vitro and in vivo antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models. *Int J Cancer*, *139*(9), 2047-2055. <https://doi.org/10.1002/ijc.30256>
- Besaratinia, A., Cockburn, M., & Tommasi, S. (2013). Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics*, *8*(10), 1013-1022. <https://doi.org/10.4161/epi.25927>
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, *5*(9), 769-784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- Bönisch, H. (2016). Unselektiv zytotoxische Chemotherapeutika (Zytostatika). In K. H. Graefe, W. K. Lutz, & H. Bönisch (Eds.), *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie* (2., vollständig überarbeitete Auflage ed.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-003-129299>
- Bowry, A., Piberger, A. L., Rojas, P., Saponaro, M., & Petermann, E. (2018). BET Inhibition Induces HEXIM1- and RAD51-Dependent Conflicts between Transcription and Replication. *Cell Rep*, *25*(8), 2061-2069.e2064. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.079>
- Brandt, B., & Petrides, P. E. (2014). Spezifische Tumore – Entstehung, Progression und Therapie. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 649-659). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_53
- Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L. A., La Vecchia, C., Shariat, S., & Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, *63*(2), 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>

- Byrum, A. K., Vindigni, A., & Mosammamarast, N. (2019). Defining and Modulating 'BRCAness'. *Trends Cell Biol*, 29(9), 740-751. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.005>
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>
- Caracciolo, D., Riillo, C., Di Martino, M. T., Tagliaferri, P., & Tassone, P. (2021). Alternative Non-Homologous End-Joining: Error-Prone DNA Repair as Cancer's Achilles' Heel. *Cancers (Basel)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061392>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(8), 495-506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Crabb, S. J., Khalid, T., Woods, L., Frampton, G., & Shepherd, J. (2023). PARP Inhibitors for Metastatic Urothelial Carcinoma: A Systematic Review of Efficacy and Safety. *Bladder Cancer*, 9(4), 365-376. <https://doi.org/10.3233/BLC-230071>
- Crowley, L. C., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087247>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- D'Andrea, A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair (Amst)*, 71, 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>
- de Bono, J., Kang, J., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Reply. *N Engl J Med*, 383(9), 891. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2023199>
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370(Pt 3), 737-749. <https://doi.org/10.1042/bj20021321>
- Donati, B., Lorenzini, E., & Ciarrocchi, A. (2018). BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer*, 17(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0915-9>
- Duan, M., Ulibarri, J., Liu, K. J., & Mao, P. (2020). Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance. *Int J Mol Sci*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239248>
- Erkes, D. A., Field, C. O., Capparelli, C., Tiago, M., Purwin, T. J., Chervoneva, I., Berger, A. C., Hartsough, E. J., Villanueva, J., & Aplin, A. E. (2019). The next-generation BET inhibitor, PLX51107, delays melanoma growth in a CD8-mediated manner. *Pigment Cell Melanoma Res*, 32(5), 687-696. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12788>
- European Medicines Agency. (2019). Retrieved 31.03. from https://www.ema.europa.eu/de/documents/product-information/talzenna-epar-product-information_de.pdf
- European Medicines Agency. (2024). Retrieved 21.01. from https://www.ema.europa.eu/de/documents/overview/lynparza-epar-medicine-overview_de.pdf
- Fan, J., Stanfield, J., Guo, Y., Karam, J. A., Frenkel, E., Sun, X., & Hsieh, J. T. (2008). Effect of trans-2,3-dimethoxycinnamoyl azide on enhancing antitumor activity of romidepsin on human bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 14(4), 1200-1207. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-07-1656>
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G. C., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Ferri, E., Petosa, C., & McKenna, C. E. (2016). Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol*, 106, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.005>

- Ferry, K. V., Hamilton, T. C., & Johnson, S. W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol*, *60*(9), 1305-1313. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00441-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00441-x)
- Fiorentino, F. P., Marchesi, I., Schroder, C., Schmidt, R., Yokota, J., & Bagella, L. (2020). BET-Inhibitor I-BET762 and PARP-Inhibitor Talazoparib Synergy in Small Cell Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, *21*(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249595>
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., & Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell*, *9*(1), 45-57. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00429-4)
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, *357*(6348). <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
- Floyd, S. R., Pacold, M. E., Huang, Q., Clarke, S. M., Lam, F. C., Cannell, I. G., Bryson, B. D., Rameseder, J., Lee, M. J., Blake, E. J., Fydrych, A., Ho, R., Greenberger, B. A., Chen, G. C., Maffa, A., Del Rosario, A. M., Root, D. E., Carpenter, A. E., Hahn, W. C., . . . Yaffe, M. B. (2013). The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature*, *498*(7453), 246-250. <https://doi.org/10.1038/nature12147>
- Freissmuth, M. (2016). Chemotherapie von Tumorerkrankungen. In *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (pp. 785-845). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46689-6_61
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, *31*(15), 1869-1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., & Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*, *5*(5), e1257. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.428>
- Garcia, P. L., Miller, A. L., Gamblin, T. L., Council, L. N., Christein, J. D., Arnoletti, J. P., Heslin, M. J., Reddy, S., Richardson, J. H., Cui, X., van Waardenburg, R., Bradner, J. E., Yang, E. S., & Yoon, K. J. (2018). JQ1 Induces DNA Damage and Apoptosis, and Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Xenograft Model of Cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, *17*(1), 107-118. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0922>
- Giannopoulou, A. F., Velentzas, A. D., Konstantakou, E. G., Avgeris, M., Katarachia, S. A., Papandreou, N. C., Kalavros, N. I., Mpakou, V. E., Iconomidou, V., Anastasiadou, E., Kostakis, I. K., Papassideri, I. S., Voutsinas, G. E., Scorilas, A., & Stravopodis, D. J. (2019). Revisiting Histone Deacetylases in Human Tumorigenesis: The Paradigm of Urothelial Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1291. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1291>
- Giesen, Y., Plaaubbaum, W., Beth-Hübner, M., Brandt, B., Rupp, R., Neumann, V., Eickmann, U., Lindner, G., Auras, S., & Fröhlich, H.-P. (2019). *Aromatische Amine: Eine Arbeitshilfe in Berufskrankheiten-Ermittlungsverfahren*. DGUV/IFA.
- Grundy, G. J., & Parsons, J. L. (2020). Base excision repair and its implications to cancer therapy. *Essays Biochem*, *64*(5), 831-843. <https://doi.org/10.1042/EBC20200013>
- Helleday, T., Bryant, H. E., & Schultz, N. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*, *4*(9), 1176-1178. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.2031>
- Hoffmann, M. J., Meneceur, S., Hommel, K., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2021). Downregulation of Cell Cycle and Checkpoint Genes by Class I HDAC Inhibitors Limits Synergism with G2/M Checkpoint Inhibitor MK-1775 in Bladder Cancer Cells. *Genes (Basel)*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/genes12020260>
- Hohn, A., Kruger, K., Skowron, M. A., Bormann, S., Schumacher, L., Schulz, W. A., Hoffmann, M. J., Niegisch, G., & Fritz, G. (2016). Distinct mechanisms contribute to acquired cisplatin

- resistance of urothelial carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(27), 41320-41335. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9321>
- Hölscher, A. S., Schulz, W. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., & Hoffmann, M. J. (2018). Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. *Clin Epigenetics*, 10, 1. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0434-3>
- Hoy, S. M. (2018). Talazoparib: First Global Approval. *Drugs*, 78(18), 1939-1946. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1026-z>
- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 70(1), 106-119. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
- Hussain, M., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Roubaud, G., Ozguroglu, M., Kang, J., Bургents, J., Gresty, C., Corcoran, C., Adelman, C. A., . . . Investigators, P. R. T. (2020). Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 383(24), 2345-2357. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022485>
- Juan, A., Noblejas-Lopez, M. D. M., Bravo, I., Arenas-Moreira, M., Blasco-Navarro, C., Clemente-Casares, P., Lara-Sanchez, A., Pandiella, A., Alonso-Moreno, C., & Ocana, A. (2022). Enhanced Antitumoral Activity of Encapsulated BET Inhibitors When Combined with PARP Inhibitors for the Treatment of Triple-Negative Breast and Ovarian Cancers. *Cancers (Basel)*, 14(18). <https://doi.org/10.3390/cancers14184474>
- Takehi, Y., Hirao, Y., Kim, W. J., Ozono, S., Masumori, N., Miyanaga, N., Nasu, Y., & Yokomizo, A. (2010). Bladder Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol*, 40 Suppl 1, i57-64. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq128>
- Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Jaguva Vasudevan, A. A., Wang, C., Hansen, F. K., Wiek, C., Hanenberg, H., Gertzen, C., Gohlke, H., Kassack, M. U., Kurz, T., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2018). Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. *Clin Epigenetics*, 10(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0531-y>
- Karl, A., Grimm, T., Jokisch, F., Gaisa, N., & Stief, C. (2016). Nichtmuskelinvasives Harnblasenkarzinom. *Der Urologe*, 55(9), 1247-1258. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00120-016-0192-4.pdf>
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., & Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53(17), 3976-3985. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358726>
- Klinakis, A., Karagiannis, D., & Rampias, T. (2020). Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches. *Cell Mol Life Sci*, 77(4), 677-703. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03299-8>
- Koch, H.-G., Brix, J., & Heinrich, P. C. (2014). DNA-Mutationen und ihre Reparatur. In P. C. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 559-566). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_45
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Lee, L., Hizukuri, Y., Severson, P., Powell, B., Zhang, C., Ma, Y., Narahara, M., Sumi, H., Hernandez, D., Rajkhowa, T., Bollag, G., & Levis, M. (2021). A novel combination regimen of BET and FLT3 inhibition for FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 106(4), 1022-1033. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247346>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF). (2020). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Kurzversion 2.0 – 2020, AWMF-Registernummer: 032/038OL*

Retrieved 08.06. from <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>

- Letson, C., & Padron, E. (2019). Non-canonical transcriptional consequences of BET inhibition in cancer. *Pharmacol Res*, *150*, 104508. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104508>
- Li, F., Yang, C., Zhang, H. B., Ma, J., Jia, J., Tang, X., Zeng, J., Chong, T., Wang, X., He, D., & Guo, P. (2019). BET inhibitor JQ1 suppresses cell proliferation via inducing autophagy and activating LKB1/AMPK in bladder cancer cells. *Cancer Med*, *8*(10), 4792-4805. <https://doi.org/10.1002/cam4.2385>
- Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunmbam, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F., & Reed, E. (2000). Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, *20*(2a), 645-652.
- Li, X., Baek, G., Ramanand, S. G., Sharp, A., Gao, Y., Yuan, W., Welti, J., Rodrigues, D. N., Dolling, D., Figueiredo, I., Sumanasuriya, S., Crespo, M., Aslam, A., Li, R., Yin, Y., Mukherjee, B., Kanchwala, M., Hughes, A. M., Halsey, W. S., . . . Mani, R. S. (2018). BRD4 Promotes DNA Repair and Mediates the Formation of TMPRSS2-ERG Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *Cell Rep*, *22*(3), 796-808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.078>
- Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *6*(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- Li, Z., & Zhu, W. G. (2014). Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications. *Int J Biol Sci*, *10*(7), 757-770. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9067>
- Liu, Y., Han, X., Li, L., Zhang, Y., Huang, X., Li, G., Xu, C., Yin, M., Zhou, P., Shi, F., Liu, X., Zhang, Y., & Wang, G. (2021). Role of Nectin-4 protein in cancer (Review). *Int J Oncol*, *59*(5). <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5273>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, *481*(7381), 287-294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*, *16*(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
- Lu, C., Zhu, F., Cho, Y. Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W. Y., Bode, A. M., & Dong, Z. (2006). Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell*, *23*(1), 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.023>
- Mansour, W. Y., Rhein, T., & Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res*, *38*(18), 6065-6077. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq387>
- Miller, A. L., Fehling, S. C., Garcia, P. L., Gamblin, T. L., Council, L. N., van Waardenburg, R., Yang, E. S., Bradner, J. E., & Yoon, K. J. (2019). The BET inhibitor JQ1 attenuates double-strand break repair and sensitizes models of pancreatic ductal adenocarcinoma to PARP inhibitors. *EBioMedicine*, *44*, 419-430. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.035>
- Mio, C., Gerratana, L., Bolis, M., Caponnetto, F., Zanello, A., Barbina, M., Di Loreto, C., Garattini, E., Damante, G., & Puglisi, F. (2019). BET proteins regulate homologous recombination-mediated DNA repair: BRCAness and implications for cancer therapy. *Int J Cancer*, *144*(4), 755-766. <https://doi.org/10.1002/ijc.31898>
- Murai, J., Huang, S. Y., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., Ji, J., Takeda, S., & Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*, *72*(21), 5588-5599. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753>
- Niegisch, G., Gerullis, H., Lin, S. W., Pavlova, J., Gondos, A., Rudolph, A., Haas, G., Hennies, N., & Kramer, M. W. (2018). A Real-World Data Study to Evaluate Treatment Patterns, Clinical Characteristics and Survival Outcomes for First- and Second-Line Treatment in Locally Advanced and Metastatic Urothelial Cancer Patients in Germany. *J Cancer*, *9*(8), 1337-1348. <https://doi.org/10.7150/jca.23162>
- Niegisch, G., Hoffmann, M. J., Koutsogiannouli, E. A., & Schulz, W. A. (2015). [Epigenetics in urothelial cancer: Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options]. *Urologe A*, *54*(4), 526-532. <https://doi.org/10.1007/s00120-014-3756-1>

(Epigenetik des Urothelkarzinoms : Pathogenese, verbesserte Diagnostik und neue Therapieansätze.)

- Niegisch, G., Knievel, J., Koch, A., Hader, C., Fischer, U., Albers, P., & Schulz, W. A. (2013). Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urol Oncol*, 31(8), 1770-1779. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.06.015>
- O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*, 60(4), 547-560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>
- O'Donnell, P. H., Milowsky, M. I., Petrylak, D. P., Hoimes, C. J., Flaig, T. W., Mar, N., Moon, H. H., Friedlander, T. W., McKay, R. R., Bilen, M. A., Srinivas, S., Burgess, E. F., Ramamurthy, C., George, S., Geynisman, D. M., Bracarda, S., Borchiellini, D., Geoffrois, L., Maroto Rey, J. P., . . . Rosenberg, J. E. (2023). Enfortumab Vedotin With or Without Pembrolizumab in Cisplatin-Ineligible Patients With Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer. *J Clin Oncol*, 41(25), 4107-4117. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02887>
- O'Neil, N. J., Bailey, M. L., & Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nat Rev Genet*, 18(10), 613-623. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>
- Ozer, H. G., El-Gamal, D., Powell, B., Hing, Z. A., Blachly, J. S., Harrington, B., Mitchell, S., Grieselhuber, N. R., Williams, K., Lai, T. H., Alinari, L., Baiocchi, R. A., Brinton, L., Baskin, E., Cannon, M., Beaver, L., Goettl, V. M., Lucas, D. M., Woyach, J. A., . . . Lapalombella, R. (2018). BRD4 Profiling Identifies Critical Chronic Lymphocytic Leukemia Oncogenic Circuits and Reveals Sensitivity to PLX51107, a Novel Structurally Distinct BET Inhibitor. *Cancer Discov*, 8(4), 458-477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-17-0902>
- Patel, A. G., Sarkaria, J. N., & Kaufmann, S. H. (2011). Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(8), 3406-3411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013715108>
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Deenen, R., Köhrer, K., Arent, T., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2016). Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 15(2), 299-312. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-15-0618>
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Schulz, W. A., & Niegisch, G. (2017). HDACs and HDAC Inhibitors in Urothelial Carcinoma - Perspectives for an Antineoplastic Treatment. *Curr Med Chem*, 24(37), 4151-4165. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170207142740>
- Pommier, Y., O'Connor, M. J., & de Bono, J. (2016). Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*, 8(362), 362ps317. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9246>
- Pott, S., & Lieb, J. D. (2015). What are super-enhancers? *Nature Genetics*, 47(1), 8-12. <https://doi.org/10.1038/ng.3167>
- Powles, T., Bellmunt, J., Comperat, E., De Santis, M., Huddart, R., Loriot, Y., Necchi, A., Valderrama, B. P., Ravaud, A., Shariat, S. F., Szabados, B., van der Heijden, M. S., Gillissen, S., & clinicalguidelines@esmo.org, E. G. C. E. a. (2024). ESMO Clinical Practice Guideline interim update on first-line therapy in advanced urothelial carcinoma. *Ann Oncol*, 35(6), 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.03.001>
- Powles, T., Valderrama, B. P., Gupta, S., Bedke, J., Kikuchi, E., Hoffman-Censits, J., Iyer, G., Vulsteke, C., Park, S. H., Shin, S. J., Castellano, D., Fornarini, G., Li, J. R., Gumus, M., Mar, N., Loriot, Y., Flechon, A., Duran, I., Drakaki, A., . . . Investigators, E. V. T. (2024). Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. *N Engl J Med*, 390(10), 875-888. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2312117>
- Poyet, C., Jentsch, B., Hermanns, T., Schweckendiek, D., Seifert, H. H., Schmidtpeter, M., Sulser, T., Moch, H., Wild, P. J., & Kristiansen, G. (2014). Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer. *BMC Clin Pathol*, 14(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-14-10>

- Ramaiah, M. J., Tangutur, A. D., & Manyam, R. R. (2021). Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy. *Life Sci*, 277, 119504. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119504>
- Ramos, L., Truong, S., Zhai, B., Joshi, J., Ghaidi, F., Lizardo, M. M., Shyp, T., Kung, S. H. Y., Rezakhanlou, A. M., Oo, H. Z., Adomat, H., Le Bihan, S., Collins, C., Bacha, J., Brown, D., Langlands, J., Shen, W., Lallous, N., Sorensen, P. H., & Daugaard, M. (2023). A Bifunctional PARP-HDAC Inhibitor with Activity in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res*, 29(17), 3541-3553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-3897>
- Reinhold, A.-K., Jentho, E., Schäfer, S., Bauer, M., & Rittner, H. (2018). Epigenetik. *Der Anaesthesist*, 67(4), 246-254. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00101-018-0424-7.pdf>
- Rikiishi, H. (2011). Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 830260. <https://doi.org/10.1155/2011/830260>
- Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M. A. A., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., . . . Lerner, S. P. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171(3), 540-556.e525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>
- 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. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 451(7182), 1116-1120. <https://doi.org/10.1038/nature06633>
- Schmelz, Sparwasser, & Weinder. (2014). *Facharztwissen Urologie* (3rd ed.). Springer.
- Schulz, W. A., Koutsogiannouli, E. A., Niegisch, G., & Hoffmann, M. J. (2015). Epigenetics of urothelial carcinoma. *Methods Mol Biol*, 1238, 183-215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_10
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shuck, S. C., Short, E. A., & Turchi, J. J. (2008). Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*, 18(1), 64-72. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.2>
- Skowron, M. A., Melnikova, M., van Roermund, J. G. H., Romano, A., Albers, P., Thomale, J., Schulz, W. A., Niegisch, G., & Hoffmann, M. J. (2018). Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020590>
- Skowron, M. A., Niegisch, G., Fritz, G., Arent, T., van Roermund, J. G., Romano, A., Albers, P., Schulz, W. A., & Hoffmann, M. J. (2015). Phenotype plasticity rather than repopulation from CD90/CK14+ cancer stem cells leads to cisplatin resistance of urothelial carcinoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*, 34, 144. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0259-x>
- Soldani, C., & Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*, 7(4), 321-328. <https://doi.org/10.1023/a:1016119328968>
- Stark, G. R., & Taylor, W. R. (2004). Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol*, 280, 51-82. <https://doi.org/10.1385/1-59259-788-2:051>
- Sun, C., Yin, J., Fang, Y., Chen, J., Jeong, K. J., Chen, X., Vellano, C. P., Ju, Z., Zhao, W., Zhang, D., Lu, Y., Meric-Bernstam, F., Yap, T. A., Hattersley, M., O'Connor, M. J., Chen, H., Fawell, S., Lin, S. Y., Peng, G., & Mills, G. B. (2018). BRD4 Inhibition Is Synthetic Lethal with PARP Inhibitors through the Induction of Homologous Recombination Deficiency. *Cancer Cell*, 33(3), 401-416 e408. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.019>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide

- for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takashima, Y., Kikuchi, E., Kikuchi, J., Suzuki, M., Kikuchi, H., Maeda, M., Shoji, T., Furuta, M., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Sakakibara-Konishi, J., & Konno, S. (2020). Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1-inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 146(4), 1114-1124. <https://doi.org/10.1002/ijc.32515>
- Taubmann, A. (2015). *Untersuchung der DNADoppelstrangbruch-Reparatur über Homologe Rekombination am Übergang von der G2-Phase in die Mitose* TU Darmstadt]. Darmstadt.
- Tiago, M., Capparelli, C., Erkes, D. A., Purwin, T. J., Heilman, S. A., Berger, A. C., Davies, M. A., & Aplin, A. E. (2020). Targeting BRD/BET proteins inhibits adaptive kinome upregulation and enhances the effects of BRAF/MEK inhibitors in melanoma. *British Journal of Cancer*, 122(6), 789-800. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0724-y>
- Tollefsbol, T. O. (2017). *Handbook of Epigenetics* (2nd ed.). Elsevier.
- van der Heijden, M. S., Sonpavde, G., Powles, T., Necchi, A., Burotto, M., Schenker, M., Sade, J. P., Bamias, A., Beuzebec, P., Bedke, J., Oldenburg, J., Chatta, G., Urun, Y., Ye, D., He, Z., Valderrama, B. P., Ku, J. H., Tomita, Y., Filian, J., . . . CheckMate 901 Trial, I. (2023). Nivolumab plus Gemcitabine-Cisplatin in Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 389(19), 1778-1789. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309863>
- von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A., & Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 23(21), 4602-4608. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.07.757>
- Wan, P., Chen, Z., Zhong, W., Jiang, H., Huang, Z., Peng, D., He, Q., & Chen, N. (2020). BRDT is a novel regulator of eIF4EBP1 in renal cell carcinoma. *Oncol Rep*, 44(6), 2475-2486. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7796>
- Welsch. (2014). *Lehrbuch Histologie* (4th ed.). Elsevir.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, 277(1), 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>
- Wu, S. Y., & Chiang, C. M. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 282(18), 13141-13145. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700001200>
- Wu, X., Liu, D., Tao, D., Xiang, W., Xiao, X., Wang, M., Wang, L., Luo, G., Li, Y., Zeng, F., & Jiang, G. (2016). BRD4 Regulates EZH2 Transcription through Upregulation of C-MYC and Represents a Novel Therapeutic Target in Bladder Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 1029-1042. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-15-0750>
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26(37), 5541-5552. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620>
- Yan, Y., Yang, F. Q., Zhang, H. M., Li, J., Li, W., Wang, G. C., Che, J. P., Zheng, J. H., & Liu, M. (2014). Bromodomain 4 protein is a predictor of survival for urothelial carcinoma of bladder. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(7), 4231-4238. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4129038/pdf/ijcep0007-4231.pdf>
- Yang, L., Zhang, Y., Shan, W., Hu, Z., Yuan, J., Pi, J., Wang, Y., Fan, L., Tang, Z., Li, C., Hu, X., Tanyi, J. L., Fan, Y., Huang, Q., Montone, K., Dang, C. V., & Zhang, L. (2017). Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition. *Sci Transl Med*, 9(400). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal1645>
- Yin, L., Liu, Y., Peng, Y., Peng, Y., Yu, X., Gao, Y., Yuan, B., Zhu, Q., Cao, T., He, L., Gong, Z., Sun, L., Fan, X., & Li, X. (2018). PARP inhibitor veliparib and HDAC inhibitor SAHA synergistically co-

- target the UHRF1/BRCA1 DNA damage repair complex in prostate cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0810-7>
- Zentrum für Krebsregisterdaten , R. K. I. (2021). Retrieved 06.06. from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasen_krebs_node.html;jsessionid=B40FB613422EC276ED4E71DF4B74C1B0.internet101
- Zhang, L., Zhang, J., Jiang, Q., Zhang, L., & Song, W. (2018). Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 33(1), 714-721. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1417274>
- Zhang, X., Zegar, T., Weiser, T., Hamdan, F. H., Berger, B.-T., Lucas, R., Balourdas, D.-I., Ladigan, S., Cheung, P. F., Liffers, S.-T., Trajkovic-Arsic, M., Scheffler, B., Joerger, A. C., Hahn, S. A., Johnsen, S. A., Knapp, S., & Siveke, J. T. (2020). Characterization of a dual BET/HDAC inhibitor for treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 147(10), 2847-2861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.33137>
- Zhang, Y., Duan, S., Jang, A., Mao, L., Liu, X., & Huang, G. (2021). JQ1, a selective inhibitor of BRD4, suppresses retinoblastoma cell growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Exp Eye Res*, 202, 108304. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108304>
- Zhu, X., Park, S., Lee, W. K., & Cheng, S. Y. (2019). Potentiated anti-tumor effects of BETi by MEKi in anaplastic thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 26(9), 739-750. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0107>

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Frau Priv. Doz. Michèle Hoffmann-Massier für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ich wurde stets mit großer fachlicher Kompetenz und wertvollen Anregungen unterstützt. Auch für ihre Geduld und ihr Vertrauen in meine Arbeit bin ich ihr sehr dankbar.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Kollegen aus dem Labor bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere bei Christiane Hader für ihre engagierte Unterstützung und die vielen hilfreichen Tipps und Kniffe.

Ein weiterer Dank gebührt an dieser Stelle meiner Schwester Julia, die mir immer eine große Unterstützung war und zusätzlich bei IT-Problemen jeder Art immer eine Lösung parat hatte.

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