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

Wirkungsanalyse epigenetischer Inhibitoren auf die Zelltodregulation in Harnblasenkarzinomzelllinien

Dissertation

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

vorgelegt von
Leandra Lepping
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 J. Hoffmann-Massier
Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meiner Familie

Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom (UC) stellt den häufigsten Subtyp des Harnblasenkarzinoms dar und ist in fortgeschrittenen Stadien mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert. Einen bedeutenden Therapiebaustein stellen Chemotherapeutika, allen voran Cisplatin, dar, die jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen sowie Resistenzbildung einhergehen. Diese Umstände unterstreichen den Bedarf nach neuen Therapieoptionen für das UC. Studien haben gezeigt, dass die Fehlregulation der Apoptose, wie der *B-cell lymphoma 2* (BCL-2)-Familie sowie der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Gruppe, an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt sind und die Ausbildung von Therapieresistenzen begünstigen. Darüber hinaus spielen epigenetische Veränderungen eine Rolle, die mannigfaltig sind und die Aberration von Histondeacetylasen (HDACs) einschließen. Der Einsatz epigenetischer Inhibitoren (EPIis) kann hier Abhilfe schaffen. Im UC sind die Fehlregulation der Apoptose sowie der Effekt von EPIis noch nicht in Gänze verstanden. Mithilfe dieser Arbeit sollte das Wissen um apoptotische sowie epigenetische Veränderungen im UC erweitert und genutzt werden, um potentere Therapien zu finden. Dazu wurden zunächstmit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) und der *Western-Blot*-Analyse das Niveau verschiedener Apoptosefaktoren der BCL-2-Familie sowie der IAP-Gruppe in UC-Zelllinien (UCCs), Cisplatin resistenten Sublinien (LTTs) und Kontrollzelllinien bestimmt. Hier zeigte sich, dass pro- und antiapoptotische Faktoren im UC zelllinien- und faktorabhängig aberrant vorliegen. In der Tendenz wurden antiapoptotische Faktoren überexprimiert. Eine Behandlung mit EPIis veränderte die Expression der Apoptosefaktoren sowohl in Richtung einer vermehrten als auch einer verminderten Synthese. Die induzierten Veränderungen variierten in Abhängigkeit von dem verwendeten epigenetischen Inhibitor. Darüber hinaus wurde das Niveau weiterer am Zelltod beteiligten Faktoren verändert, wie z.B. von Caspasen und Hitzeschockproteinen, was sich anhand eines durchgeführten Apoptose Protein *Array*s zeigen ließ. Um die Wirksamkeit von HDACis in Kombination mit BCL-2-Inhibitoren (BCL-2is) auf die Zelltodinduktion zu untersuchen, wurden MTT-Tests durchgeführt, die zeigten, dass sich der BCL-2-Inhibitor (BCL-2i) Navitoclax aufgrund seiner Toxizität gegenüber normalem Harnblasengewebe für die Behandlung des UC nicht eignete. In Kombination mit Venetoclax zeigten sich teils synergistische Effekte. Der Effekt von EPIis und HDAC-*Small interfering* RNA (siRNA) auf die Zelltodform in UCCs wurde durchflusszytometrisch untersucht und ergab, dass UCCs nach einer Behandlung vorrangig durch eine Mischung von Apoptose und Nekrose zugrunde gingen. Das Zellsterben war u.a. auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zurückzuführen, was mittels Fluoreszenzfärbung nachgewiesen wurde. Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und HDAC2 zeigt eine stärkere zelltodinduzierende Wirkung als der einzelne *Knockdown* dieser Enzyme. HDACis hatten eine stärkere zelltodinduzierende Wirkung als HDAC-siRNA Abschließend lässt sich sagen, dass die Fehlregulation von Apoptosefaktoren im UC die Therapie erschweren und zur Resistenzausbildung führen kann. Die Verwendung von EPIis, eventuell gepaart mit weiteren Medikamenten, könnte Abhilfe leisten.

Summary

Urothelial carcinoma (UC) is the most common subtype of bladder cancer and is associated with a poor survival prognosis in advanced stages. Chemotherapeutic agents, above all cisplatin, represent an important therapeutic component, but are associated with numerous side effects and the development of resistance. These circumstances emphasise the need for new treatment options for UC. Studies have shown that the dysregulation of apoptosis, such as the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family and the inhibitor of apoptosis (IAP) group, is involved in the development of cancer and favours the development of resistance to therapy. In addition, epigenetic changes play a role, which are manifold and include the aberration of histone deacetylases (HDACs). The use of epigenetic inhibitors (EPIis) can provide a remedy here. In UC, the dysregulation of apoptosis and the effect of EPIis are not yet fully understood. With the help of this work, the knowledge of apoptotic and epigenetic changes in UC should be expanded and used to find more potent therapies. To this end, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot analysis were used to determine the level of various apoptosis factors of the BCL-2 family and the IAP group in UC cell lines (UCCs), cisplatin-resistant sublines (LTTs) and control cell lines. This showed that pro- and anti-apoptotic factors are aberrantly present in the UC depending on the cell line and factor. There was a tendency for anti-apoptotic factors to be overexpressed. Treatment with EPIis altered the expression of apoptosis factors in the direction of both increased and decreased synthesis. The induced changes varied depending on the epigenetic inhibitor used. In addition, the level of other factors involved in cell death, such as caspases and heat shock proteins, was altered, as demonstrated by an apoptosis protein array. To investigate the efficacy of HDACis in combination with BCL-2 inhibitors (BCL-2is) on cell death induction, MTT tests were performed which showed that the BCL-2 inhibitor (BCL-2i) navitoclax was not suitable for the treatment of UC due to its toxicity to normal urinary bladder tissue. In combination with venetoclax, synergistic effects were seen in some cases. The effect of EPIis and HDAC-Small interfering RNA (siRNA) on cell death in UCCs was analysed by flow cytometry and revealed that UCCs died primarily by a mixture of apoptosis and necrosis after treatment. The cell death was partly due to the induction of DNA double-strand breaks, which was detected by fluorescence staining. The combined knockdown of HDAC1 and HDAC2 shows a stronger cell death-inducing effect than the individual knockdown of these enzymes. HDACis had a stronger cell death-inducing effect than HDAC-siRNA In conclusion, it can be said that the misregulation of apoptosis factors in UC can complicate therapy and lead to the development of resistance. The use of EPIis, possibly paired with other drugs, could provide a remedy.

Abkürzungsverzeichnis

°C	*Grad Celsius*	*BET*	*Bromodomain and extraterminal domain*
5-JÜ	*5-Jahres-Überleben*	*BETi*	*BET-Inhibitor*
ADCs	*Antikörper-Konjugate*	*BETis*	*BET-Inhibitoren*
AML	*Akute myeloische Leukämie*	*BH-Domäne*	*BCL-2 homologe Domäne*
AP-1	*Aktivator-Protein-1*	*BID*	*BH3 interacting domain death agonist*
Apaf-1	*apoptotic protease activating factor 1*	*BIM*	*Bcl-2-interacting mediator of cell death*
APS	*Ammoniumpersulfat*	*BIRC3*	*Baculoviral IAP Repeat Containing 3*
AT	*Annealing-Temperatur*	*BIRC5*	*Baculoviral IAP Repeat Containing*
BAK	*Bcl-2 homologous antagonist*	*BRCA*	*breast cancer gene*
BAX	*Bcl-2 associated X protein*	*BRDS*	*Bromodomänen*
BCA	*Bicinchoninsäure*	*BRDT*	*Bromodomain testis-specific*
BCL-2	*B-cell lymphoma 2*	*BSA*	*Bovines Serumalbumin*
BCL-2i	*BCL-2-Inhibitor*	*CAR*	*chimeric antigen receptor*
BCL-2is	*BCL-2-Inhibitoren*	*CARDs*	*Caspase-Rekrutierungsdomänen*
BCL-W	*Bcl-2-like protein 2*	*cDNA*	*Komplementäre DNA*
BCL-XL	*B-cell lymphoma-extra large*	*cFLIP*	*cellular FLICE-like inhibitory protein*
BCL-XS	*B-cell lymphoma-extra short*	*DNMTi*	*DNA-Methyltransferaseinhibitor*

DNMTis	*DNA-Methyltransferaseinhibitoren*	*HDACis*	*HDAC-Inhibitoren*
DNMTs	*DNA-Methyltransferasen*	*HDACs*	*Histondeacetylasen*
DOC	*Natriumdeoxycholat*	*HIF1α*	*Hypoxie-induzierter Faktor alpha*
DRs	*Todesrezeptoren*	*HO*	*Hämoxygenase*
DSBs	*DNA-Doppelstrangbrüche*	*HRP*	*horseradish peroxidase*
EDTA	*Ethylendiamintetraessigsäure*	*HSP*	*Hitzeschockprotein*
EPIi	*Epigenetischer Inhibitor*	*HtrA2*	*Serine protease HTRA2, mitochondrial*
EPIis	*Epigenetische Inhibitoren*	*IAP*	*inhibitor of apoptosis*
FA	*Formaldehyd*	*IC50*	*Mittlere inhibitorische Konzentration*
FACS	*Durchflusszytometrie*	*i.d.R.*	*in der Regel*
FADD	*Fas-Associating Death Domain-Containing Protein*	*JNK*	*c-JUN-N-terminale Kinase*
FBS	*Fetales Kälberserum*	*kDa*	*Kilodalton*
FCS	*Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum*	*LTT*	*Cisplatin resistente UCC*
FITC	*Fluorescein Isothiocyanat*	*LTTs*	*Cisplatin resistente UCCs*
GvHD	*Graft-versus-Host Reaktion*	*MAP*	*mitogen-activated protein*
H_2O	*Wasser*	*MCL-1*	*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*
Harnblasen-CA	*Harnblasenkarzinom*	*MDS*	*Myelodysplastisches Syndrom*
HCl	*Salzsäure*	*MEKis*	*MEK-Inhibitoren*
HDAC	*Histondeacetylase*	*MEM*	*Minimal Essential Medium*
HDACi	*HDAC-Inhibitor*	*ml*	*Milliliter*

mm	*Millimeter*	*PARPs*	*Poly(ADP-ribose) Polymerasen*
mM	*Millimol*	*PBS*	*Phosphatgepufferte Salzlösung*
MOMP	*mitochondrial outer membrane permeabilization*	*P-gp*	*P-Glykoprotein*
mRNA	*Messenger-RNA*	*Plattenepithel-CA*	*Plattenepithelkarzinom*
n	*Normalgewebe*	*PON2*	*Serum paraoxonase/arylesterase 2*
NaCl	*Natriumchlorid*	*pRad17*	*phosphoryliertes Rad17*
NAD^+	*Nikotinamidadenindinukleotid*	*PTCL*	*Peripheres T-Zell-Lymphom*
NER	*Nukleotidexzisionsreparatur*	*PUMA*	*p53 upregulated modulator of apoptosis*
ng/µl	*Nanogramm pro Mikroliter*	*qRT-PCR*	*quantitative Real-Time PCR*
nm	*Nanometer*	*r*	*Korrelationskoeffizient*
nM	*Nanomol*	*R^2*	*Bestimmtheitsmaß*
NOXA	*Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-induziertes Protein 1*	*Rb*	*Retinoblastom-Protein*
nTPM	*normalized Transcripts Per Million*	*RIPA*	*Radioimmunoprecipitation Assay*
o.g.	*oben genannt*	*RNA*	*Ribonukleinsäure*
PAA	*Polyacrylamid*	*RNase*	*Ribonuclease*
PARP	*Poly(ADP-ribose)-Polymerase*	*ROS*	*Reaktive Sauerstoffspezies*
PARPi	*PARP-Inhibitor*	*rpm*	*rounds per minute*
PARPis	*PARP-Inhibitoren*	*RT*	*Raumtemperatur*

SAM	*S-Adenosylmethionin*	*Trx*	*Thioredoxinreduktase*
SDS	*Natriumdodecylsulfat*	*TURBT*	*Transurethrale Resektion des Blasentumors*
siRNA	*small interfering Ribonukleinsäure*	*u.a.*	*unter anderem*
SIRT	*Sirtuine*	*UC*	*Urothelkarzinom*
STAT3	*signal transducer and activator of transcription 3*	*UCC*	*UC-Zelllinie*
STR	*Short tandem repeats*	*UCCs*	*UC-Zelllinien*
tBID	*Truncated BID*	*v.a.*	*vor allem*
TBP	*TATA-Bindeprotein*	*VEGF*	*vascular endothelial growth factor*
TBS	*Tris-buffered saline*	*XIAP*	*X-Linked Inhibitor of Apoptosis*
TBS-T	*Tris-buffered saline with TWEEN20*	*z.B.*	*zum Beispiel*
TBTB	*Thiazolylblau-tetrazoliumbromid*	*ZL*	*Zelllinie(n)*
TEMED	*Tetramethylethylendiamin*	*µl*	*Mikroliter*
TNF	*Tumornekrosefaktor*	*µm*	*Mikrometer*
TNM	*Tumor node metastasis*	*µM*	*Mikromol*
TRADD	*Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein*		
TRAIL	*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*		
Tris	*Tris(hydroxymethyl)aminomethan*		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das Harnblasenkarzinom 1

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation 1

1.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose 2

1.2 Die Apoptose 2

1.2.1 Grundlagen der Apoptose: Caspasen und ihre Funktion 2

1.2.2 Die extrinsische Apoptose 3

1.2.3 Die intrinsische Apoptose 4

1.2.4 Die BCL-2-Proteinfamilie 6

1.2.5 BH3-*Mimetika* 7

1.2.6 Die Fehlregulation der Apoptose im UC 8

1.3 Epigenetik 8

1.3.1 Epigenetische Mechanismen und ihre Einflussfaktoren 8

1.3.2 DNA-Methylierung 9

1.3.2.1 DNMT-Inhibitoren 10

1.3.3 Die *Bromodomain and extraterminal domain* (BET)-Familie 10

1.3.3.1 BET-Inhibitoren 11

1.3.4 Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACis) 12

1.3.4.1 Die HDACis Romidepsin und Quisinostat 13

1.3.5 Epigenetische Modifikationen im UC 14

1.4 Einflussnahme auf die DNA-Reparatur 15

1.4.1 Die Funktionsweise von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) 15

1.4.2 PARP-Inhibitoren 16

1.5 Zielsetzung 17

2 Material 18

2.1 Zellkulturmaterialien 18

2.2 Funktionelle Tests 20

2.3 RNA-Analyse 22

2.4 Protein-Analyse 24

2.5 *Software* 27

3 Methoden 28

3.1 Anzucht der UCCs und der Kontrollzelllinie HBLAK 28

3.1.1 Anzucht der UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 28

3.1.2 Anzucht der Kontrollzelllinie HBLAK 28

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl 29

3.1.4 Aussaat in *Wells* 29

3.2 Funktionelle Tests 30

3.2.1 MTT-Test 30

3.2.1.1 Chou-Talalay-Analysen 31

3.2.1.2 Bestimmung des IC50-Werts von Navitoclax 31

3.2.2 Zelltodanalyse mittels FACS-Messung 32

3.2.3 HDAC-*Knockdown* durch siRNA-Transfektion 33

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung nach siRNA-Transfektion 34

3.3 Ribonukleinsäure (RNA)-Analyse 34

3.3.1 Isolation der RNA 34

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop 35

3.3.3 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription 35

3.3.4 Durchführung der quantitativen *Real-time* PCR (qRT-PCR) 36

3.4 Protein-Analyse 37

3.4.1 Durchführung der Proteinextraktion 37

3.4.2 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Tests 38

3.4.3 SDS-*Page* 38

3.4.4 *Western Blot* 39

3.4.5 *Stripping* 40

3.4.6 *Proteome Profiler Array* 40

3.4.6.1 Probenvorbereitung 40

3.4.6.2 Durchführung des *Arrays* 41

3.4.6.3 Proteindetektion 41

3.5 Statistik 42

4 Ergebnisse 43

4.1 Die Apoptose ist im UC fehlreguliert 43

4.1.1 Pro- und antiapoptotische Faktoren sind in UCCs auf *messenger* RNA (mRNA)-Ebene fehlreguliert 43

4.1.2 Die Abundanz von Apoptosefaktoren kann sich auf mRNA- und Proteinebene unterscheiden 52

4.1.3 Die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren korreliert in UCCs oftmals nicht miteinander 53

4.2 Epigenetische Inhibitoren verändern die Expression von Apoptosefaktoren im UC 55

4.2.1 Epigenetische Inhibitoren verändern die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren auf mRNA-Ebene 55

4.2.2 Epigenetische Inhibitoren verändern die Abundanz verschiedener Apoptosefaktoren auf Proteinebene nur marginal 65

4.2.3 HDACis verändern die Bildung verschiedenster pro- und antiapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene 67

4.2.4 Die Kombinationsbehandlung mit einem PARPi und einem BETi verändert die Genexpression in UCCs und LTTs stärker als eine Einzelbehandlung 70

4.3 Die Hemmung und der *Knockdown* von HDACs führen zu Zelltod in Form einer Mischung aus Apoptose und Nekrose 74

4.3.1 HDACis führen im UC zu Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose 74

4.3.2 Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 induziert potenter den Zelltod als ein alleiniger *Knockdown* 78

4.3.3 Die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ist an der Zelltodinduktion im UC beteiligt 83

4.4 Wirkungsanalysen von HDACis in Kombination mit BCL-2is im UC 87

4.4.1 Die Kombination von HDACis mit Venetoclax wirkt in UCCs teils synergistisch und teils antagonistisch 87

4.4.2 Die IC50-Werte von Navitoclax variieren zelllinienabhängig stark 90

5 Diskussion 94

5.1 Die Bedeutung der fehlregulierten Apoptose im UC 94

5.1.1 Die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren ist im UC fehlreguliert 94

5.1.2 BIRC5: Ein Schlüsselfaktor der Apoptose im UC? 97
5.1.3 Die Fehlregulation von Apoptosefaktoren trägt im UC zur Entstehung der Cisplatinresistenz bei 98
5.1.4 Die komplexen Interaktionen der Apoptosefaktoren im UC 99

5.2. EPIis verändern die Expression von Apoptosefaktoren im UC 101
5.2.1 EPIis und Apoptosefaktoren im UC: Zelllinienabhängige Effekte 101
5.2.2 Synergistische Effekte von PARPis und BETis auf die Expression von Apoptosefaktoren im UC 104

5.3 HDACis induzieren Zelltod im UC 106
5 3.1 HDACis im UC: Multimechanistische Induktion von Apoptose und Nekrose 106
5.3.2 Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 führt zu Zelltod und DSBs im UC 107

5.4 Kombinationsbehandlungen von HDACis und BCL-2is im UC 109
5.4.1 Synergistische Effekte der HDACis- und Venetoclax-Kombination 109
5.4.2 Die begrenzte Anwendbarkeit von Navitoclax im UC 110

6 Abbildungsverzeichnis 112

7 Tabellenverzeichnis 115

8 Literaturverzeichnis 117

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Die Harnblase ist ein muskuläres Hohlorgan, das im menschlichen Körper für die Harnspeicherung und -entleerung sorgt (Andersson & Arner, 2004). Ihre malignen Erkrankungen werden häufig unter dem Begriff des Harnblasenkarzinoms (Harnblasen-CA) zusammengefasst (Chalasani et al., 2009), das weltweit zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen gehört (Sung et al., 2021). In Deutschland belegte das Harnblasen-CA im Jahr 2020 Platz zwölf der am weitesten verbreiteten bösartigen Neubildungen bei der Frau und Platz vier beim Mann. Im selben Jahr wurden in der Bundesrepublik rund 31.000 Harnblasen-CAs neu diagnostiziert und ca. 5.800 Todesfälle verzeichnet, die im Zusammenhang mit der Erkrankung standen (Robert Koch Institut, 2023). Das Harnblasen-CA tritt gehäuft in Europa und Nordamerika auf (Sung et al., 2021) und betrifft vorrangig Männer, die mit einer viermal höheren Wahrscheinlichkeit daran erkranken als Frauen (Cook et al., 2009). Neben dem Geschlecht spielt das Alter eine prädisponierende Rolle, denn das Harnblasen-CA findet sich vorrangig im geriatrischen Behandlungs-*Setting* wieder. Im Mittel beläuft sich das Alter bei Diagnosestellung für Männer auf 75 Jahre, Frauen sind im Schnitt zwei Jahre älter (Robert Koch Institut, 2023). Obwohl Alter und Geschlecht wichtige prädisponierende Faktoren darstellen, gelten das Vorliegen einer Raucherhistorie bzw. der aktive Konsum als relevanteste Risikofaktoren (Freedman et al., 2011). Neben persönlichem Leid geht das Harnblasen-CA mit großen finanziellen Herausforderungen für das Gesundheitssystem einher (Mossanen & Gore, 2014).

Wie eingangs erwähnt, stellt die Bezeichnung des Harnblasen-CA einen Sammelbegriff für verschiedene maligne Erkrankungen der Harnblase dar. 90 % entfallen auf das Urothelkarzinom (UC). Die restlichen 10 % setzen sich aus dem basal-squamösen Subtyp sowie seltenere Formen zusammen (Chalasani et al., 2009). Das Harnblasen-CA kann lokal begrenzt, aber auch infiltrativ wachsen. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der *Tumor node metastasis* (TNM)-Klassifikation, wobei das „T“ die Tumorgröße beschriebt, „N“ den Lymphknotenbefall und „M“ den Metastasierungsgrad definiert. Ab dem Stadium pT2 ist von einem muskel-invasiven Harnblasen-CA die Rede (Cheng et al., 2009), auf das rund 30 % aller Harnblasen-CAs entfallen (Saginala et al., 2020). Es geht mit einer besonders schlechten Prognose einher (Kang et al., 2015). Aufgrund der Häufigkeit des UC werden im weiteren Verlauf die Begriffe „UC“ und „Harnblasen-CA“ synonym verwendet.

1.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Zu den *Red flags*, die auf ein UC hindeuten, zählen der Nachweis von Blut im Urin (Hämaturie) sowie unspezifische Symptome, wie Bauchschmerzen oder erschwertes Wasserlassen (Shephard et al., 2012). Bislang steht kein Testverfahren zur Verfügung, das die zuverlässige Früherkennung eines UC ermöglicht (Cumberbatch & Noon, 2019). Im Verdachtsfall gilt die Harnblasenspiegelung, im Rahmen derer Gewebeproben für die finale Diagnosestellung gewonnen werden, als empfohlenes Procedere (Powles et al., 2021).

Die Therapie des UC richtet sich nach seinem Invasionsgrad: Lokal begrenzte CA werden minimalinvasiv behandelt. Ihre Entfernung über die Harnröhre, die sog. Transurethrale Resektion des Blasentumors (TURBT), stellt dabei das Standardprozedere dar. Ihr schließt sich häufig eine lokale Chemotherapie an (Hall et al., 2007). Die Entfernung des invasiven UC gestaltet sich aufwändiger und beinhaltet neben der Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie häufig die operative Entfernung der Harnblase. Im Rahmen der neoadjuvanten Chemotherapie können gängige Chemotherapeutika, darunter Cisplatin, Verwendung finden, aber auch neuere Medikamente eingesetzt werden. Zu diesen zählen die Immunc*heckpoint*-Inhibitoren (Niegisch et al., 2022) oder Antikörper-Konjugate (ADCs) (Kim & Chang, 2022). Eine Behandlung mit Cisplatin geht mit zahlreichen, teils gravierenden Nebenwirkungen einher (Florea & Büsselberg, 2011) und zeigt darüber hinaus in verschiedenen Tumorentitäten nur marginale therapeutische Erfolge (Dasari & Tchounwou, 2014). Erschwerend kommt hinzu, dass die Ausbildung einer Cisplatinresistenz im UC häufig beobachtet wird (Buttigliero et al., 2017).

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten, die an einem UC leiden, variiert in Abhängigkeit von dessen Invasionsgrad: Patienten mit einem lokal begrenzten Tumorwachstum weisen eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 70 % auf. Wächst das UC jedoch stark infiltrativ und geht mit der Bildung von Metastasen einher, so sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf lediglich 5 % (Siegel et al., 2018).

1.2 Die Apoptose

1.2.1 Grundlagen der Apoptose: Caspasen und ihre Funktion

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, kann basierend auf ihrem Aktivierungsmodus in zwei Typen unterteilt werden, die als intrinsische sowie extrinsische Form bezeichnet werden (Pfeffer & Singh, 2018). Bedeutende Apoptosestimili stellen Schäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Bartkova et al., 2005) oder Zellgifte (Jamshidi-Adegani et al., 2022) dar. Im Verlauf der Apoptose treten charakteristische

Veränderungen der Zellgestalt auf. Diese beinhalten die „Kondensation des Zellkerns und des Zytoplasmas und die Fragmentierung der Zelle in eine Reihe von membrangebundenen, ultrastrukturell gut erhaltenen Fragmenten“. Diese werden final durch spezialisierte Zellen entfernt, wodurch eine Entzündungsreaktion ausbleibt (Kerr et al., 1972). Die Apoptose gilt als ein überlebensnotwendiger Vorgang (Thompson, 1995), für dessen Ablauf die Caspasen essenziell sind (Hua et al., 2013; Zuo et al., 2020). Bei ihnen handelt es sich um proteinspaltende Enzyme, deren katalytische Domäne Cystein aufweist und die Substrate hinter Aspartatresten spalten (Earnshaw et al., 1999). Im menschlichen Körper konnten bis heute zwölf verschiedene Caspasen identifiziert werden, die sich drei Gruppen zuordnen lassen (Shalini et al., 2014):

1. Initiatorcaspasen: Caspasen 2, 8, 9, 10;
2. Effektorcaspasen: Caspasen 3, 6, 7;
3. Inflammatorische Caspasen: Caspasen 1, 4, 5, 11, 12.

Die Caspasen liegen als inaktive Vorläufer im Zytoplasma vor (Earnshaw et al., 1999). Ihre Aktivierung erfolgt mittels Proteolyse durch die Initiatorcaspasen (Stennicke & Salvesen, 1999), die wiederum durch proapoptotische Stimuli aktiviert werden (Bao & Shi, 2006).

1.2.2 Die extrinsische Apoptose

Die extrinsische Apoptose wird durch äußere Reize *getriggert*, die vielgestaltig sein können (Rehemtulla et al., 1997; Zhou et al., 2017) und durch die Interaktion von Liganden mit spezialisierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche ins Innere fortgetragen werden. Die „Todesrezeptoren (DRs) gehören der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie an“. Ihr Name geht auf eine intrazellulär lokalisierte Todesdomäne (DD) zurück (Ashkenazi & Dixit, 1998). Die DD ermöglicht die Interaktion der DRs mit Adapterproteinen, darunter *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein* (TRADD), das zu Beginn der extrinsischen Apoptose an die DRs rekrutiert wird (Hsu et al., 1995). TRADD besitzt ebenfalls eine DD, über die es im nächsten Schritt *Fas-Associating Death Domain-Containing Protein* (FADD) bindet (Bender et al., 2005). „FADD verfügt über eine Todeseffektordomäne (DED)“ (Chinnaiyan et al., 1995), die unter anderem (u.a.) der Rekrutierung von Pro-Caspase 8 dient (Carrington et al., 2006). Der Komplex aus DR, Adapterproteinen sowie Pro-Caspase 8 wird als *death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet und ermöglicht die Aktivierung der Caspase (Kischkel et al., 1995). Caspase 8 gehört der Gruppe der Initiatorcaspasen an und ist als solche für die Aktivierung der Effektorcaspasen notwendig (Shalini et al., 2014). Die Umsetzung von Pro-Caspase 8 zu

Caspase 8 kann durch *cellular FLICE-like inhibitory protein* (cFLIP) unterbunden werden (Chang et al., 2002). Die Mitglieder der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Gruppe, repräsentiert durch *X-Linked Inhibitor of Apoptosis* (XIAP), führen zu dem Funktionsverlust der Effektorcaspasen, darunter 3 und 7 (Scott et al., 2005). Bedeutende Vertreter der IAPs stellen *Baculoviral IAP Repeat Containing 5* (BIRC5) (Ambrosini et al., 1997) sowie *Baculoviral IAP Repeat Containing 3* (BIRC3) (Roy et al., 1997) dar. Ein weiteres Protein, das maßgeblich an der extrinsischen Apoptose beteiligt ist, ist *Death-associated protein 6* (DAXX). Dieses nimmt in Bezug auf die Apoptose die Rolle eines Zwitters ein. Als solcher unterstützt es proapoptotische Stimuli über den c-JUN-N-terminale Kinase (JNK)-Weg (Yang et al., 1997), hat aber auch antiapoptotische Effekte (Chen & Chen, 2003). Obwohl der extrinsischen und intrinsischen Apoptose in dieser Arbeit unterschiedliche Textabschnitte gewidmet sind, greifen sie in der Realität ineinander. Die im Rahmen der extrinsischen Apoptose aktivierte Caspase 8 wandelt *BH3 interacting domain death agonist* (BID) in *truncated* BID (tBID) um (Li et al., 1998), das sowohl *Bcl-2 associated X protein* (BAX) aktiviert (Eskes et al., 2000) als auch *Bcl-2 homologous antagonist* (BAK) stimuliert (Wei et al., 2000). Beide sind für die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium notwendig. Ein Prozess, der zu den entscheidendsten Schritten der Apoptose zählt (Wei et al., 2001).

1.2.3 Die intrinsische Apoptose

Im Gegensatz zur extrinsischen Apoptose wird die intrinsische Form durch innere Reize angestoßen (Zaman et al., 2014). Da das Mitochondrium eine wichtige Rolle in der intrinsischen Apoptose spielt, wird diese gemeinhin auch als mitochondriale Apoptose bezeichnet (Pfeffer & Singh, 2018). Im Verlauf der intrinsischen Apoptose wird die äußere Mitochondrienmembran durchlöchert (Von Ahsen et al., 2000). Ein Vorgang, der als *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP) Einzug in die Lehrbücher gehalten hat und häufig als wichtigster Schritt der Apoptose angesehen wird (Pfeffer & Singh, 2018). Essenziell für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran sind die porenbildenden Proteine BAX und BAK (Wei et al., 2001), die die Freisetzung von Cytochrom c gewährleisten. Dieses bildet unter Beteiligung von *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) und *Desoxyadenosintriphosphat* (dATP) einen Zusammenschluss (Li et al., 1997), das als Apoptosom bezeichnet wird (Yuan et al., 2010). Über Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARDs) vermag das Apoptosom mit Pro-Caspase 9 in Interaktion zu treten (Zou et al., 1997) und diese zu aktivieren. Die entstehende einsatzbereite Initiatorcaspase stimuliert die Bildung von Effektorcaspasen, namentlich

Caspase 3 (Bratton et al., 2001). Neben Cytochrom c wird auch Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium freigesetzt, das die Mitglieder der IAP-Gruppe hemmt und auf diese Weise die intrinsische Apoptose ankurbelt (Du et al., 2000). Beide Substanzen mitochondrialen Ursprungs können durch B-*cell lymphoma 2* (BCL-2) oder *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-XL) gehemmt werden. Dies geschieht durch die Inhibition der Porenbildner BAX und BAK, wodurch die MOMP verhindert wird (Cheng et al., 2001). *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (MCL-1) tritt mit BAK in Kontakt und unterdrückt dessen Funktion (Willis et al., 2005). *B-cell lymphoma-extra short* (BCL-XS) ist eine *Splicing*-Variante von BCL-XL und wirkt proapoptotisch, indem es antiapoptotische Faktoren hemmt (Boise et al., 1993).

Die Abläufe der intrinsischen und extrinsischen Apoptose sind in Abbildung 1 dargestellt.

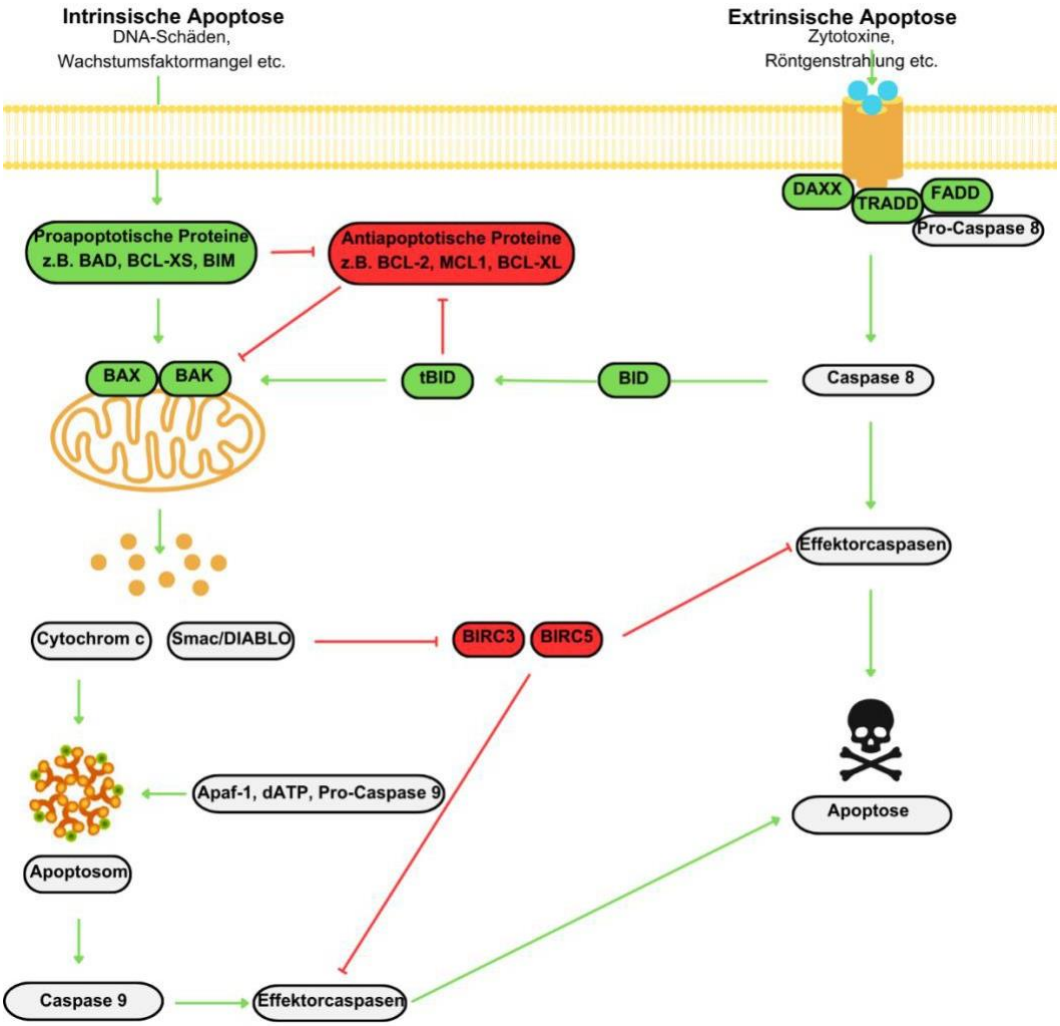


Abb. 1: Eigene Darstellung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose. Die proapoptotischen Faktoren werden grün hervorgehoben, die antiapoptotischen Faktoren rot. Weitere *tools* der Apoptose sind grau unterlegt.

1.2.4 Die BCL-2-Proteinfamilie

Die BCL-2-Familie stellt eine Proteingruppe dar, die maßgeblich an der Apoptose mitwirkt (Petros et al., 2004). Ihre Bezeichnung geht auf BCL-2 zurück, das als erster Vertreter der Gruppe in den 1980er Jahren identifiziert wurde (Tsujimoto et al., 1984). Heute sind mehr als 20 Mitglieder bekannt, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Komponenten umfassen und sich in drei Gruppen einteilen lassen (Petros et al., 2004). Aus didaktischen Gründen werden in der folgenden Übersicht lediglich die BCL-2-Familienmitglieder aufgeführt, die in dieser Arbeit untersucht wurden oder Erwähnung finden:

1. Antiapoptotische Proteine: BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W;
2. Proapoptotische Multidomänen-Proteine: BAX, BAK;
3. Proapoptotische BH3-*only* Proteine: BAD, BID, BCL-XS, BIM, PUMA, NOXA.

Sie weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf, die sich vorrangig in dem Vorhandensein mindestens einer BCL-2 homologen Domäne (BH-Domäne) widerspiegeln. Von diesen sind vier bekannt, die numerisch geordnet als BH1 bis BH4 bezeichnet werden. Das Gros der antiapoptotischen Proteine setzt sich aus vier BH-Domänen zusammen (Petros et al., 2004), wobei Ausnahmen vorkommen. Eine solche stellt z.B. MCL-1 dar, das sich morphologisch von dem Namensgeber der BCL-2-Familie unterscheidet (Kozopas et al., 1993). Die proapoptotischen Multidomänen-Proteine setzen sich aus den BH-Domänen 1 bis 3 zusammen, während die BH3-*only* Proteine nur mit BH3 aufwarten (Huang & Strasser, 2000). Die BCL-2-Familienmitglieder können miteinander in Interaktion treten. Interaktionen sind sowohl zwischen pro- und antiapoptotischen Vertretern möglich (Oltval et al., 1993) als auch innerhalb einer Gruppe, was sich anhand der proapoptotischen Multidomänen-Proteine zeigen lässt (Wei et al., 2001). Schon früh wurde die BH3-Domäne als Grundvoraussetzung für die Wechselwirkungen identifiziert (Chittenden et al., 1995), genauso wie eine von den BH-Domänen gebildete Bindungstasche (Petros et al., 2004). Infolge der Interaktionen kann es zu einer Inaktivierung von proapoptotischen durch antiapoptotische Faktoren kommen (Yin et al., 1994). Darüber hinaus können z.B. die BH3-*only* Proteine antiapoptotische Faktoren hemmen oder proapoptotische Familienmitglieder aktivieren. Die Wechselwirkungen zwischen den BCL-2-Familienmitgliedern sind von großer Relevanz und entscheidend für das Schicksal einer jeden Zelle. Die Devise lautet: „Leben oder Tod“ (Adams & Corey, 2001).

Die BCL-2-Familienmitglieder sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert: Die antiapoptotischen Vertreter liegen bevorzugt im Bereich von Zellorganellen vor, während die proapoptotischen Faktoren frei flottieren (Petros et al., 2004) und erst auf einen

proapoptotischen Stimulus hin an die Mitochondrien mobilisiert werden (Wolter et al., 1997).

1.2.5 BH3-*Mimetika*

BH3-Mimetika stellen Medikamente dar, die den BH3-*only* Proteinen nachempfunden sind. Sie treten mit den proapoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie in Konkurrenz um die hydrophobe Bindungstasche der antiapoptotischen Komponenten. Auf diese Weise reduzieren sie die Wahrscheinlichkeit für Proteininteraktionen, die zu einer Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren führen würden. Dadurch wird die Propapoptose gefördert (Merino et al., 2018). Manche BH3-Mimetika können selektiv einzelne Vertreter der BCL-2-Familie targetieren. Sie umfassen Inhibitoren von BCL-2 (Souers et al., 2013), MCL-1 (Tron et al., 2018) sowie BCL-XL (Wang et al., 2020). Darüber hinaus existieren pan-BCL-2-Inhibitoren (BCL-2is), wie z.B. ABT-737, das ein BH3-Mimetikum der ersten Stunde darstellt und BCL-2, BCL-XL sowie *Bcl-2-like protein 2* (BCL-W) in den Fokus nimmt (Oltersdorf et al., 2005). Infolge von umfassenden Verstoffwechselungsprozessen nach der oralen Einnahme (Tse et al., 2008), erscheint ABT-737 für den klinischen Gebrauch als wenig praktikabel.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Navitoclax und Venetoclax im UC untersucht. Navitoclax stellt eine Weiterentwicklung von ABT-737 dar und hemmt als solche ebenfalls BCL-2, BCL-XL sowie BCL-W (Tse et al., 2008). Über die Hemmung von BCL-XL führt Navitoclax einen Blutplättchenmangel herbei, was mit potenziellen Risiken für die PatientInnen einhergeht (Rudin et al., 2012). Bis dato hat Navitoclax noch keine Marktzulassung erhalten (Potluri et al., 2020). Im Rahmen weiterer Forschungsaktivitäten konnte aus Navitoclax Venetoclax synthetisiert werden, das einen selektiven BCL-2-Inhibitor (BCL-2i) darstellt. Da in diesem Fall die Hemmung von BCL-XL unterbleibt, resultiert eine Behandlung mit Venetoclax nicht in einem Blutplättchenmangel (Souers et al., 2013). Venetoclax ist seit 2016 für die Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zugelassen (Deeks, 2016).

Experimente in der CLL haben gezeigt, dass die Kombination aus dem BH3-Mimetikum ABT-737 und weiteren Medikamenten effektiv antitumorös wirkt (Mason et al., 2009). Dieses Wissen könnte als Grundlage für die Erforschung weiterer Wirkstoffkombinationen dienen.

1.2.6 Die Fehlregulation der Apoptose im UC

Den Mitgliedern der BCL-2-Familie kommen verschiedene Rollen in der Entwicklung des UC zu. So führt BCL-2, der Namensgeber der Gruppe, nicht nur zu einer Hemmung der Apoptose (Lipponen et al., 1996), sondern auch zur Resistenzausbildung (Cho et al., 2006). Die Rolle von BCL-2 im Speziellen wird im UC ambivalent bewertet. Während zum einen konstatiert wird, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Expression des Faktors und dem Tumorgrad gibt (Korkolopoulou et al., 2002), berichten andere Studien von einer vermehrten BCL-2-Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad (King et al., 1996; Li et al., 1998). Neben BCL-2 ist auch eine Überexpression von BCL-X im UC vorbeschrieben, die beide *Splice*-Varianten betrifft (Kirsh et al., 1998). Die Expression von BCL-XL kann mit einer verkürzten Überlebenszeit betroffener PatientInnen in Verbindung gebracht werden (Yoshimine et al., 2013). Die Expression von BAX hingegen wirkt sich förderlich auf die Lebenserwartung aus (Hussain et al., 2003).

Neben der BCL-2-Familie ist auch die IAP-Gruppe maßgeblich an der Entstehung des UC beteiligt. Die Expression von *X-Linked Inhibitor of Apoptosis* (XIAP) wurde mit einer erhöhten Überlebenstendenz von UC-Zelllinien (UCCs) in Verbindung gebracht (Bilim et al., 2003), ein hohes Livin-Level wurde in Zusammenhang mit der Progression von oberflächlichem Blasenkrebs gestellt (Gazzangiga et al., 2003). Das Vorhandensein von BIRC5 ist mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert (Swana et al., 1999). Nachgewiesen werden konnten im UC darüber hinaus auch deutlich erhöhte Werte der IAPs *cellular inhibitor of apoptosis protein 1* (CIAP1) sowie von BIRC3 (Yin et al., 2006).

1.3 Epigenetik

1.3.1 Epigenetische Mechanismen und ihre Einflussfaktoren

Der Begriff „Epigenetik“ fand erstmals 1942 Erwähnung (Waddington, 1942) und beschreibt „jeden Prozess, der die Genaktivität verändert, ohne die DNA-Sequenz zu verändern“ (Weinhold, 2006). Die epigenetischen Mechanismen sind vielfältig und schließen neben Methylierungs- und Acetylierungsprozessen (Allfrey et al., 1964) auch Bromodomänen mit ein, die als Kontaktstelle für Transkriptionsfaktoren fungieren oder die Chromatinstruktur auflockern und so die Transkription ermöglichen (Zaware & Zhou, 2020). Umwelteinflüsse können die Epigenetik des Menschen verändern und umfassen z.B. bestimmte Ernährungsgewohnheiten (Greco et al., 2019) oder prägende Lebenserfahrungen (Jiang et al., 2019). Interessanterweise können epigenetische Modifikationen von einer Generation zur anderen tradiert werden (Reik et al., 2001).

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten epigenetischen Modifikationen. Detailliertere Ausführungen sind den folgenden Textabschnitten zu entnehmen.

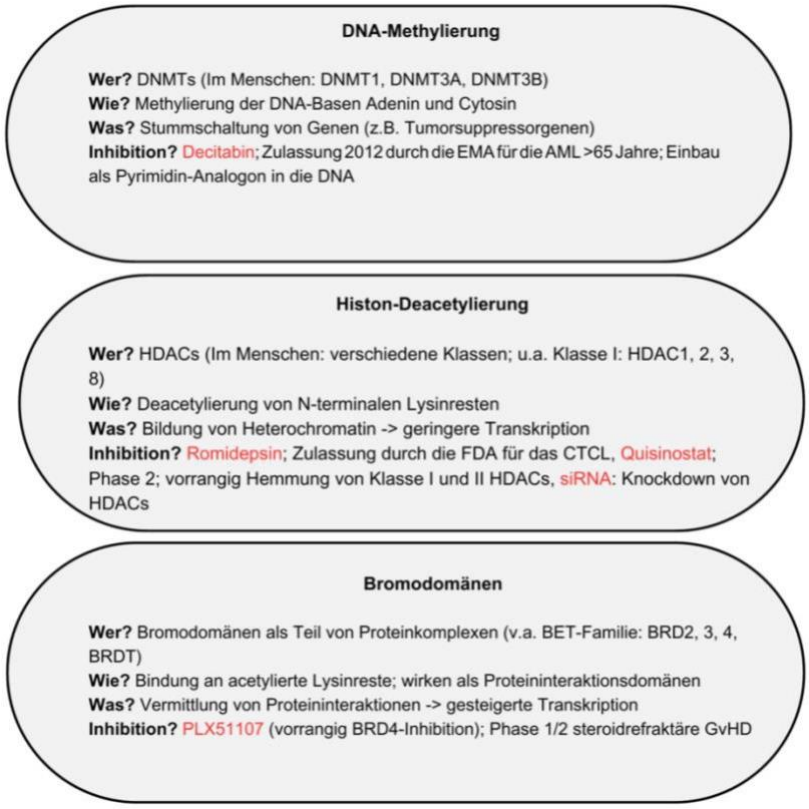


Abb. 2: Übersicht über die epigenetischen Modifikationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. In Rot werden die untersuchten Medikamente dargestellt. Im Kontext der Dissertation ist lediglich die DNA-Methylierung an Cytosin relevant. Der Vollständigkeit halber wird jedoch auch auf die Methylierung von Adenin eingegangen.

1.3.2 DNA-Methylierung

„Die DNA-Methylierung wird durch die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, die eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf den fünften Kohlenstoff eines Cytosinrestes übertragen“ (Moore et al., 2012). Die Methylierung von Cytosin erfolgt primär innerhalb von CpG-Inseln (Bird, 2022), die gehäuft in Genpromotorregionen nachweisbar sind (Saxonov et al., 2006). Infolgedessen kommt es zu einer Verdichtung des Chromatins, was in einer reduzierten Genexpression mündet (Costello et al., 1996). Im menschlichen Körper sind drei verschiedene DNMTs bekannt: DNMT1 (Bestor, 1992), DNMT3A sowie DNMT3B (Okano et al., 1999). Studien haben gezeigt, dass das Methylierungsmuster in Krebserkrankungen verändert ist (Feinberg & Vogelstein, 1983; Costello et al., 1996; Zhang & Long, 2015). Es sind sowohl Hypermethylierungs-Prozesse

nachweisbar (Costello et al., 1996) als auch Abläufe, die in einer Hypomethylierung münden (Feinberg & Vogelstein, 1983). Infolge des veränderten Methylierungsmusters kann es zur Stummschaltung von Tumorsuppressorgenen, wie dem Retinoblastom-Protein (Rb), kommen (Sakai et al., 1991).

1.3.2.1 DNMT-Inhibitoren

Die eben beschriebene Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen infolge von Methylierungsprozessen, kann durch die Verwendung von DNA-Methyltransferaseinhibitoren (DNMTis) wieder rückgängig gemacht werden (Brückner et al., 2005). Diese wirken auf DNMTs ein und unterbinden deren methylierende Wirkung (Mehdipour et al., 2021). DNMTis lassen sich in zwei Subgruppen einteilen, die Wirkstoffe wie Decitabin (Momparler, 2005) oder Curcumin (Hassan et al., 2019) umfassen. Decitabin repräsentiert die Gruppe der Nucleosid-Analoga, die von den Zellen fälschlicherweise als normale Nukleoside erkannt und in die DNA eingebaut werden. Erst dort entfalten Nucleosid-Analoga ihre inhibitorische Wirkung (Momparler, 2005). Der Wirkmechanismus von Nicht-Nucleosid-Inhibitoren ist unmittelbarer, denn sie binden direkt an die DNMTs (Hassan et al., 2019). Bis dato wurden die zwei Nucleosid-Analoge Decitabin sowie Azacitidin für die Behandlung des myelodysplastischen Syndroms (MDS) (Kim et al., 2022; Kaminskas et al., 2005) sowie für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Nieto et al., 2016; Jen et al., 2022) zugelassen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Decitabin auf die Apoptoseregulation im UC näher betrachtet werden. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei Decitabin um ein Nucleosid-Analogon, genauer gesagt, um ein Cytidin-Analogon, das erst nach erfolgter Aktivierung in die DNA eingebaut werden kann. Decitabin stellt ein „S-Phase-spezifisches Agens“ dar (Momparler, 2005). Der Effekt einer Decitabin-Behandlung wurde im UC bereits grob untersucht. Dort veränderte das Medikament das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen und verstärkte außerdem die Wirkung einer *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zell-gestützten Therapie (Grunewald et al., 2021) sowie von Chemotherapeutika (Khandelwal et al., 2018).

1.3.3 Die *Bromodomain and extraterminal domain* (BET)-Familie

Bei Bromodomänen (BRDs) handelt es sich um acetyl-lysinspezifische Erkennungsdomänen, die an Histonschwänze binden und die Adhäsion von Proteinen an das Chromatin ermöglichen (Dhalluin et al., 1999). Im menschlichen Körper konnten bislang über 60 verschiedene BRDs ausgemacht werden, die an der Bildung von über 40 Proteinen

beteiligt sind (Filippakopoulos et al., 2012). Diese Proteine weisen mannigfaltige Funktionen auf, sind z.B. in die Modifikation des Chromatins eingebunden (Yang et al., 1996), stellen Bestandteile von Coaktivatoren dar (Venturini et al., 1999) oder erleichtern die Transkription (Yang et al., 2005).

Die bekannten BRDs können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Filippakopoulos et al., 2012). Von Relevanz für die vorliegende Arbeit sind die Mitglieder der *Bromodomain and extraterminal domain* (BET)-Familie, die sich aus vier Komponenten zusammensetzt. Diese verfügen jeweils über zwei BRDs (Müller et al., 2011). Während BRD2, BRD3 und BRD4 breit gestreut vorkommen, lässt sich *Bromodomain testis-specific* (BRDT) ausschließlich im Hoden nachweisen (Shang et al., 2004).

Mutationen in den BET-Familienmitgliedern können die Entstehung von Krebserkrankungen fördern (Bradner et al., 2017) und darüber hinaus das Ansprechen auf pharmakologische Interventionen schmälern (Drumond-Bock et al., 2023). BRD4 stellt das am besten erforschte Familienmitglied dar und ist z.B. an der Entstehung der AML (Zuber et al., 2011) oder dem Plattenepitelkarzinom (Plattenepithel-CA) (French et al., 2001) beteiligt. Im UC liegt BRD4 überexprimiert vor und besitzt einen weitreichenden negativen Einfluss, u.a. fördert es den Krankheitsprogress und verschlechtert die Überlebenschancen (Yan et al., 2014).

1.3.3.1 BET-Inhibitoren

BET-Inhibitoren (BETis) sind Medikamente, die die Wirkung von BET-Proteinen hemmen, indem sie an deren BRDs binden und dadurch die Wirkung der BET-Proteine als Proteininteraktionsdomänen unterbinden (Filippakopoulos et al., 2010). Zu den BETis der ersten Stunde zählen die Pan-Inhibitoren I-BET762 (Zhao et al., 2013) sowie JQ1 (Filippakopoulos et al., 2010). Sie inhibieren alle bekannten Mitglieder der BET-Familie, jedoch mit unterschiedlicher Affinität (Zhao et al., 2013; Filippakopoulos et al., 2010) und stellen die Pendants zu den selektiven BETis dar, die allgemein weniger Nebenwirkungen verursachen (Filippakopoulos et al., 2010). Zu den selektiven BETis zählt PLX51107, dessen Wirkung im UC in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. PLX51107 unterscheidet sich strukturell von o.g. BETis, da es kein Benzodiazepingerüst besitzt (Ozer et al., 2018).

Die Resultate einer Phase-I-Studie, im Rahmen derer PLX51107 in Kombination mit Azacitidin zur Behandlung des MDS und der AML untersucht wurde, sind vor Kurzem veröffentlicht worden (Senapati et al., 2023). PLX51107 zeigt vielfältige Wirkungen: Es

moduliert das Immunumfeld von Tumoren (Erkes et al., 2019), wirkt sich auf den Zellzyklus aus und führt Apoptose herbei (Ozer et al., 2018). Die Wirkung von PLX51107 wurde bereits teilweise im UC untersucht. Hier beeinträchtigte das Medikament vor allem (v.a.) DNA-Reparaturmechanismen (Hoffmann et al., 2020) und wies in Kombination mit weiteren Medikamenten eine synergistische Wirkung auf (Thy et al., 2021).

1.3.4 Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACis)

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACis) sind Medikamente, die Histondeacetylasen (HDACs) hemmen (Zhang et al., 2018) und basierend auf ihrer Funktionsweise in Pan-HDACis (Meng et al., 2012) sowie selektive HDACis (Furumai et al., 2002) unterschieden werden. Ausgehend von der chemischen Struktur bietet sich die Einteilung in vier Gruppen an (Zhang et al., 2018):

1. Hydroxamsäuren;
2. Zyklische Tetrapeptide;
3. Kurzkettige Fettsäuren;
4. Benzamide.

Die Wirkung von HDACis beruht auf einem dreigliedrigen Molekülanteil, der sich aus einer Zink (Zn^{2+})-bindenden Gruppe, einer CAP-Domäne sowie einer Verbindungsstruktur (*Linker*) zusammensetzt (Zhang et al., 2018). Durch Letztere binden HDACis an das aktive Zentrum von Zn^{2+}-abhängigen HDACs und hemmen diese (Finnin et al., 1999). Zu den Zn^{2+}-abhängigen HDACs zählen die Klassen I, II und IV (Porter & Christianson, 2019). Über Veränderungen im Bereich der CAP-Region sowie des *Linkers* kann die Selektivität von HDACis modifiziert werden (Zhang et al., 2018).

Bislang wurden mehrere HDACis für den klinischen Gebrauch zugelassen. Die Zulassungen beziehen sich primär auf die Behandlung maligner Erkrankungen des lymphatischen Systems (Mann et al., 2007; Frye et al., 2012; Lee et al., 2015). Vorinostat markierte im Jahr 2006 den ersten zugelassenen HDAC-Inhibitor (HDACi) (Mann et al., 2007).

Das umfassende Wirkspektrum von HDACs zeigt sich an den tiefgreifenden Folgen ihrer pharmakologischen Hemmung. HDACis steigern nicht nur die Genexpression, sondern können diese auch drosseln (Hontecillas-Prieto et al., 2020), weiterhin hemmen sie die Angiogenese (Heider et al., 2006) und modifizieren DNA-Reparaturmechanismen (Munshi et al., 2005). Das medikamentöse *Targeting* von HDACs zeigte bereits in verschiedenen Krebsarten eine gute antitumoröse Wirkung (Ueda et al., 1994; Butler et al., 2000), die sich

in Kombination mit weiteren Medikamenten nochmals steigern ließ (Donadelli et al., 2007; He et al., 2018).

Abbildung 3 visualisiert das breite Wirkspektrum von HDACs in Krebserkrankungen.

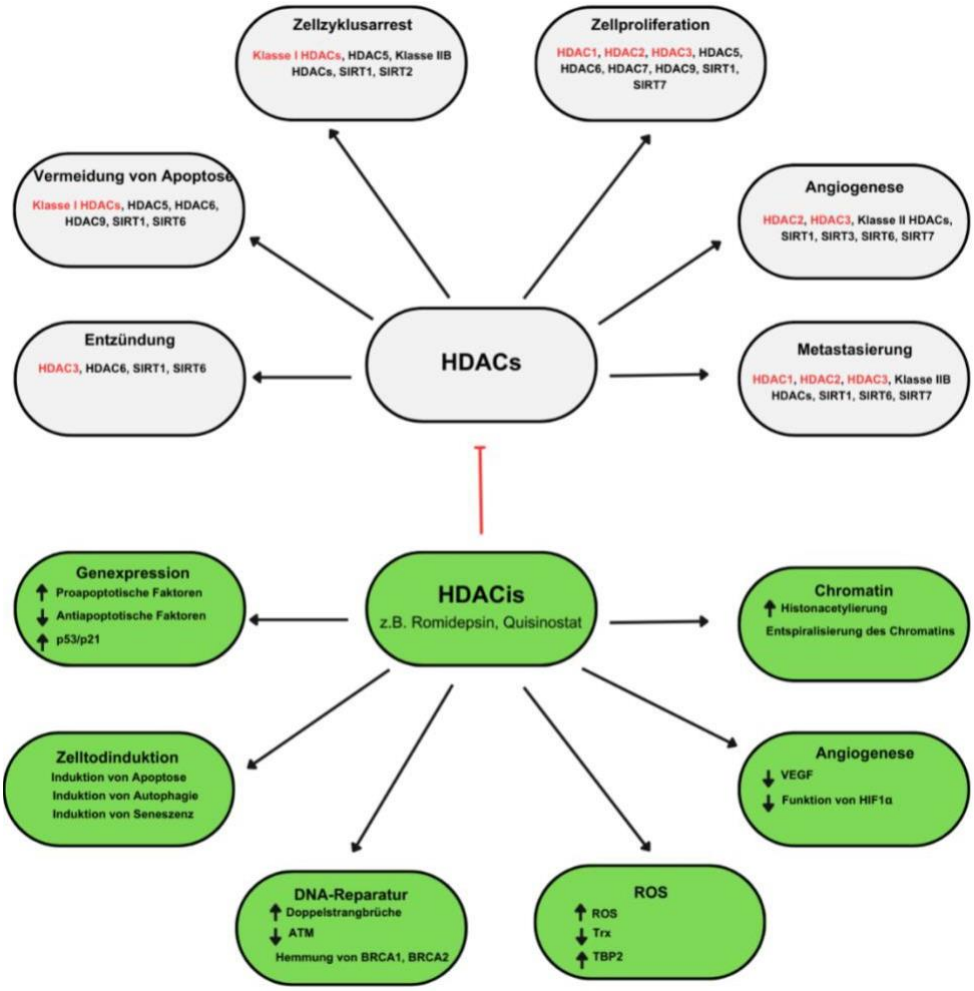


Abb. 3: Übersicht über die verschiedenen Prozesse, an denen HDACs in Krebserkrankungen beteiligt sind. Es handelt sich um eine eigene Abbildung, die durch die Darstellung von Hontecillas-Prieto et al., 2020 inspiriert wurde.

1.3.4.1 Die HDACis Romidepsin und Quisinostat

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der HDACis Romidepsin und Quisinostat im UC untersucht. Romidepsin stellt einen Klasse I HDACi dar, der eine besondere Affinität zu HDAC1 und 2 aufweist (Furumai et al., 2002) und natürlichen Ursprungs ist (Ueda et al., 1994). Es handelt sich um ein *Prodrug*, durch das Glutathion abhängig in seine aktive Form umgewandelt wird (Furumai et al., 2002) und in verschiedenen Krebsentitäten antitumorös wirksam ist (Ueda et al., 1994). Eine Behandlung mit Romidepsin beeinflusst die Funktion normaler Zellen nur marginal (Paillas et al., 2020). Romidepsin wurde 2009 für die

Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen (Frye et al., 2012) und darf darüber hinaus auch in der Therapie des peripheren T-Zell-Lymphoms (PTCL) verwendet werden (Piekarz et al., 2011). Die Effekte einer Romidepsinbehandlung in Krebserkrankungen sind vielfältig und beinhalten neben der Induktion der intrinsischen Apoptose (Doi et al., 2004) auch die Einleitung des Zellzyklusarrests (Li et al., 2020) sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Mizutani et al., 2010). Im Kontext des UC führt Romidepsin zur Apoptose und zum Zellzyklusstop sowie zur Induktion von p21 sowie p53 (Karam et al., 2007). Darüber hinaus beeinflusst Romidepsin den *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Weg und steigert die Bildung von ROS (Choudhary et al., 2010). In Kombination mit weiteren Medikamenten, z.B. Chemotherapeutika, lässt sich die Wirkung von Romidepsin im UC potenzieren (Pattarawat et al., 2020).

In Analogie zu Romidepsin handelt es sich auch bei Quisinostat um einen Inhibitor der Klasse I HDACs (Arts et al., 2009). Er lässt sich den Hydroxamsäuren zuordnen, wurde bisher noch nicht für den klinischen Gebrauch zugelassen, ist jedoch Bestandteil von Studien (Venugopal et al., 2013). Quisinostat zeigt eine zytotoxische Wirkung in verschiedenen Krebsarten (Arts et al., 2009). Ähnlich wie Romidepsin induziert es Apoptose und einen Zellzyklusarrest, so z.B. in Leberkrebs (Li et al., 2017). Weiterhin führt Quisinostat zu einer vermehrten Acetylierung von Histonproteinen (Torres et al., 2020) sowie zum Zelltod durch Autophagie (Kommalapati et al., 2021). Die Induktion von Seneszenz wurde nach einer Behandlung mit Quisinostat ebenso beobachtet (He et al., 2018). Im Rhabdomyosarkom erhöht Quisinostat die Sensitivität für Chemotherapeutika (Heinicke et al., 2015). Die Wirkung von Quisinostat im UC wurde bislang kaum erforscht. Eine der wenigen vorhandenen Studien stammt von Meneceur et al. (2024) und berichtet von dem Effekt Quisinostat-gestützter Kombinationstherapien im UC (Meneceur et al., 2024).

1.3.5 Epigenetische Modifikationen im UC

Im epigenetischen Kontext lassen sich verschiedene Modifikationen im UC identifizieren: Häufig kommt es zu einer Hypermethylierung mit daraus folgender Stummschaltung von Genen, darunter Tumorsuppressoren (Lee & Song, 2017). Auch Zelladhäsionsmoleküle können von dem *Silencing* betroffen sein (Horiwaka et al., 2003). Die große Bedeutung des Methylierungsstatus für das UC zeigt sich anhand der Studie von Beijert et al. (2024), im Rahmen derer auf die mögliche Verwendung von methylierten Proteinen als Biomarker im UC hingewiesen wird (Beijert et al., 2024). Einen solchen Marker könnte TAGMe darstellen (Yang et al., 2024).

Auffällig sind beim UC zudem regelmäßig Modifikaktionen der Histonmoleküle, z.B. durch Acetylierung (Ellinger et al., 2016). Acetylierungsprozesse spielen für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Krebserkrankungen im Allgemeinen eine zentrale Rolle (Yang et al., 2022). Die Deacetylierungsvorgänge werden durch HDACs vermittelt (de Ruijter et al., 2003), deren *Targeting* in der Krebstherapie als vielversprechend angesehen wird (Glozak & Seto, 2007). Um die Deacetylierung zu stoppen, wird im UC v.a. eine Inhibition von HDAC-Isoenzymen in Betracht gezogen. Eine gute Wirkung wird besonders der Hemmung von Klasse-I-Isoenzymen, wie etwa HDAC1 und 2 zugeschrieben (Pinkerneil et al., 2016). Die Regulierung von HDAC8 konnte in Studien demgegenüber die Lebensfähigkeit von UCCs nicht therapeutisch nützlich beeinflussen (Lehmann et al., 2014). Ambivalent bewertet wird besonders die Hemmung des Klasse-II-Isoenzyms HDAC6 (Rosik et al., 2014; Kuroki et al., 2020).

Die Beeinflussung der BETs wird ebenfalls mit der Therapie des UC in Verbindung gebracht. In Studien wurde besonders ein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Nachweis von BRD4 und der Entwicklung des UC hergestellt (Yan et al., 2014). BRD4 konnte auch schon mit anderen Krebsentitäten, wie z. B. Leukämien, in Verbindung gebracht werden (Zuber et al., 2011). Im kastrationsresistenten Prostatakarzinom zeigte der BETi JQ1 eine vielversprechende antitumoröse Wirkung, die u.a. auf die JQ1 induzierte Apoptose zurückzuführen war (Asangani et al., 2014). Als vielversprechend erweist sich in Studien besonders die synergistische Induktion der Apoptose in UCCs durch die Kombination von BETis und HDACis (Hölscher et al., 2018).

1.4 Einflussnahme auf die DNA-Reparatur

1.4.1 Die Funktionsweise von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs)

Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) stellen Enzyme dar, die auf zahlreiche intrazelluläre Prozesse Einfluss nehmen und auch an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Herceg & Wang, 2001). Gegenwärtig sind 18 PARPs bekannt (Chaudhuri & Nussenzweig, 2017). Die Grundstruktur der PARPs gleicht sich und besteht u.a. aus einem Zn^{2+}-Anteil, der die Interaktion der Enzyme mit beschädigten DNA-Abschnitten ermöglicht (Ménissier- de Murcia et al., 1989). Darüber hinaus weisen PARPs eine Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+)-bindende Domäne auf, die die Wechselwirkung mit NAD^+ erlaubt, das als Substrat für eine induzierte Poly-ADP-Ribosylierung fungiert (D´Amours et al., 1999). PARPs sind vorranging an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt, indem sie z.B. die in die Basenexzisionsreparatur (BER) involvierten Enzyme an die Schadensstelle rekrutieren

(Kutuzov et al., 2020) oder unterstützend auf die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) einwirken (Flohr et al., 2003). Bevor die Reparatur von DNA-Schäden final erfolgen kann, müssen die PARPs von der Läsionsstelle wegdiffundieren (Satoh & Lindahl, 1992).

1.4.2 PARP-Inhibitoren

Es besteht die Möglichkeit, die Aktivität von PARPs pharmakologisch zu hemmen. Die verwendeten Wirkstoffe werden als PARP-Inhibitoren (PARPis) bezeichnet (Rouleau et al., 2010) und umfassen Medikamente wie Niraparib (Jones et al., 2009), Olaparib (Menear et al., 2008), Talazoparib (Shen et al., 2013) oder Rucaparib (Calabrese et al., 2004). Diese finden in verschiedenen Krebsentitäten therapeutische Verwendung (González-Martín et al., 2019; de Bono et al., 2020; Bhattacharjee et al., 2022). Die inhibitorische Wirkung wird durch die Bindung der PARPis an PARPs erzielt. Grundlage hierfür ist die strukturelle Ähnlichkeit der Inhibitoren zu NAD^+ und dem daraus resultierenden Wettbewerb um die NAD^+-Bindungsstelle (Canan Koch et al., 2002). Ist die NAD^+ -Bindungsstelle besetzt, wird der Prozess der Poly-ADP-Ribosylierung unterbunden und die PARPs bleiben langfristig an der DNA gebunden. Dieser Vorgang wird als PARP-*Trapping* bezeichnet (Murai et al., 2012) und ermöglicht es den an der DNA-Reparatur beteiligten Enzymen nicht, an die geschädigte DNA zu binden und deren Reparatur einzuleiten (Rose et al., 2020). Es ist gemeinhin bekannt, dass die Akkumulation von geschädigter DNA zum Zelluntergang führt (Wang, 2001).

1.5 Zielsetzung

Das UC stellt eine weit verbreitete Krebserkrankung dar und wird aufgrund seiner demographischen Verteilung an Häufigkeit zunehmen. Daraus resultiert neben einer großen ökonomischen Belastung die Notwendigkeit, wirksame Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Die bisherigen Therapieoptionen, allen voran der Einsatz von Cisplatin, zeigen keine ausreichende Wirkung und gehen häufig mit Resistenzen einher.

Studien im UC und darüber hinaus haben gezeigt, dass die Fehlregulation der Apoptose sowie epigenetische Veränderungen die Entstehung von Krebserkrankungen und Therapieresistenzen fördern. Beide Aspekte stellen folglich vielversprechende Angriffspunkte in der Krebstherapie dar und ihr *Targeting* könnte auch im UC sinnvoll sein. Die Fehlregulation der Apoptose ist im UC jedoch bislang nicht ausreichend verstanden und die vorhandenen Studien setzen sich zumeist nur mit einem einzelnen Aspekt der Apoptose oder der Epigenetik auseinander.

Das Ziel dieser Arbeit ist, ein besseres Verständnis über die Apoptoseregulation in UCCs sowie in ihren korrespondierenden Cisplatin resistenten Sublinien, den sog. *long-term treated cells* (LTTs), zu gewinnen und darauf aufbauend neue, wirksamere Therapiemöglichkeiten für das UC zu etablieren. Diese sollen bei Möglichkeit den Einsatz von epigenetischen Inhibitoren (EPIis) umfassen. Die EPIis sollen *in vitro* auf ihre Zelltod induzierende Wirkung sowie ihre molekularen Effekte untersucht werden. Weiterhin sollen ihre Auswirkungen auf die Expression von Apoptosefaktoren der BCL-2-Familie und der IAP-Gruppe spezifiziert werden.

Um die genannten Ziele zu erreichen, wurde zunächst eine systematische Analyse von elf verschiedenen Apoptosefaktoren auf molekularer Ebene durchgeführt. Die Analysen erfolgten mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) in verschiedenen UCCs, LTTs sowie in Kontrollzelllinien vor und nach einer Behandlung mit EPIis. Es kamen verschiedene EPIis zum Einsatz, darunter HDACis, DNMTis sowie BETis. Zudem wurde die Wirkung eines siRNA vermittelten HDAC-*Knockdowns* untersucht. Die Expression der Apoptosefaktoren auf Proteinebene wurde mittels *Western Blot* untersucht. Mit Hilfe eines Apoptose *Arrays* sollten weitere apoptotische Komponenten identifiziert werden, deren Expression durch die Verwendung von HDACis verändert wird. Anschließend sollten die Zelltodformen in UCCs durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die Erprobung neuer Wirkstoffkombinationen, die sich aus BCL-2is und EPIis zusammensetzten, erfolgte mittels MTT-Tests.

2 Material

2.1 Zellkulturmaterialien

Die verwendeten kommerziellen UCCs stammten aus dem MD Anderson *Cancer Center* in Houston, Texas sowie der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. TERT-NHUC wurden von Maggie Knowles, *School of Medicine*, *University of Leeds* zur Verfügung gestellt. Die humane urotheliale Zelllinie (ZL) HBLAK wurde von dem Schweizer Unternehmen CELLnTEC bezogen. Die LTTs wurden eigenständig im urologischen Forschungslabor gezüchtet. Diese umfassten T24 LTT, J82 LTT, RT112 LTT und 253J LTT. Bei den normalen ZL UP248 und UP249 handelte es sich um primäre ZL aus dem Harnleiterepithel anonymer SpenderInnen. Diesen wurden im Rahmen der Behandlung ihres Nierentumors in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf Niere und Harnleiter entfernt. Zuvor wurden die SpenderInnen über das geplante Procedere aufgeklärt und ihr Einverständnis eingeholt (Studien-Nr. 1788 und 4371). Die Ribonukleinsäure (RNA) von UP248 sowie UP249 war bereits von den MitarbeiterInnen der urologischen Forschungsgruppe extrahiert worden und wurde in dieser Arbeit als Normalkontrolle mittels qRT-PCR vermessen. Die Überprüfung der Proben auf Verunreinigungen und ihre Identität erfolgte durch das Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels *short tandem repeats* (STR) *Profiling*.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Die ZL können in normale Harnblasen-ZL sowie in UCCs eingeteilt werden. Für die normalen Harnblasen-ZL werden, falls bekannt, Geschlecht und Alter der PatientInnen sowie Ursprung und Besonderheit der ZL angegeben. Für die UCCs werden das Tumorstadium nach TNM-Klassifikation, das *Grading* und das Geschlecht (M: männlich, W: weiblich) sowie das Alter der PatientInnen aufgeführt. Außerdem wird die Literaturreferenz angegeben.

Zelllinien	**Geschlecht, Alter (Jahre)**	**Ursprung, Besonderheit**	**Literaturreferenz**
Normale Zelllinien			
UP248	/	/	/
UP249	/	/	/
TERT-NHUC	/	Urothel	Chapman et al., 2006
HBLAK	M, 80	Urothel, spontan immortalisiert	Hoffmann et al., 2016
Zelllinien	**Geschlecht, Alter (Jahre)**	**TNM/*Grading***	**Literaturreferenz**
UCCs			
UM-UC-3	M	TCC	Grossmann et al., 1986

VM-CUB-1	M	TCC	Williams et al., 1980
BFTC905	F, 51	Ta, G3	Tzeng et al., 1996
RT112	F	G2	Masters et al., 1986
SW-1710	F, 84	G3	Kyriazis et al., 1984
UM-UC-6	M	TCC	Grossmann et al., 1986
RT-4	M, 63	G1-2	Rigby et al., 1970
647v	M, 59	T1/T2/T3a, G2	Williams et al., 1980
253J	M, 53	T4, G4	Elliott et al., 1974
HT-1376	F, 58	T2, G3	Rasheed et al., 1977
5637	M, 68	G2	Fogh, 1978
T24	F, 81	G3	Bubenik et al., 1973
639v	M, 69	G3	Elliott et al., 1976
J82	M	T3, G3	O´Toole et al., 1978
SCaBER	M	/	O´Toole et al., 1976

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmaterialien.

Material	**Hersteller**
Accutase®-Lösung steril filtriert	Sigma
Automatisierter Zellzähler TC20™	Bio-Rad
Cellstar®-Röhrchen, 15, 50 Milliliter (ml)	Greiner Bio-One
Cellstar®-Zellkulturflasche, 50, 250 ml	Greiner Bio-One
Cellstar®-Zellkulturflasche fortgeschrittene Gewebekulturen, 50, 250 ml	Greiner Bio-One
Cellstar®-Zellkultur *Multiwellplatte*, 6 *Well*	Greiner Bio-One
Cellstar®-Zellkultur Mikroplatte, 96 *Well*	Greiner Bio-One
Cellstar®-Zellkultur Mikroplatte fortgeschrittene Gewebekulturen, 96 *Well*	Greiner Bio-One
CnT-*Prime* Epithelzellkulturmedium	CELLnTEC
Costar® Stripetten® steril 2, 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One
Heracell™ 150i Kohlenstoffdioxid (CO_2)-Inkubator	Thermo Fisher
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,5 % (GC)	Sigma
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) + GlutaMAX™	Gibco
Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), modifiziert	Sigma
Eppendorf *Tubes*® 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom/Merck
Humanes Kollagen Typ IV	Sigma
Mehrfachdispenser-Pipetten (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
Nikon *Eclipse* TE2000-S Mikroskop	Nikon
Multipipette®	Eppendorf

Pasteurpipetten aus Kalknatronglas	Brand
Pipetus®	Hirschmann
Trypanblau-Lösung 0,4 %, steril filtriert	Sigma
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,25 %)	Sigma
Zählkammer	Bio-Rad
Zentrifuge 5810	Eppendorf

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien.

Zelllinie	Kulturmedium	Hersteller
HBLAK	CnT-Prime Epithelzellkulturmediur	CELLnTEC
UM-UC-3, VM-CUE -1	DMEM (1x) + GlutaMAX + 10 % hitzeinaktiviertes FBS	Gibco, Biochrom/MERCK

2.2 Funktionelle Tests

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Pharmaka.

Pharmakon	Lösungsmittel	Hersteller
Decitabin	DMSO	Sigma-Aldrich
Olaparib	DMSO	Selleck Chemicals
PLX51107	DMSO	Selleck Chemicals
Romidepsin	DMSO	Selleck Chemicals
Quisinostat	DMSO	Selleck Chemicals
ON-TARGET plus control pool	siRNA-Puffer	Dharmacon
ON-TARGET plus SMART pool human HDAC1	siRNA-Puffer	Dharmacon
ON-TARGET plus SMART pool human HDAC2	siRNA-Puffer	Dharmacon
ON-TARGET plus SMART pool human HDAC3	siRNA-Puffer	Dharmacon
Venetoclax	DMSO	Selleck Chemicals
Navitoclax	DMSO	MedChemExpress

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Materialien für die siRNA-Transfektion.

Material	Hersteller
Lipofectamin™ 2000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher
Opti-MEM™ Medium + GlutaMax™	Gibco
Plastikröhrchen	Sarstedt

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Materialien für den MTT-Test.

Material	Hersteller
DMSO	Sigma
Mehrfachdispenser-Pipetten (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
Multipipette®	Eppendorf
Heracell™ 150i CO_2-Inkubator	Thermo Fisher
Thiazolylblau-tetrazoliumbromid (TBTB) 98 %	Sigma

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Materialien für die FACS-Messungen.

Material	Hersteller
Accutase®-Lösung steril filtriert	Sigma
Annexin V Bindepuffer (20x)	Miltenyi Biotec
Annexin V Fluorescein Isothiocyanat (FITC) Konjugat	Miltenyi Biotec
Polystyrol-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One
MACSQuant *Analyzer* 10 *Flow Cytometer*	Miltenyi Biotec
Pasteurpipetten aus Kalknatronglas	Brand
PBS	Sigma
Pipetus®	Hirschmann
Propidiumiodid ≥ 94 %	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %)	Sigma
Vortexmischer VF2	Janke und Kunkel
Zentrifuge 5810	Eppendorf

Der Annexin V Bindepuffer wurde als 20x *Stock* von Miltenyi Biotec veräussert (Milteny 130-092-820). Vor Gebrauch wurde er zwanzigfach mit Millipore-Wasser verdünnt.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Immunfluoreszenzfärbung.

Material	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech
4´,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche
Deckgläser 18 x 24 Millimeter (mm)	VWR
Fluorescence Mounting Medium	Dako
Formaldehydlösung, etwa 37 %	Merck
Glycin	VWR
Goat-Serum (normal)	Dako
Gyro *Rocker* SSL3	Stuart
Leica DFC9000GT Mikroskopkamera	Leica

Leica DM6 B Mikroskop	Leica
Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht
PBS	Sigma
Triton™ X-100	Fluka

Tabelle 9: Übersicht über den verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

Antikörper	Hersteller	Konzentration	Kat.-Nr.
Primärantikörper			
Phospho-*Histone* H2A.X (Ser139)	Cell Signaling	1:100	2577
Sekundärantikörper			
Goat anti Rabbit 488	Thermo Fisher	1:500	A11034

2.3 RNA-Analyse

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Materialien für die RNA-Isolation. Nähere Bezeichnung der einzelnen *Kit*-Bestandteile.

Material	Hersteller
Nano*Drop*™ 2000	Thermo Fisher
RNase-*Free* Desoxyribonuklease (DNase) Set 1. DNase 2. Wasser (H_2O) 3. RDD-Puffer	Qiagen
RNeasy Mini Kit (250) 1. RLT Lysepuffer 2. RNase freies Wasser 3. *RNeasy Mini Spin Column* 4. RPE Waschpufferkonzentrat 5. RW1 Waschpuffer 6. Sammelbehältnisse 1,5, 2 ml	Qiagen
QIA*shredder*	Qiagen

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung der qRT-PCR.

Material	Hersteller
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi
Eppendorfgefäße 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf
Eppendorf *Reference* 2 Pipette 10, 100, 1000 Mikroliter (µl)	Eppendorf
FrameStar® 384 *Well Skirted PCR Plates Plus* qPCR	4titude UK
LightCycler® 480 *Sealing Foil*	Roche
LightCycler® 96 Instrument	Roche

Luna® Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs
LightCycler® *Multiwellplatte* 96, weiß	Roche
QuantiTect *SYBR Green PCR Master Mix* 1,7 ml	Qiagen
Vortexmischer VF2	Janke und Kunkel
Zentrifuge 5810	Eppendorf

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten *Primer* für die qRT-PCR. Gezeigt wird die *Primer*-Sequenz, die *Annealing*-Temperatur (AT) in °C, die Puffersubstanz sowie die ZL, die im Rahmen der qRT-PCR als Positivkontrolle fungierte.

Gen	**Sequenz 5´-3´**	**AT (°C)**	**Positivkontrolle, Puffer**
TATA-Bindeprotein (TBP)	F: GAGCCAAGAGTGAAGAACAGTC R: GCTCCCCACCATATTCTGAATCT	60	Variiert, Luna
BAX	F: GGGGACGAACTGGACAGTAA R: CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	60	UM-UC-3, Luna
BCL-XS	F: GCAGTAAAGCAAGCGCTGAG R:GTTCCACAAAAGTATCCTGTTCAAAG	56	T24, SYBR *Green* I
BID	F: TGTGAACCAGGAGTGAGTCG R: CTTTGGAGGAAGCCAAACAC	60	VM-CUB-1, Luna
DAXX	F: GAGGGTCAGGAGGATGATGA R: ATCTGTTTGCCAGGTTCCAG	60	UM-UC-3, Luna
FADD	F: GACCTCTTCTCCATGCTGCT R: AGCCAGCCTTCTCCAATCTT	60	BFTC905, Luna
TRADD	F: CCTCTCTGTCGGAGGTGAAG R: CCATTTGAGACCCACAGAGC	60	VM-CUB-1, Luna
BCL-2	F: CCTGTGGATGACTGAGTACCTG R: CAGAGGCCGCATGCTGGG	59	T24, SYBR *Green* I
BCL-XL	F: TAAACTGGGGTCGCATTGTG R: AGGTAAGTGGCCATCCAAGC	56	T24, SYBR *Green* I
BIRC3	F: GACAGCCCAGGAGATGAAAA R: CACGGCAGCATTAATCACAG	60	UM-UC-3, SYBR *Green* I
BIRC5	F: AGGACCACCGCATCTCTACAT R: AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	55	UM-UC-3, SYBR *Green* I
MCL-1	F: GAGACCTTACGACGGGTTGG R: GTTACGCCGTCGCTGAAAAC	60	T24, SYBR *Green* I

2.4 Protein-Analyse

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Proteinextraktion.

Material	Hersteller
Cell scraper	Sarstedt
PBS	Sigma
Kühlzentrifuge Allegra 2IR	Beckman Coulter
Phosphatase-Inhibitor	Sigma
Protease-Inhibitor	Sigma
Rüttelplatte	IKA Labortechnik
Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer	Siehe Tabelle 14

Tabelle 14: Übersicht über die Inhaltsstoffe des RIPA-Puffers.

Inhaltsstoff	Hersteller
EDTA	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	VWR
Triton™ X-100	Sigma

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung eines BCA-Tests.

Material	Hersteller
iMark™ *Microplate reader*	Bio-Rad
Pierce Bicinchoninsäure (BCA) *Protein Assay Reagent* A/B	Thermo Fisher
RIPA-Puffer	Siehe Tabelle 8
Zellkulturplatten (96-*Well*)	Greiner Bio-One

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Materialien für Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-*PAGE* und *Western Blot.*

Material	Hersteller
BSA *Fraction* V	PAN-Biotech
Clarity Max Western ECL Substrate	Bio-Rad
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad
Immobilon®-P *Transfer Membranes*	Merck
Methanol ≥ 99,8 %	VWR
Milchpulver	Roth

Mini-PROTEAN Tetra *Cell*	Bio-Rad
PowerPac 200 Netzteil	Bio-Rad
Page Ruler Prestained Protein Ladder #26616	Thermo Scientific
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Whatman Gel Blot Paper	GE Healthcare
ROTI® *Load* 1	Roth

Tabelle 17: Übersicht über die verwendeten Chemikalien für Puffer und Polyacrylamid (PAA)-Gele.

Material	**Hersteller**
10x Tris/Glycin Puffer	Bio-Rad
10x Tris/Glycin/SDS Puffer	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Glycin	Merck
Methanol ≥ 99,8 %	VWR
NaCl	VWR
SDS	Roth
PAA	Roth
Salzsäure (HCl) 25 %	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris	MERCK
TWEEN® 20	Sigma

Tabelle 18: Pufferzusammensetzung für SDS-*PAGE* und *Western Blot*. Der Pufferansatz erfolgt mit H_2O, das mittels Q-Gard® 2 der Firma Millipore generiert wurde.

Puffer	**Zusammensetzung**
SDS-*PAGE* Laufpuffer	10 % Tris/Glycin/SDS Puffer
Stripping	1,5 % Glycin
	0,1 % SDS
	1 % TWEEN 20
	Mit HCl auf einen pH von 2,2 einstellen
Tris-*buffered saline* (TBS)-Puffer (10x)	1,5 M NaCl
	0,1 M Tris
	Mit HCl auf einen pH von 7,6 einstellen
Tris-*buffered saline with* TWEEN20 (TBS-T)-Puffer (1x)	10 % TBS-Puffer (10x)
	0,1 % TWEEN 20
Western Blotting Puffer	10 % Tris/Glycin Puffer
	20 % Methanol

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper für den *Western Blot*.

Antikörper	Hersteller	Blocking-Puffer	Konzentration	Kat.-Nr.
Acetyliertes Tubulin	Sigma	5 % Milch	1: 20.000	T7451
Anti-*cleaved* PARP	Cell Signaling	5 % Milch	1: 1.000	9541S
Anti-*total* PARP	Cell Signaling	5 % Milch	1: 2.000	9532S
Anti-BCL-XL	Cell Signaling	5 % Milch	1: 1.000	2764
Anti-BCL-2	Cell Signaling	5 % BSA	1: 1.000	15071S
Anti-BID	Cell Signaling	5 % Milch	1: 500	9313S

Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper für den *Western Blot*.

Antikörper	Hersteller	Blocking-Puffer	Konzentration	Kat.-Nr.
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako	1 % Milch	1: 2.000	P04480
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako	1 % Milch	1: 1.000	P02600

Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten Materialien für das *Stripping*.

Material	Hersteller
Glycin ≥ 99,5 %	VWR
Gyro-*rocker* SSL3	Stuart
Microprocessor pH Meter pH537	WTW
HCl 25 %	Merck
NaCl	VWR
Tris	VWR
SDS *ultra pure* ≥ 99,5 %	Roth
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich

Für die Herstellung von TBS-T, das für das *Stripping* verwendet wurde, wurden 1,33 mmol/l Tris und 4,88 mmol/l NaCl in 1 l Wasser verwendet. Mithilfe von HCl wurde der pH-Wert auf einen Wert von 7,6 eingestellt.

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung des *Proteome Profiler Arrays*.

Material	Hersteller
Gyro *Rocker* SSL3	Stuart
Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems

Milli-Q™ Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore
PBS	Sigma
Plastikfolie	Aldi
SuperSignal™ *West Femto Maximum Sensitivity Substrate*	Thermo Scientific
Zentrifuge 5810	Eppendorf

Für die Durchführung des *Proteome™ Profiler Arrays* wurde primär das *Human Apoptosis Array Kit* (Nr. ARY009) von R&D Systems verwendet. Außerdem wurde im Rahmen des *Arrays* ein BCA-Test durchgeführt.

2.5 *Software*

Tabelle 23: Übersicht über die verwendete *Software*.

Software	**Vertreiber**
CFX Maestro *Software for CFX Real-Time PCR Instruments*	Bio-Rad
CompuSyn	ComboSyn
GraphPad Prism 9.3.1.471	GraphPad Software
Image Lab™ *Touch Software*	Bio-Rad
LAS X *Life Science Microscope Software*	Leica
LightCycler® 96 *Software*	Roche
MACSQuantify™ Version 2.13.2	Miltenyi Biotec
Microsoft Excel 2016	Microsoft
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft
Microsoft Word 2016	Microsoft
Microplate Manager® *Software* 6	Bio-Rad
NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Fisher

3 Methoden

3.1 Anzucht der UCCs und der Kontrollzelllinie HBLAK

3.1.1 Anzucht der UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3

Die Anzucht der UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 erfolgte bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius (°C) und einem CO_2-Gehalt von 5 % im Inkubator. Als Nährmedium wurde DMEM mit GlutaMAX (L-Glutamin) Zusatz verwendet, das mit 10 % FBS angereichert wurde. Das FBS wurde vor Gebrauch bei einer Temperatur von 56 °C für eine halbe Stunde hitzeinaktiviert.

Die UCCs wurden in Kulturflaschen mit einem Volumen von 25 ml und 75 ml angezüchtet. Der Zelltransfer erfolgte in einem Abstand von drei bis vier Tagen. Vor dem Zelltransfer wurden die Zellen mikroskopisch auf Wachstumsstörungen und Verunreinigungen untersucht. Danach wurde das alte Nährmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Mithilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen im Anschluss von Oberflächen der Kulturflaschen gelöst. Für die kleineren Kulturflaschen wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung verwendet, für die größeren Kulturflaschen 2 ml. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten bei 37 °C wurde die Trypsin-EDTA-Lösung mit 5 ml Nährmedium gestoppt. In neuen Kulturflaschen wurden 6 ml bis 12 ml neues Nährmedium vorbereitet und die Zellen in einem Verhältnis von 1:15 (VM-CUB-1) und 1:20 (UM-UC-3) aufgeteilt.

3.1.2 Anzucht der Kontrollzelllinie HBLAK

Entsprechend den UCCs, erfolgte die Anzucht der Kontroll-ZL HBLAK ebenfalls bei einer Temperatur von 37 °C sowie einem CO_2-Gehalt von 5 % im Inkubator. Für die Anzucht wurden Kulturflaschen mit einem Volumen von 25 ml und 75 ml verwendet, die eine *Advanced* TC Beschichtung besaßen. Als Nährmedium wurde CnT-PRIME epitheliales Proliferationsmedium verwendet. Der Zelltransfer erfolgte alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:5.

In einem ersten Schritt wurde das alte Nährmedium entfernt und in einem Greiner-Röhrchen aufbewahrt. Danach wurden die ZL HBLAK mit 5 ml PBS gereinigt und mithilfe einer Accutase-Lösung von den Oberflächen der Kulturflaschen gelöst. Für die kleineren Kulturflaschen wurde 1 ml Accutase-Lösung verwendet, für die größeren Kulturflaschen 2 ml. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 37 °C wurde die Accutase-Lösung mit 5 ml altem Nährmedium gestoppt. Im Anschluss wurde die Suspension aus Zellen, Accutase-

Lösung und altem Nährmedium für fünf Minuten bei einer Geschwindigkeit von 1.000 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und dem Zellsediment 6 ml bis 12 ml frisches Nährmedium hinzugefügt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene funktionelle Tests durchgeführt, für die zuerst die Bestimmung der Zellzahl und eine Aussaat der Zellen in *Wells* notwendig war. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl Trypanblau in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit 10 µl Zellen vermischt. Nach ausgiebigem Auf- und Abpipettieren wurden 10 µl des Gemischs in eine Zählkammer überführt, die in einen automatischen Zellzähler eingelesen wurde. Die Angabe der Zellzahl erfolgte pro ml Medium.

3.1.4 Aussaat in *Wells*

Die Aussaat der UCCs und der Kontroll-ZL HBLAK erfolgte in 6-*Well*- und in 96-*Well*-Platten. Für den Apoptose *Array* wurden die Zellen außerdem in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 Zentimeter (cm) ausgesät. Pro Kulturschale wurden 600.000 Zellen ausgesät. Mithilfe eines automatischen Zellzählers wurde das Zellsuspensionvolumen bestimmt, das benötigt wurde, um die in Tabelle 24 und 25 gezeigten Zellzahlen zu erhalten. Die Aussaat von HBLAK erfolgte in *Wells* mit *Advanced* TC Beschichtung. Aufgrund der unterschiedlich schnellen Wachstumsgeschwindigkeiten variierte die Menge der ausgesäten Zellen zelllinienabhängig.

Tabelle 24: Menge ausgesäter Zellen pro *Well* in 6-*Well*-Platten.

Zelllinie	Zellzahl/*Well*	Aussaatvolumen (µl)
VM-CUB-1	200.000	2.000
UM-UC-3	150.000	2.000
HBLAK	250.000	2.000

Tabelle 25: Menge ausgesäter Zellen pro *Well* in 96-*Well*-Platten.

Zelllinie	Zellzahl/*Well*	Aussaatvolumen (µl)
VM-CUB-1	2.000	50
UM-UC-3	1.500	50
HBLAK	2.500	50

3.2 Funktionelle Tests

3.2.1 MTT-Test

Mithilfe des MTT-Tests konnten Aussagen über die Stoffwechselaktivität von UCCs getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere MTT-Tests durchgeführt, um die zelltodinduzierende Wirkung verschiedener Substanzen und Substanzkombinationen zu testen:

1. Navitoclax;
2. Venetoclax;
3. Romidepsin und Venetoclax;
4. Quisinostat und Venetoclax.

Für die Durchführung der MTT-Tests wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK in Quadruplikaten in 96-*Well*-Platten ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit den Vielfachen der IC50-Werte der o.g. Substanzen behandelt. Die IC50-Werte werden in Tabelle 26 gezeigt. Die Vielfachen der IC50-Werte sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 26: Übersicht über die IC50-Werte der im MTT-Test verwendeten Substanzen. Die Angaben erfolgen in Nanomol (nM) oder Mikromol (µM).

Substanz	IC50-Wert
Romidepsin	2 nM
Quisinostat	12,5 nM (UM-UC-3, HBLAK)
	10 nM (VM-CUB-1)
Venetoclax	5 µM

Tabelle 27: Auflistung der verwendeten Wirkstoffkonzentrationen von Romidepsin, Quisinostat und Venetoclax im Rahmen des MTT-Tests.

xIC50	Romidepsin (nM)	Quisinostat (µM)	Venetoclax (µM)
0,1	0,2	1	0,5
0,25	0,5	2,5	1,25
0,5	1	5	2,5
0,75	1,5	7,5	3,75
1	2	10	5
1,5	3	15	7,5

Als Lösungskontrolle wurde DMSO verwendet. Für die Blankomessung wurden 50 µl Medium pro *Well* verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der MTT-Test durchgeführt. Dazu wurden 10 µl MTT pro *Well* hinzugegeben und für eine Stunde

(VM-CUB1, UM-UC-3) bzw. vier Stunden (HBLAK) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden das MTT sowie das alte Nährmedium abgegossen und 50 µl DMSO pro *Well* aufgetragen. Dadurch wurde die Umwandlung von MTT in einen violett-braunen Stoff sichtbar. Die Platten konnten nun kolorimetrisch bei 570 Nanometern (nm) und 620 nm eingelesen werden. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der vier gemessenen Extinktionen gebildet und auf die Lösungskontrolle normiert.

3.2.1.1 Chou-Talalay-Analysen

Die Chou-Talalay-Analyse diente der Ermittlung synergistischer, additiver oder antagonistischer Effekte verschiedener Medikamentenkombinationen im UC. Namentlich wurde die Kombination der HDACis Romidepsin oder Quisinostat mit dem BCL-2i Venetoclax untersucht. Bevor die Durchführung einer Chou-Talalay-Analyse möglich war, wurden die IC50-Werte genannter Medikamente in den UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie in der Kontroll-ZL HBLAK mithilfe eines MTT-Tests bestimmt. Gleiches wurde für die Medikamentenkombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in die CompuSyn-*Software* eingelesen, die auf Basis der empfangenen Signale aus den einzelnen *Wells* der 96-*Well*-Platte, die ebenfalls die unbehandelte Kontrolle (DMSO) beinhalteten, die *fraction affected* sowie im weiteren Verlauf den Kombinationsindex (CI) berechnete.

3.2.1.2 Bestimmung des IC50-Werts von Navitoclax

Die Bestimmung des IC50-Werts von Navitoclax erfolgte mithilfe eines MTT-Tests. Da Navitoclax in Pulverform und nicht in flüssiger Form geliefert worden war, musste Navitoclax vor Durchführung des MTT-Tests in DMSO gelöst werden. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Ausgangskonzentration von Navitoclax betrug 50 mM. Da für die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie für die Kontroll-ZL HBLAK noch keine IC50-Werte für Navitoclax bekannt waren, wurden nach einer Literaturrecherche sechs verschiedene Dosierungen festgelegt, die erprobt werden sollten. Anfänglich wurden alle genannten ZL mit denselben Dosierungen behandelt. Im Verlauf erfolgte eine Dosisanpassung. Die verschiedenen Dosierungen sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Verschiedene Dosierungen zur IC50-Bestimmung von Navitoclax. Unterschieden werden anfängliche Dosierungen und solche nach Dosisanpassung.

Dosierungen (µM) anfänglich:	0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25
Dosierungen (µM) später:	
VM-CUB-1	0,5, 1, 1,5, 2, 4, 5
UM-UC-3	0,5, 1, 1,5, 2, 4, 5

HBLAK	0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,03

3.2.2 Zelltodanalyse mittels FACS-Messung

Für die Zelltodanalyse wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK in 6-*Well*-Platten ausgesät und anschließend mit den IC50-Werten der Klasse I HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit HDAC-siRNA behandelt. Durch die Verwendung von HDAC-siRNA wurde ein *Knockdown* von HDAC1, 2 und 3 erzielt sowie ein kombinierter *Knockdown* von HDAC1 und 2. DMSO und die siRNA-Kontrolle (ctrl.) wurden als Lösungskontrollen verwendet. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Übersicht über die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen für die Zelltodanalysen.

Wirkstoff	Konzentration
DMSO	10 nM (VM-CUB-1)
	12,5 nM (UM-UC-3, HBLAK)
Romidepsin	2 nM
Quisinostat	10 nM (VM-CUB-1)
	12,5 nM (UM-UC-3, HBLAK)
siRNA HDAC 1, 2, 3	Je 1 µl (*Stock*-Konzentration: 20 µM)

Die Zelltodanalyse mittels FACS-Messung erstreckte sich über insgesamt 72 Stunden. Die Behandlung mit o.g. Substanzen erfolgte am zweiten Tag, die Zellernte am fünften Tag. Im Rahmen der Zellernte wurde zunächst der Zellüberstand entfernt und in ein Reagenzglas überführt. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (VM-CUB-1, UM-UC-3) oder Accutase-Lösung (HBLAK) aus den *Wells* gelöst und ebenfalls in das Reagenzglas übertragen. Danach wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei einer Geschwindigkeit von 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss abgesaugt und je Reagenzglas 500 µl PBS hinzugefügt. Danach folgte eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde der FACS-*Mastermix* hinzugegeben. Dessen Zusammensetzung zeigt Tabelle 30. Je Reagenzglas wurden 80 µl *Mastermix* hinzugegeben.

Tabelle 30: Zusammensetzung des FACS-*Mastermix*. Mengenangabe je Ansatz.

Substanz	Menge (µl)
Annexin V Bindepuffer	70
Annexin V FITC-Konjugat	2,5
Propidiumiodid-*Stock*	7,5

Im Anschluss wurden die Proben gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und Verdunkelung inkubiert. Vor der Messung mit dem FACS-Gerät wurden 500 µl Annexin V Bindepuffer hinzugegeben und die Proben nochmals gevortext. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer speziellen *Software*, nach in Abbildung 4 dargestelltem Schema.

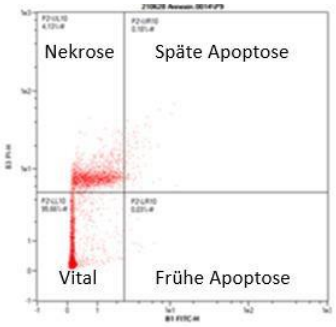


Abb. 4: Beispielhafte Auswertung einer FACS-Messung.

3.2.3 HDAC-*Knockdown* durch siRNA-Transfektion

Wie oben beschrieben, erfolgte die Durchführung einer Zelltodanalyse u.a. nach einer Behandlung mit siRNA. Für die Durchführung der siRNA-Transfektion wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK in 6-*Well*-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Nährmediumwechsel. Pro *Well* wurden 1,5 ml Nährmedium verwendet. Danach wurden zwei verschiedene Ansätze, bezeichnet als Ansatz 1 und 2, vorbereitet. Deren Zusammensetzung ist Tabelle 31 zu entnehmen.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Ansätze 1 und 2 sowie deren Mengenangaben. Die Mengenangaben entsprechen einem Ansatz.

Ansatz 1	**Ansatz 2**
Opti-MEM reduziertes Serum Medium (249 µl)	Opti-MEM reduziertes Serum Medium (245 µl)
siRNA-*Stock* (*Stock*-Konzentration: 20 µM; verwendete Menge: 1 µl)	Lipofectamin 3000 Reagenz (5 µl)

Nach der Herstellung der beiden Ansätze wurden diese vermengt. Dabei war es wichtig, dass Ansatz 1 zu Ansatz 2 hinzugegeben wurde und nicht umgekehrt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT wurden 500 µl des Ansatzgemisches in jeden *Well* hinzugegeben. Die Zugabe erfolgte tröpfchenweise. Verwendet wurde HDAC 1, 2 und 3 siRNA. Zudem erfolgte eine Kombination von HDAC1 und 2 siRNA. siRNA ctrl. wurde als Lösungskontrolle verwendet. Am fünften Tag erfolgte die Zelltodanalyse mittels FACS-Messung.

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung nach siRNA-Transfektion

Die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK wurden auf Deckgläschen in 6-*Well*-Platten ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator angezüchtet. Danach erfolgte die Behandlung mit HDAC 1, 2 und 3 siRNA sowie einer Kombination von HDAC1 und 2 siRNA. Als Lösungskontrolle wurde siRNA ctrl. verwendet. Nach 72 Stunden wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS pro *Well* gewaschen. Die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen erfolgte mit 1 ml 3 %igem Formaldehyd (FA) je Deckgläschen für zehn Minuten bei RT. Im Anschluss wurde das FA abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 1 ml 0,3 % Triton X- 100 in PBS-T permeabilisiert und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die zweimalige Reinigung der Zellen für je zehn Minuten in PBS-T und das Blocken mit 1 ml *Blocking*-Reagenz, das aus 10 % Ziegenserum, 0,1 % Triton X-100 und 0,3 M Glycin in PBS bestand. Das Blocken erfolgte für 60 Minuten bei RT. Danach wurde der Primärantikörper Phospho-*Histone* H2A.X aufgetragen, der zuvor im Verhältnis von 1:100 in Antikörperpuffer verdünnt worden war. Der Antikörperpuffer setzte sich aus 1 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS zusammen. Der Primärantikörper inkubierte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen viermal für je zehn Minuten in PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper *Goat anti Rabbit* 488 aufgetragen. Dieser war zuvor in Antikörper-Puffer 1:500 verdünnt worden. Er inkubierte für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Danach wurden die Zellen dreimal für je zehn Minuten mit PBS-T gewaschen. Die zytochemische Färbung erfolgte mit 1 ml DAPI je Well für zwei Minuten bei RT. Danach wurden die Zellen zweimal für zehn Minuten in PBS-T gewaschen und eingedeckelt. Dazu wurde ein Tropfen *Mounting Medium* verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte im Anschluss bei 4 °C.

Die zytochemischen Färbungen wurden mit dem Mikroskop Leica DM6 B dargestellt und mit der Kamera Leica DFC9000GT aufgenommen. Mit der Leica-*Software* LAS X konnten die Bilder zugeschnitten werden.

3.3 Ribonukleinsäure (RNA)-Analyse

3.3.1 Isolation der RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mehrschrittig mithilfe zweier Isolations-*Kits*. Für die Isolation der RNA wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK in Kulturflaschen mit einem Volumen von 25 ml oder in 6-*Well*-Platten angezüchtet. Um die Zellen aufzubrechen, wurde erst das alte Nährmedium entfernt, die

Zellen mit 2 ml PBS pro *Well* gewaschen und im Anschluss ein Lysemix hinzugegeben. Der Lysemix setzte sich aus 350 µl (6-*Well*-Platte) bzw. 600 µl (Kulturflasche) RLT-Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol pro Ansatz zusammen. Durch gründliches Auf- und Abpipettieren erfolgte eine gute Durchmischung der Zellen mit dem Lysemix. Im Anschluss wurde das Zelllysat in ein Zergliederungssystem (QIA*shredder*) übertragen. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das Zellsediment verworfen. Danach wurden 350 µl bzw. 600 µl 70%iges Ethanol zu jeder *Shredder*-Säule hinzugegeben. Das Gemisch wurde in RNeasy Mini *spin columns* übertragen und für 30 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde wieder verworfen. Die DNase I Verdauung erfolgte optional und wurde nur nach der Behandlung mit EPIis durchgeführt. Für die DNase I Verdauung wurden die Proben mit 350 µl RW1-Waschpuffer gereinigt und danach ein DNase I-Puffer-Mix hinzugegeben. Dieser setzte sich aus 10 µl Enzym und 70 µl Puffer je Ansatz zusammen. Eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT ermöglichte die Spaltung der DNA-Molekülketten. Im Anschluss erfolgte eine erneute Reinigung mit 350 µl RW1-Waschpuffer und 500 µl RPE-Puffer. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Sekunden bei 11.000 rpm und anschließend für zwei Minuten bei 13.000 rpm. Die *Shredder*-Säulen wurden auf Eppendorf-Gefäße von 1,5 ml übertragen und zweimal 30 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Dazwischen wurden die Proben für eine Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert. Nach erfolgter RNA-Extraktion wurden die Proben bei -80 °C gekühlt.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Mikrovolumen-Spektralphotometer sowie NanoDrop *Software*. Zu Beginn wurde mithilfe von 1 µl RNase-freiem destilliertem Wasser eine Blankomessung durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung gut durchmischt und anschließend 1 µl Probenmaterial aufgetragen. Die RNA-Konzentration wurde in Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl) angegeben.

3.3.3 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription

Durch reverse Transkription wurde RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In 0,5 ml großen PCR-*Tubes* wurden 1 µg RNA und Ampuwa-Wasser zusammengegeben. Das Volumen pro PCR-*Tube* sollte insgesamt 12,5 µl betragen. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten *Mastermixes*. Dessen Zusammensetzung ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Komponenten des ersten *Mastermixes* für die reverse Transkription. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Ansatz.

Substanz	Menge (µl)
dNTP Mix	1 (Katalog: R0192, Thermo Scientific)
Oligo(dT)18 *Primer*	0,25 (Katalog: S0132, Thermo Scientific)
Random Hexamer Primer	0,75 (Katalog: S0142, Thermo Scientific)

Nach Zugabe des *Mastermixes* wurden die Proben für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Sekunden herunterzentrifugiert und auf Eis gelagert. Ein zweiter *Mastermix* wurde hinzugegeben. Dessen Zusammensetzung zeigt Tabelle 33.

Tabelle 33: Komponenten des zweiten *Mastermixes* für die reverse Transkription. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Ansatz.

Substanz	Menge (µl)
Maxima H Minus Reverse Transkriptase	1 (Katalog: EP0752, Thermo Scientific)
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 (Katalog: EO0381, Thermo Scientific)
RT-Puffer	4

Eine mehrschrittige Inkubation der Proben bei 25 °C (10 Minuten), 50 °C (30 Minuten) sowie 85 °C (5 Minuten) gewährleistete die optimale Wirkung der *Mastermix*komponenten. Die cDNA wurde im Anschluss in einem Verhältnis von 1:20 in RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Durchführung der quantitativen *Real-time* PCR (qRT-PCR)

Mithilfe der qRT-PCR erfolgte die Vervielfältigung und die Mengenbestimmung von Gensequenzen des UC. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei- und dreischrittige PCRs durchgeführt. Bei der Durchführung der zweischrittigen PCRs wurde *Luna Universal qPCR Mastermix* als Reaktionsgemisch verwendet. Für die dreischrittigen PCRs wurde der *SYBR Green Mastermix* verwendet. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten. Die Standard-ZL wurde in Form einer Verdünnungsreihe aufgebracht. Dafür wurden eine 1:20, 1:100 und 1:500 Verdünnung gewählt. Die Verdünnung erfolgte mithilfe von Ampuwa-Wasser. Mit einer Multipipette wurden 10 µl Mastermix pro *Well* appliziert. Danach wurden je *Well* 8 µl *Primermix* hinzugegeben. Dessen Zusammensetzung zeigt Tabelle 34.

Tabelle 34: Zusammensetzung des *Primermixes* für die qRT-PCR. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Abdeckung eines Reservoirs mit *Primermix*.

Substanz	Menge (µl)
Ampuwa-Wasser	7,9
Forward-Primer	0,05
Reversed-Primer	0,05

Die Ausgangskonzentration der verwendeten *Primer* betrug 100 µM. Am Ende wurden je *Well* 2 µl cDNA hinzugegeben. Das Pipettieren erfolgte stets auf Eis. Im Anschluss wurde die PCR-Platte für zwei Minuten bei von 2.500 rpm zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines *LightCyclers*. Dazu wurde der Mittelwert aus den Triplikaten gebildet und dieser auf das *housekeeping* Gen TBP normiert.

3.4 Protein-Analyse

3.4.1 Durchführung der Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK in Kulturflaschen mit einem Volumen von 25 ml angezüchtet. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit den jeweiligen IC50-Werten der Klasse I HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit 1 µl HDAC 1, 2 und 3 siRNA. Für die Proteinernte wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS pro Kulturflasche gewaschen. Im Anschluss wurden 153 µl eines Lysemixes hinzugegeben. Dessen Zusammensetzung ist in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: Zusammensetzung des Lysemixes für die Proteinextraktion. Mengenangabe pro Ansatz.

Substanz	Menge (v/v)
1x RIPA-Puffer	Siehe Tabelle 8
Phosphataseinhibitor	1 %
Proteaseinhibitor	1 %

Mithilfe eines *Cell Scrapers* wurde der Lysemix gleichmäßig in der Flasche verteilt und die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Währenddessen erfolgte die Lagerung der Zellen auf Eis. Die Lysemix-Zellsuspension wurde im Anschluss in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 Minuten auf Eis geschwenkt. Danach wurden die Proben für fünf Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Tests

Für die Durchführung des BCA-Tests wurden sieben Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Diese werden in Tabelle 36 gezeigt.

Tabelle 36: Übersicht über die Standardlösungen und deren jeweiliger Konzentration für den BCA-Test.

Standard	Konzentration (µg/ml)
1	2.000
2	1.000
3	500
4	250
5	125
6	63
7	32

Die Proben wurden 1:5 mit RIPA-Puffer verdünnt und auf eine 96-*Well*-Platte aufgetragen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Pro *Well* wurden 10 µl Probenmaterial verwendet. Dann wurden 200 µl BCA-Mix hinzugegeben. Dieser bestand aus 196 µl von Reagenz A und 4 µl von Reagenz B pro *Well*. In die *Wells*, die für die Blankomessungen vorgesehen waren, wurden lediglich 10 µl RIPA-Puffer und 200 µl BCA-Mix gegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte die Messung. Dazu wurde das Absorptionsverhalten der Proben durch das ELISA-Gerät FLUOstar OPTIMA bei 595 nm gemessen. Die Angabe der Proteinmenge erfolgte in µg/ml.

3.4.3 SDS-*Page*

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden je Probe 20 µg Protein aufbereitet. Mithilfe von RIPA-Puffer wurde das Probenvolumen einheitlich auf 18 µl aufgefüllt. Diesen wurden 6 µl ROTI Load 1 Probenpuffer hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von fünf Minuten bei 95 °C.

Als Trennmedium wurden SDS-Polyacrylamid-Gele unterschiedlicher Konzentrationen verwendet. Für den Nachweis von BCL-2 und BID in unbehandelten UCCs wurde eine Gelkonzentration von 12 % gewählt. Der Proteinnachweis in behandelten UCCs erfolgte mittels eines 10 %igen Gels. Die Zusammensetzung der Trenngele und des verwendeten Sammelgels ist in Tabelle 37 aufgeführt.

Tabelle 37: Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels. Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von zwei Gelen.

	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
H_2O	4 ml	3,3 ml	3,4 ml
PAA 30 %	3,3 ml	4 ml	0,83 ml
Tris			
1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
1 M pH 6,8	-	-	0,63 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
Temed	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml

Die Gele wurden in ein System eingespannt, das mit Eis umschlossen wurde und die Kammern des Systems mit SDS-*Page*-Laufpuffer gefüllt. Der Gelkamm wurde entfernt und die Geltaschen mit einer Spritze ausgewaschen. Je Probe wurden 20 µg Protein aufgetragen. Als Größenmarker fungierten 7 µl *Page Ruler Prestained Protein Ladder*. Zunächst wurde eine Spannung von 100 Volt für 15 Minuten angelegt. Danach erfolgte die Auftrennung bei 200 Volt für etwa eine Stunde.

3.4.4 *Western Blot*

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Diese war zuvor in 100 % Methanol (eine Minute), destilliertem Wasser (zwei Minuten) und *Blotting* Puffer (fünf Minuten) vorbereitet worden. Das *Whatman*-Filterpapier wurde für fünf Minuten in *Blotting* Puffer eingeweicht. Pro Gel wurden vier *Whatman*-Papiere benötigt. Der *Blot* wurde in einer Schale mit *Blotting* Puffer zusammengebaut und in den *Semidry Blotter* eingelegt. Die Proteinübertragung erfolgte bei 25 Volt und dauerte 20 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran viermal für je zehn Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Das anschließende Blocken erfolgte mit 5 % Milch (unbehandelte UCCs) bzw. 5 % BSA (behandelte UCCs BCL-2) für eine Stunde bei RT. Die Primärantikörper inkubierten über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Membranen für viermal zehn Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde im Anschluss aufgetragen und inkubierte bei RT für eine Stunde.

Die Proteindetektion erfolgte mithilfe des ECL *Western Blotting Detection Kits*. 500 µl von Lösung A und 500 µl von Lösung B wurden in einem Eppendorfgefäß vermengt und anschließend auf die Membran aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Membran mit einer durchsichtigen Folie bedeckt und in das *ChemiDoc MP*

Imaging System gelegt. Dieses machte Bilder der Markierung und des Chemilumineszenz-Signals, die sich im Rahmen eines *Mergings* vereinen ließen.

3.4.5 *Stripping*

Um mehrere Proteine auf einer Membran nachweisen zu können und Unsauberkeiten im Hintergrund zu verringern, wurden die Membranen durch mildes *Stripping* von Primär- und Sekundärantikörpern sowie Proteinfragmenten befreit. Dafür wurden die Membranen zweimal mit mildem *Strippingpuffer* (Tabelle 38) für zehn Minuten bei RT inkubiert.

Tabelle 38: Zusammensetzung von 100 ml mildem *Strippingpuffer*.

	100 ml	Konzentration
Glycin	1,5 g	1,5 %
SDS	0,1 g	0,1 %
Tween 20	1 ml	1 %

Der *Strippingpuffer* wurde auf einen sauren pH-Wert von 2,2 mithilfe von HCl eingestellt. Die Inkubation erfolgte in Plastikcontainern mit 20 ml *Strippingpuffer* auf einem Schüttler. Danach wurden die Membranen zweimal in PBST gewaschen und für eine Stunde mit 5 % Milch geblockt. Danach konnte ein neuer Primärantikörper appliziert werden.

3.4.6 *Proteome Profiler Array*

3.4.6.1 Probenvorbereitung

Mithilfe des *Proteome Profiler™ Arrays* konnte die relative Expression von 35 verschiedenen Apoptosefaktoren auf Proteinebene bestimmt werden. Zur Durchführung wurde ein *Human Apoptosis Array Kit* verwendet. Vor der Expressionsanalyse wurde die UCC UM-UC-3 in Kulturschalen mit 10 ml Nährmedium ausgesät. In jede Kulturschale wurden 600.000 Zellen ausgesät. Einen Tag später erfolgte die Behandlung von UM-UC-3 wie in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Übersicht über die verwendeten Substanzen für den Proteome Profiler Array und deren jeweilige Konzentration.

Substanz	Konzentration
DMSO	12,5 nM
Romidepsin	2 nM
Quisinostat	12,5 nM
Etoposid	0,75 µM

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und je Ansatz 1 x 7^{10} Zellen/ml in ein Greiner-Röhrchen überführt. Pro Röhrchen wurden 250 µl *Lysis Buffer* 17 hinzugegeben. Dieser wurde vor Gebrauch frisch zubereitet und mit 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin und 10 µg/ml Pepstatin versehen. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren in dem Lysepuffer resuspendiert. Danach wurde das Lysat bei 6 °C für 30 Minuten vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 14.000 g für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Die Proben wurden bei – 70 °C eingefroren.

3.4.6.2 Durchführung des *Arrays*

In eine 4-*Well*-Platte wurden je *Well* 2 ml *Array Buffer* 1 hinzugegeben. In jedem *Well* wurde eine *Array*-Membran platziert. Die Membranen wurden für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Währenddessen wurden die Proben vorbereitet. Zuvor war deren Proteingehalt mittels BCA-Tests bestimmt worden. Je Probe wurden 400 µg Protein verwendet. Dem wurden 1,25 ml *Array Buffer* 1 hinzugegeben. Insgesamt war ein Volumen von 1,5 ml je Probe gewünscht. Der Rest wurde mit *Lysis Buffer* 17 aufgefüllt. Die Probenvorbereitung erfolgte auf Eis. Nach einer Stunde wurde der *Array Buffer* 1 aus den Wells der 4-*Well*-Platte entfernt und 250 µL Probenlysat je *Array*-Membran aufgetragen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler.

Am nächsten Tag wurden die *Array*-Membranen dreimal für je zehn Minuten in 20 ml 1X *Wash Buffer* gewaschen. Dazu wurden 40 ml 25X *Wash Buffer Concentrate* in 960 ml Millipore-Wasser verdünnt. Danach wurden 1,5 ml *Detection Antibody Cocktail* pro Membran aufgetragen. Dieser war zuvor verdünnt worden, indem 15 µl *Detection Antibody Konzentrat* in 1,5 ml 1X *Array Buffer* 2/3 je Ansatz gelöst wurden. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei RT. Danach wurden die Membranen abermals dreimal in 20 ml 1X *Wash Buffer* für je zehn Minuten gewaschen. Währenddessen wurde Streptavidin-HRP in einem Verhältnis von 1:2.000 in 1X *Array Buffer* 2/3 gelöst. 2 ml der Lösung wurden jeder Membran hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler. Danach wurden die Membranen nochmal gewaschen.

3.4.6.3 Proteindetektion

Die *Array*-Membranen wurden auf eine Plastikfolie überführt. Für die Proteindetektion der mit Romidepsin behandelten Proben wurden 500 µl *Chemi Reagent* 1 und 500 µl *Chemi Reagent* 2 vermischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Für Quisinostat und

Etoposid wurde 1 ml *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* aufgetragen, nachdem das Signal nach anfänglicher Verwendung des *Chemi Reagent Mixes* nicht stark genug war. Die Plastikfolie wurde geschlossen und vorsichtig ausgestrichen, um den überschüssigen *Chemi Reagent Mix* zu entfernen. Danach wurde der obere Teil der Plastikfolie entfernt und die *Array*-Membranen mit Frischhaltefolie umwickelt. Es folgte die Einlegung der Membranen in das *ChemiDoc MP Imaging System* und eine Auswertung nach zehn Minuten.

Die Auswertung der Pixeldichte erfolgte mit Hilfe der *Image Lab Software*. In diese wurden die mit dem *ChemiDoc MP Imaging System* angefertigten Bilder eingelesen und im Anschluss die Option *Volume Tools* gewählt. Die Punkte auf den Bildern wurden nun einzeln umkreist und mit den jeweiligen Probennamen versehen. Danach wertete die *Image Lab Software* die Pixeldichte der einzelnen Punkte aus und überführte diese in eine Excel-Tabelle. Mithilfe der Excel-Tabelle konnte der Mittelwert für jedes Probenpaar gebildet werden sowie für die drei Referenzpunkte, die im Anschluss ins Verhältnis zueinander gesetzt wurden. Ebenso wurden die Standardabweichungen berechnet. Die Werte wurden in eine Grafik überführt, wobei die x-Achse die verschiedenen Apoptosefaktoren zeigte und die y-Achse die Pixeldichte in Relation zu den Referenzen.

3.5 Statistik

Für den statistischen Vergleich der Genexpression von Apoptosereguatoren in behandelten UCCs gegenüber ihren Kontrollen (DMSO oder siRNA ctrl.), wurde ein *unpaired two-samples* t-Test verwendet. Dieser wurde mittels *GraphPad Prism Software* durchgeführt. Die ermittelten p-Werte galten $< 0{,}05$ als signifikant, solche $< 0{,}01$ als hochsignifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Die Apoptose ist im UC fehlreguliert

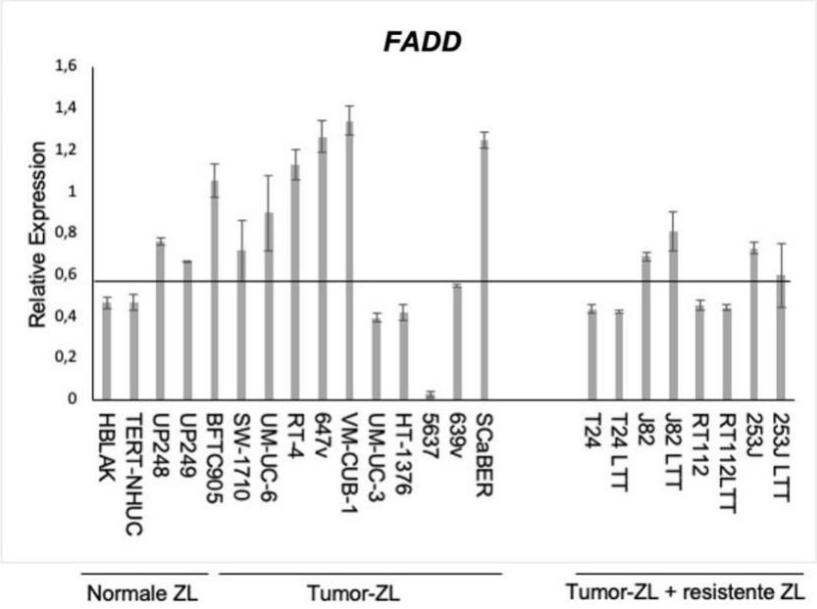
4.1.1 Pro- und antiapoptotische Faktoren sind in UCCs auf *messenger* RNA (mRNA)-Ebene fehlreguliert

Die Fehlregulation der Apoptose ist ein Charakteristikum von Krebszellen, das ihnen einen Überlebens- und Wachstumsvorteil verschafft und darüber hinaus die Entstehung von Therapieresistenzen begünstigt. Aus diesen Gründen wird die Apoptose als vielversprechender Angriffspunkt in der Krebstherapie gehandelt. Im UC wurde sie jedoch erst oberflächlich untersucht, wobei ein tieferes Verständnis der Apoptosemechanismen hilfreich für die Entwicklung wirksamer Therapien sein könnte.

Um das bekannte Wissen zu erweitern, wurde die Genexpression von elf verschiedenen pro- und antiapoptotischen Faktoren der BCL-2-Familie und der IAPs in diversen UCCs, LTTs sowie in vier normalen Kontroll-ZL untersucht. Die Analysen erfolgten mit Hilfe der qRT-PCR. Die Auswahl der UCCs sollte die Heterogenität des UC widerspiegeln und entspricht den im Labor üblicherweise verwendeten UCCs.

Die Abbildungen 5 bis 7 stellen die relative Expression proapoptotischer Faktoren auf mRNA-Ebene in erwähnten ZL dar. Um ein besseres Verständnis der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte eine thematische Einteilung der proapoptotischen Faktoren basierend auf ihrer Funktion im Kontext der Apoptose.

Abbildung 5 zeigt die Expression von *FADD* und *TRADD*, bei denen es sich um Adapterproteine handelt, die an der extrinsischen Apoptose mitwirken.



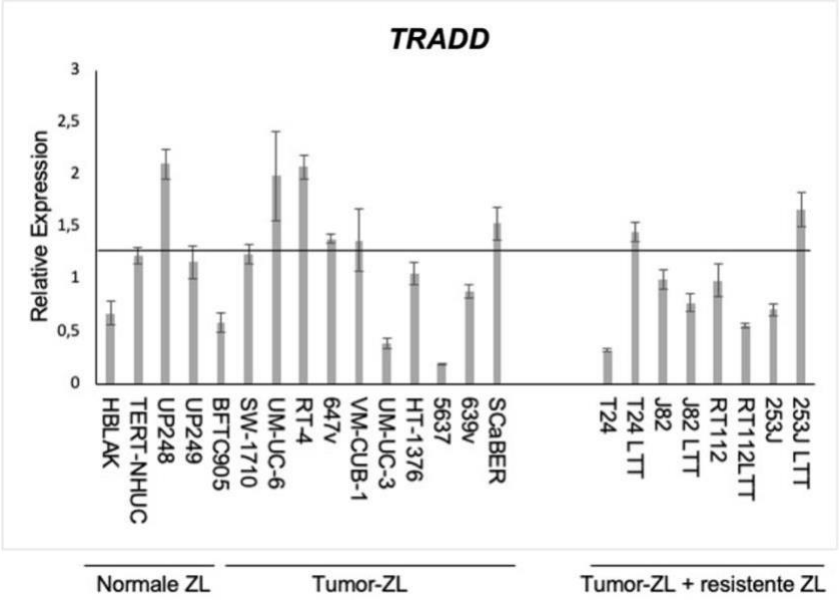


Abb. 5: Die proapoptotischen Faktoren *FADD* und *TRADD* sind in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression genannter Faktoren auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Kontroll-ZL eine variierende Expression von *FADD* und *TRADD* aufweisen, wobei *TRADD* stärker exprimiert wird als *FADD*. Die relative *FADD*-Expression unterscheidet sich darüber hinaus in Abhängigkeit von der untersuchten Tumor-ZL. Während manche eine höhere Expression als die Kontroll-ZL aufweisen, zeigen andere Tumor-ZL eine vergleichbare oder niedrigere *FADD*-Expression. Besonders hoch fällt die Expression von *FADD* in den UCCs VM-CUB-1 und 647v aus, was bereits nach einem kurzen Blick auf obige Abbildung hervorsticht. In den LTTs ergibt sich ein ebenso heterogenes Bild wie in den UCCs. Während zum Beispiel 253J LTT ein höheres *FADD*-Expressionsniveau aufweist als die Kontroll-ZL, warten andere LTTs mit niedrigeren Expressionsleveln auf.

In absoluten Zahlen exprimieren viele UCCs ähnlich viel oder sogar mehr *TRADD* als *FADD*. Vergleicht man jedoch die *TRADD*-Expression in UCCs mit der in den Kontroll-ZL, so fällt auf, dass nur wenige Tumor-ZL mehr *TRADD* exprimieren als die Kontroll-ZL, was im Falle von *FADD* gegenteilig ist. Es zeigt sich, dass die *TRADD*-Expression in den UCCs UM-UC-6 und RT-4 am stärksten ist, während VM-CUB-1 und 647v, die viel *FADD* exprimieren, nur geringfügig mehr *TRADD* bilden als die Kontroll-ZL.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Faktoren der extrinsischen Apoptose in den meisten UCCs fehlreguliert sind. Ob sich ähnliche Beobachtungen auch für die beiden am MOMP beteiligten Faktoren *BID* und *BAX* machen lassen, zeigt Abbildung 6.

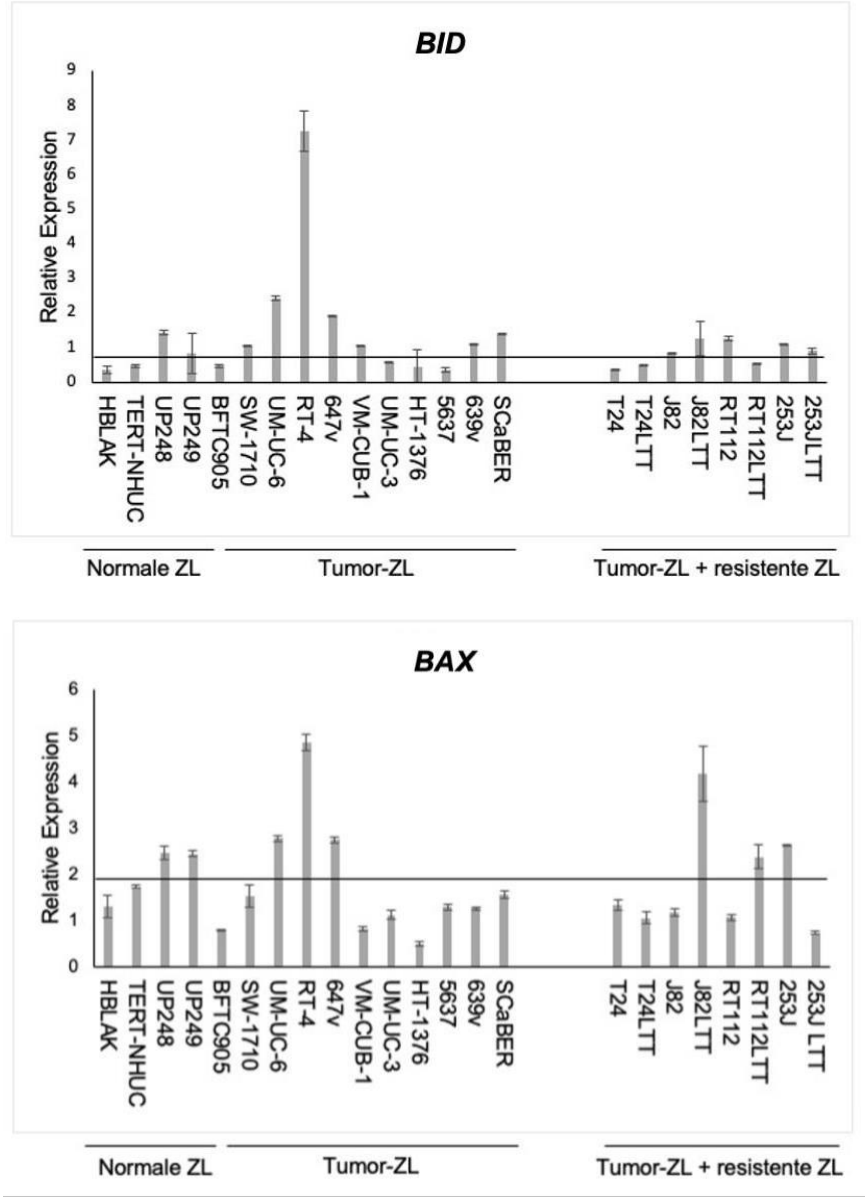


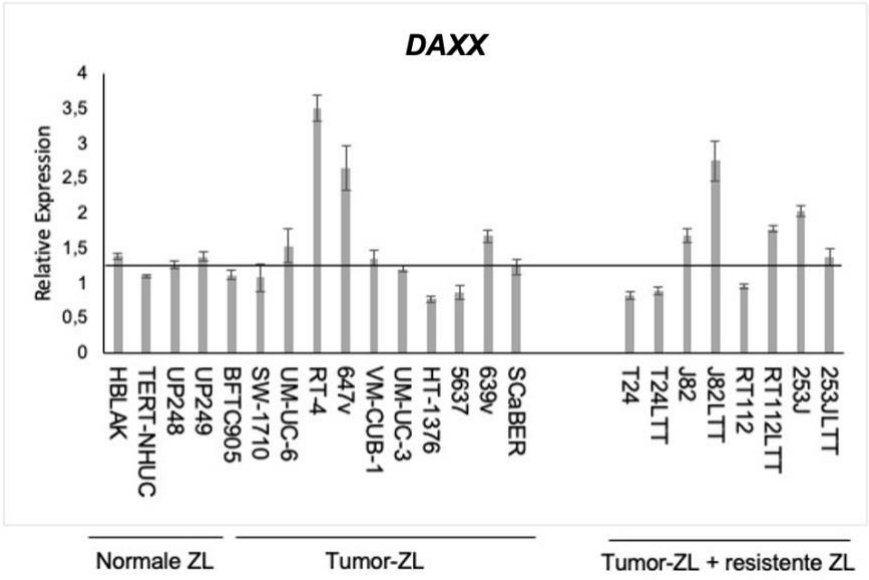
Abb. 6: Die proapoptotischen Faktoren *BID* und *BAX* sind in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression genannter Faktoren auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

In den normalen ZL beträgt die relative *BID*-Expression etwa 1. In den Tumor-ZL variiert sie zelllinienabhängig und fällt besonders stark in der UCC RT-4 aus. Daneben zeigen auch UM-UC-6 sowie 647v erhöhte Expressionswerte. An dieser Stelle gilt es zu erwähnen, dass

RT-4 aufgrund von *TBP*-Veränderungen häufig Zellexpressionsartefakte aufweist und daher im Kontext von Genexpressionsanalysen mit Zurückhaltung zu bewerten ist. Die übrigen UCCs weisen entweder eine vergleichbare oder niedrigere *BID*-Expression als die Kontroll-ZL auf. Die Bildung von *BID* variiert in LTTs: Das eine Mal wird das *BID*-Expressionsniveau der Kontroll-ZL überschritten, ein anderes Mal unterschritten. Sicher ist, dass hier keine signifikante Überexpression wie in RT-4 zu beobachten ist.

Wie oben beschrieben, sind *BID* und *BAX* an dem Prozess der *outer membrane permeabilization* beteiligt und interagieren in diesem Kontext. Dieser Umstand führt zu der Vermutung, dass beide Faktoren in etwa gleich stark exprimiert werden, jedoch handelt es sich dabei um eine Fehlannahme. Den vorliegenden Daten zufolge wird *BAX* in den Kontroll-ZL beinahe doppelt so stark exprimiert wie *BID*. Bricht man die vorliegenden Ergebnisse auf absolute Werte herunter, so zeigt sich, dass die UCCs mehr *BAX* als *BID* exprimieren, jedoch im Vergleich zu den normalen ZL eine geringere *BAX*-Expression aufweisen. Auch hier sticht abermals die UCC RT-4 hervor, die eine besonders hohe *BAX*-Expression zeigt, ebenso wie die LTT J82 LTT.

Abschließend sollen die proapoptotischen Faktoren *DAXX* und *BCL-XS* sowie deren relative Genexpression in Abbildung 7 näher beleuchtet werden.



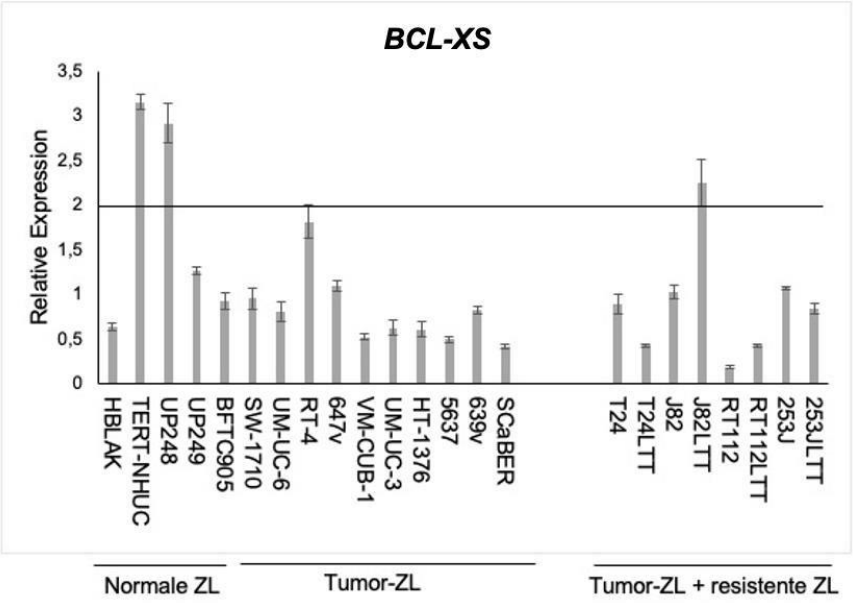


Abb. 7: Die proapoptotischen Faktoren *DAXX* und *BCL-XS* sind in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression genannter Faktoren auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

Auch anhand der Expression von *DAXX* und *BCL-XS* wird das deutlich, was in den vorherigen Textsegmenten immer wieder hervorgehoben wurde: Die Expression von proapoptotischen Faktoren ist in UCCs und LTTs fehlreguliert. Die Intensität besagter Fehlregulation unterscheidet sich in einer zelllinien- und faktorabhängigen Art und Weise und das nicht nur zwischen den verschiedenen ZL-Kategorien, sondern auch innerhalb dieser, sodass sich ein vielgestaltiges Bild ergibt.

In Bezug auf *BCL-XS* soll nicht unerwähnt bleiben, dass es sich um den einzigen in dieser Arbeit untersuchten proapoptotischen Faktor handelt, der in keiner einzigen UCC im Vergleich zu den Kontroll-ZL überexprimiert wird. Alleinig J82 LTT bildet mehr *BCL-XS* als die Kontrollgruppe aus. Bezieht man die vorherigen Abbildungen mit ein, so wird deutlich, dass J82 LTT stets mehr proapoptotische Faktoren exprimiert als die zugehörige parentale ZL. Dies trifft auf keine andere LTT zu.

Es kann festgehalten werden, dass einige UCCs proapoptotische Faktoren stärker exprimieren als in den Kontroll-ZL. Zu den betroffenen Faktoren zählen z.B. *BID* und *TRADD*. Die anderen Faktoren (*FADD*, *BAX*, *BCL-XS*) werden jedoch überwiegend geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe.

Ob sich die Expression antiapoptotischer Faktoren in UCCs und LTTs ähnlich gestaltet wie die ihrer proapoptotischen Gegenspieler, zeigen die Abbildungen 8 bis 10.

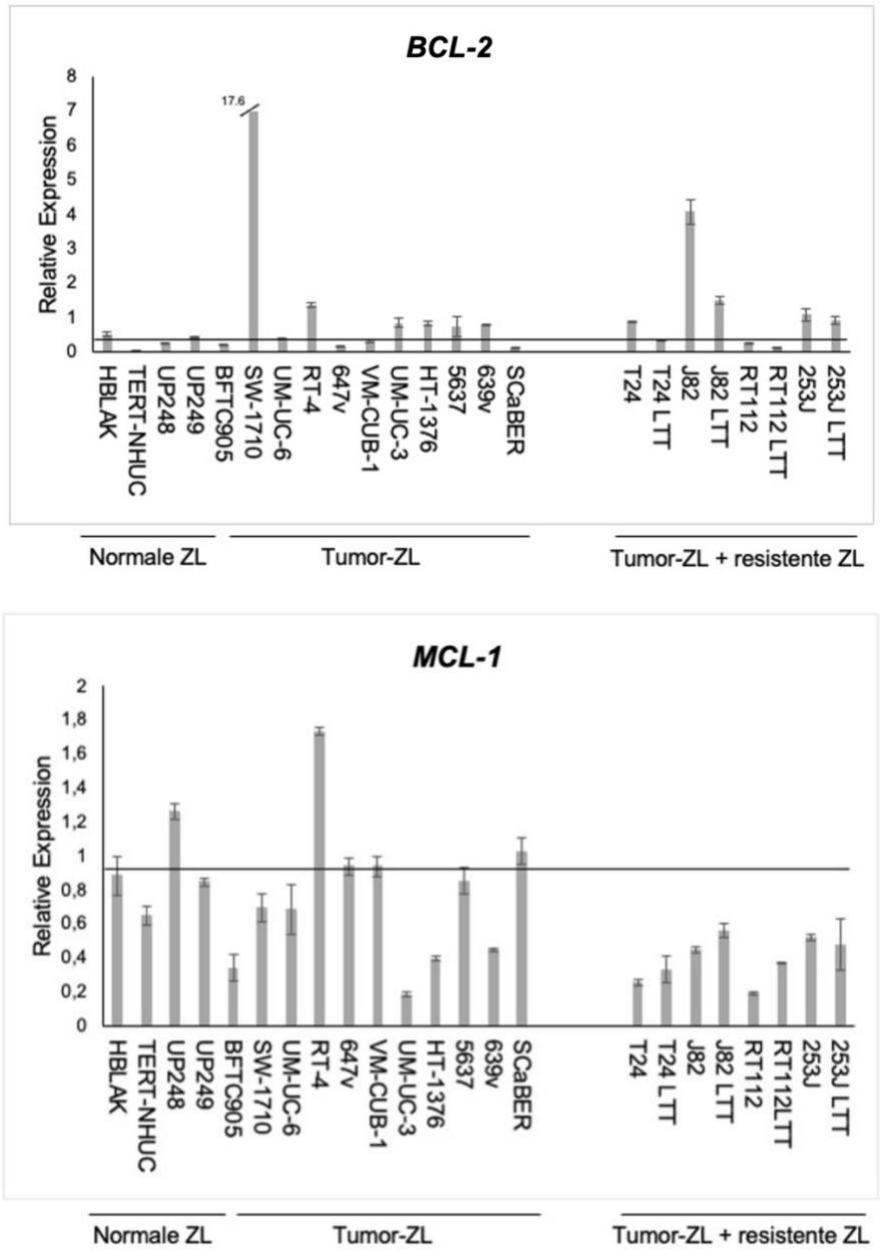
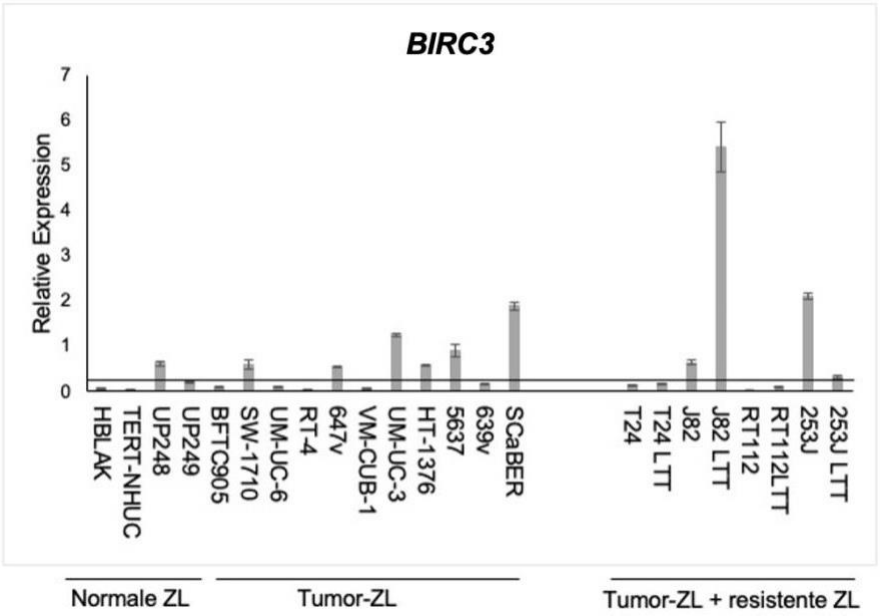


Abb. 8: Die antiapoptotischen Faktoren *BCL-2* und *MCL-1* sind in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression genannter Faktoren auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

Die relative *BCL-2*-Expression beläuft sich in den normalen ZL auf unter 0,5 und fällt damit vergleichsweise niedrig aus. Demgegenüber stehen die UCCs, die überwiegend eine leichte bis deutlich erhöhte Expression von *BCL-2* im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen.

Besonders sticht die ZL SW-1710 ins Auge, die ein äußerst hohes *BCL-2*-Expressionslevel zeigt, gefolgt von J82. Auffällig ist, dass alle analysierten LTTs weniger *BCL-2* exprimieren als die zugehörigen parentalen ZL. Die stärkste Diskrepanz liegt bei J82 und der entsprechenden resistenten Linie J82 LTT vor.

Die relative *MCL-1*-Expression in den Kontroll-ZL erreicht beinahe doppelt so hohe Werte wie die von *BCL-2*. Im Unterschied zu *BCL-2* wird *MCL-1* jedoch nur in wenigen UCCs deutlich überexprimiert. Dazu zählen die ZL RT-4 und SCaBER. Drei weitere UCCs weisen eine leicht erhöhte *MCL-1*-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Hervorzuheben ist, dass sämtliche LTTs mehr *MCL-1* bilden als ihre parentalen ZL, wobei die Expressionswerte der LTTs dennoch unterhalb derjenigen in den Kontroll-ZL verbleiben.



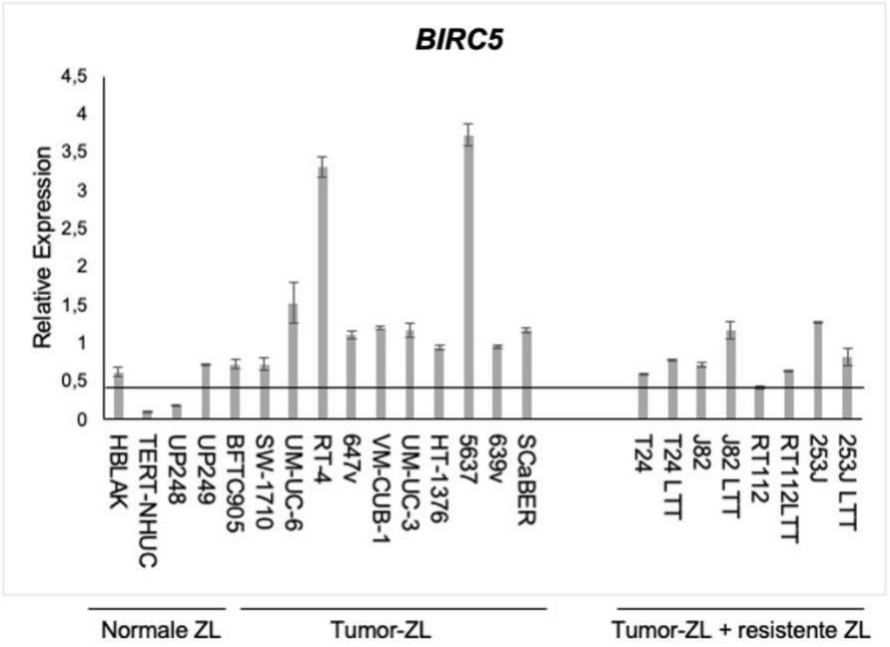


Abb. 9: Die antiapoptotischen Faktoren *BIRC3* und *BIRC5* sind in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression genannter Faktoren auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

Analog zu der relativen *BCL-2*-Expression in den normalen ZL fällt auch die Expression von *BIRC3* verhältnismäßig gering aus. In den untersuchten UCCs zeigt sich ein heterogenes Bild in Bezug auf die Bildung von *BIRC3*, wobei das Gros der Tumor-ZL *BIRC3* stärker oder sogar deutlich stärker exprimieren. In diesem Zusammenhang fallen insbesondere die UCCs UM-UC-3, SCaBER sowie 253J auf. Die höchste *BIRC3*-Expression findet sich in J82 LTT wieder.

Auch die basale Expression von *BIRC5* in der Kontrollgruppe ist überschaubar. Bei *BIRC5* handelt es sich um den einzigen hier analysierten antiapoptotischen Faktor, der in allen UCCs und LTTs stärker exprimiert wird als in den normalen ZL, was seine mögliche Bedeutung im UC betont. Die stärkste Expression von *BIRC5* wurde in der UCC 5637 beobachtet. Hervorzuheben ist, dass *BIRC5* in allen LTTs, abgesehen von 253J LTT, stärker exprimiert wird als in den dazugehörigen parentalen ZL, was darauf hindeutet, dass dieser Apoptosefaktor auch an der Entstehung der Cisplatinresistenz im UC beteiligt sein könnte.

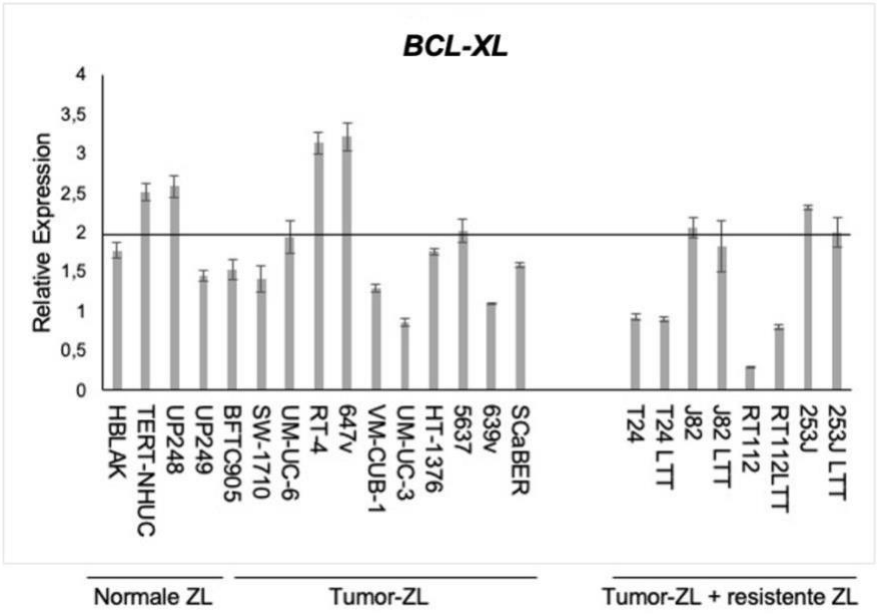


Abb. 10: Der antiapoptotische Faktor *BCL-XL* ist in UCCs fehlreguliert. Untersucht wurde die Expression des genannten Faktors auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR. Gemessen wurden Triplikate. Der Mittelwert wurde mit der Expression des *housekeeping* Gens *TBP* ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Die durchschnittliche Expression des jeweiligen Faktors in den vier Kontroll-ZL wird durch eine Linie dargestellt. Weiterhin sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Abszisse zeigt die verwendeten ZL eingeteilt in normale ZL, Tumor-ZL sowie Tumor-ZL mit korrespondierenden Cisplatin resistenten ZL. Auf der Ordinate befindet sich die relative Genexpression.

Die basale Expression von *BCL-XL* fällt in den normalen ZL mit einem Wert von etwa 2 vergleichsweise hoch aus. Ähnlich verhielt es sich mit dem proapoptotischen *Splice*-Produkt *BCL-XS*, das in den Kontroll-ZL ähnlich viel gebildet wurde. Im Vergleich mit den anderen antiapoptotischen Faktoren fällt die absolute Expression von *BCL-XL* in UCCs höher aus, befindet sich jedoch in relativen Werten unterhalb der in den normalen ZL gemessenen Referenz. In Bezug auf die LTTs ergibt sich ein heterogenes Bild: Während die relative Expression von *BCL-XL* in J82 LTT und 253J LTT verhältnismäßig hoch ausfällt und in etwa auf dem Expressionslevel der Kontrollgruppe liegt, bilden T24 LTT sowie RT112 LTT deutlich weniger *BCL-XL* aus.

Übergreifend betrachtet lässt sich feststellen, dass die Apoptose im UC fehlreguliert ist, wobei es mitunter zu einer verminderten Expression von proapoptotischen Faktoren kommt sowie zu einer stärkeren Bildung antiapoptotischer Regulatoren (*BCL-2*, *BIRC3*, *BIRC5*). Diese Mechanismen könnten zur Entstehung einer Apoptose- und Therapieresistenz beitragen.

4.1.2 Die Abundanz von Apoptosefaktoren kann sich auf mRNA- und Proteinebene unterscheiden

Die obigen Abbildungen haben gezeigt, dass pro- und antiapoptotische Faktoren im UC auf mRNA-Ebene fehlreguliert sind. Da solche Veränderungen erst über den Proteinstatus biologische Auswirkungen zeigen, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob sich Übereinstimmungen oder Unterschiede in der Expression der Apoptosefaktoren auf mRNA- und Proteinebene zeigen. Um dies festzustellen, wurden der proapoptotische Faktor BID sowie antiapoptotisches BCL-2 als repräsentativ ausgewählt. Die Untersuchungen erfolgten mittels *Western Blot* unter Verwendung von sieben UCCs sowie HBLAK als Kontroll-ZL. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 11 aufgeführt.

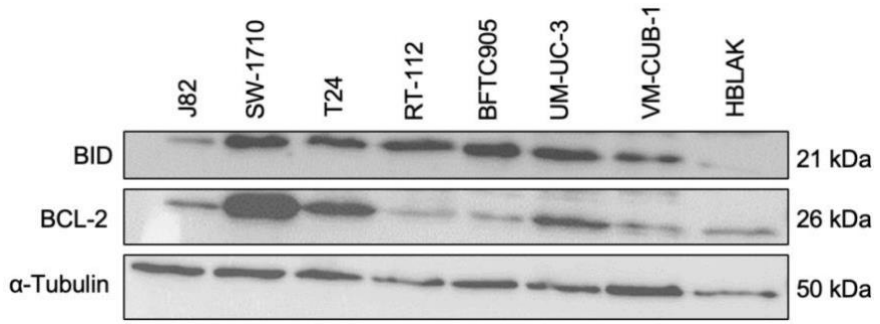


Abb. 11: Nachweis von proapoptotischem BID und antiapoptotischem BCL-2 auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK. Der Nachweis erfolgte mittels *Western Blot*. Als Ladungskontrolle fungierte α-Tubulin (50 Kilodalton (kDa)). Breite und Intensität der Banden zeigen das Ausmaß der Proteinabundanz.

Der Vergleich von Abbildung 11 mit den vorangehenden Grafiken zeigt, dass die Abundanz von BID und BCL-2 auf mRNA- und Proteinebene teilweise ähnlich ausfällt, jedoch auch Unterschiede offenbar werden. So wird BID in der Kontroll-ZL HBLAK sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinniveau geringfügig gebildet. Im Gros der UCCs fällt die Expression von *BID* auf mRNA-Ebene geringer aus als auf der Proteinebene. Alle von uns untersuchten UCCs wiesen ein stärkeres BID-Proteinniveau auf, als dieses in der Kontroll-ZL HBLAK detektierbar war. Dabei handelt es sich um eine bedeutende Feststellung, denn man hätte mit dem Gegenteil rechnen können, schließlich zeigen Studien, dass Krebszellen durch die reduzierte Expression von proapoptotischen Faktoren einen Wachstumsvorteil haben (Pfeffer & Singh, 2018). An dieser Stelle gilt es jedoch hervorzuheben, dass in der Kontroll-ZL HBLAK weniger Tubulin detektiert wurde als in UCCs, was darauf hindeutet, dass im Rahmen der *Western Blot*-Analysen abweichende Proteinmengen verwendet wurden, was einen fundierten Vergleich erschwert.

Wie Abbildung 6 bereits gezeigt hat, exprimieren die Kontroll-ZL auf mRNA-Ebene weniger *BCL-2* als das Gros der UCCs. Diese Beobachtung setzt sich auch auf Proteinebene fort. Abbildung 11 visualisiert, dass fünf der untersuchten UCCs mehr BCL-2 bilden als HBLAK. Am stärksten wird BCL-2 auf Proteinebene in SW-1710 gebildet. Hier stimmen die qRT-PCR- und *Western-Blot*-Ergebnisse überein. Die qRT-PCR zeigt aber auch, dass *BCL-2* in T24 weniger stark exprimiert wird als in J82, was sich auf Proteinebene umgekehrt darstellt.

4.1.3 Die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren korreliert in UCCs oftmals nicht miteinander

Das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Faktoren trägt maßgeblich zu der Entscheidung über Zelltod oder -überleben bei. Die Mitglieder der BCL-2-Familie können durch die Formierung von Heterodimeren in Interaktion treten und sich auf diese Weise gegenseitig hemmen oder aktivieren (Yin et al., 1994).

Um die Verbindung von pro- und antiapoptotischen Faktoren im UC besser zu verstehen, wurde der Korrelationskoeffizient (r) zwischen elf pro- und antiapoptotischen Faktoren ermittelt, deren Expression zuvor auf mRNA-Ebene bestimmt worden war (siehe 4.1.1). Die berechneten Korrelationskoeffizienten werden in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Korrelationskoeffizienten (r) verschiedener Apoptosefaktor-Kombinationen. Die proapoptotischen Faktoren sind grün hervorgehoben. Zu ihnen zählen *BAX*, *BCL-XS*, *BID*, *FADD*, *TRADD* und *DAXX*. Die antiapoptotischen Faktoren sind rot hervorgehoben. Zu ihnen zählen *BCL-2*, *BCL-XL*, *BIRC3*, *BIRC5* und *MCL-1*. Die Daten, die für die Bildung der Korrelationskoeffizienten verwendet wurden, wurden mit Hilfe der qRT-PCR erhoben. r beschreibt die Stärke und Richtung des linearen Zusammenhangs. Dieser kann negativ ($r < 0$), positiv ($r > 0$) oder nicht vorhanden ($r = 0$) sein. Von einer starken linearen Korrelation ist die Rede, wenn $r \geq 0{,}5$ oder $r \leq -0{,}5$ beträgt. Stark positive oder negative Zusammenhänge werden in der Grafik grau hervorgehoben.

	BCL-XS	BID	FADD	TRADD	DAXX	BCL-2	BCL-XL	BIRC3	BIRC5	MCL1
BAX	0,51	0,7	0,35	0,32	0,85	-0,03	0,53	0,42	0,16	0,57
BCL-XS		0,23	0,12	0,33	0,32	-0,02	0,59	0,24	0,01	0,4
BID			0,48	0,58	0,72	0	0,49	-0,09	-0,02	0,71
FADD				0,56	0,51	0	0,39	0,1	0,02	0,51
TRADD					0,28	0,02	0,45	-0,2	-0,16	0,62
DAXX						-0,07	0,57	0,36	0,17	0,51
BCL-2							0,05	0,04	-0,02	0
BCL-XL								0,1	0,18	0,7
BIRC3									-0,02	-0,04
BIRC5										-0,08

Insgesamt wurde r für 55 Kombinationen berechnet. Ein positiver linearer Zusammenhang ist in 16 Fällen nachweisbar, während ein negativer linearer Zusammenhang in keiner der

untersuchten Apoptosefaktor-Kombinationen auftritt. In der überwiegenden Anzahl ist weder ein positiver noch ein negativer linearer Zusammenhang nachweisbar.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft sechs ausgewählte Apoptosefaktor-Kombinationen.

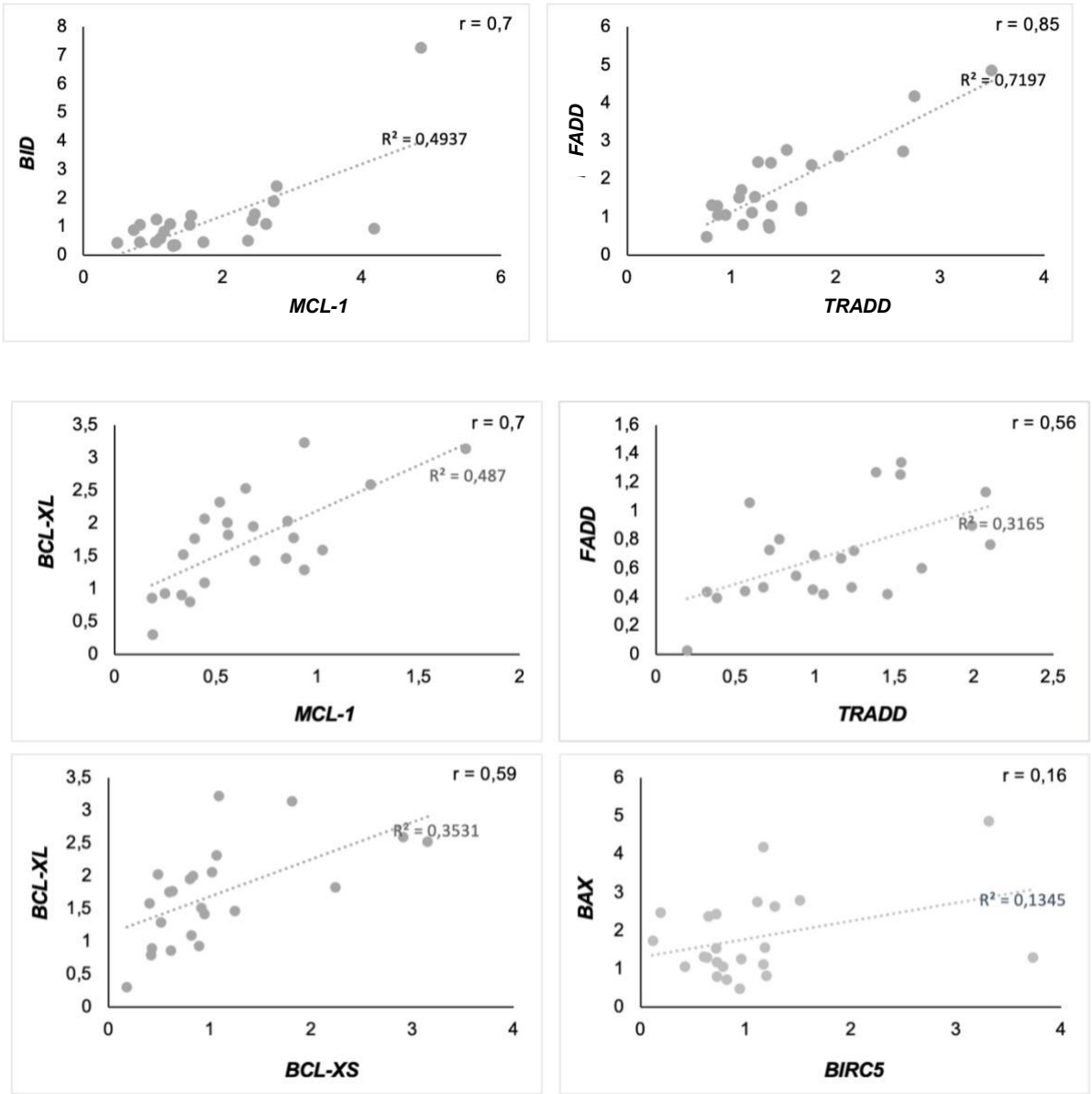


Abb. 12: Beispielhafte Darstellung ausgewählter Apoptosefaktor-Kombinationen. Zu den Apoptosefaktoren zählen proapoptotisches *BID*, *BAX*, *FADD*, *BCL-XS*, *TRADD* sowie *DAXX*. Zu den antiapoptotischen Faktoren gehören *BCL-XL*, *MCL-1* sowie *BIRC5*. r steht für den Korrelationskoeffizienten. R^2 ist das Bestimmtheitsmaß und Quadrat von r. Die Abszisse und Ordinate zeigen die Apoptosefaktoren, deren Korrelation untersucht wurde.

Positive lineare Zusammenhänge bestehen sowohl innerhalb der Gruppe der proapoptotischen Faktoren als auch unter den antiapoptotischen Faktoren. So zeigt sich ein stark positiver linearer Zusammenhang zwischen den proapoptotischen Faktoren *BAX* und *BID* (r = 0,7), der im Falle von *BAX* und *DAXX* nochmals intensiver ausfällt (r = 0,85).

Darüber hinaus besteht ein starker linearer Zusammenhang zwischen den antiapoptotischen Faktoren *BCL-XL* und *MCL-1* (r = 0,7). Interessanterweise gibt es auch zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren eine positive lineare Beziehung, was sich am Beispiel von *BCL-XL* und *BCL-XS* (r = 0,56) zeigt. Die vermehrte Expression antiapoptotischer Faktoren führt also nicht unweigerlich zu einer reduzierten Bildung proapoptotischer Faktoren und umgekehrt. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression von Apoptosefaktoren besteht. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, konnte etwa für *BIRC5* und *BAX* (r = 0,16) keine klare Korrelation nachgewiesen werden.

4.2 Epigenetische Inhibitoren verändern die Expression von Apoptosefaktoren im UC

4.2.1 Epigenetische Inhibitoren verändern die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren auf mRNA-Ebene

Chemotherapeutika spielen in der Behandlung des UC eine zentrale Rolle, wobei ihre Verwendung mit zahlreichen Nebenwirkungen einhergeht und die Überlebensrate nur geringfügig gesteigert wird. Aus diesen Gründen ist der Bedarf an neuen Therapien für das UC groß. In der Vergangenheit wurden HDACs als potenzielle Angriffspunkte in der Behandlung des UC identifiziert. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, auf welche Weise EPIis, die diese HDACs adressieren, im UC wirken und ob sie einen ähnlichen Effekt aufweisen wie ein siRNA vermittelter HDAC-*Knockdown*.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit dem DNMTi Decitabin und dem BETi PLX51107 behandelt. Darüber hinaus erfolgte die Applikation von siRNA, die zu einem *Knockdown* von HDAC1, 2 oder 3 führte. Außerdem wurde ein kombinierter *Knockdown* von HDAC1 und 2 induziert. Der HDAC-*Knockdown* wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe validiert. Mit Hilfe der qRT-PCR wurde im Anschluss die Expression von elf pro- und antiapoptotischen Faktoren der BCL-2-Familie und der IAPs bestimmt.

Die relative Expression proapoptotischer Faktoren im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle ist den Abbildungen 13 bis 15 zu entnehmen.

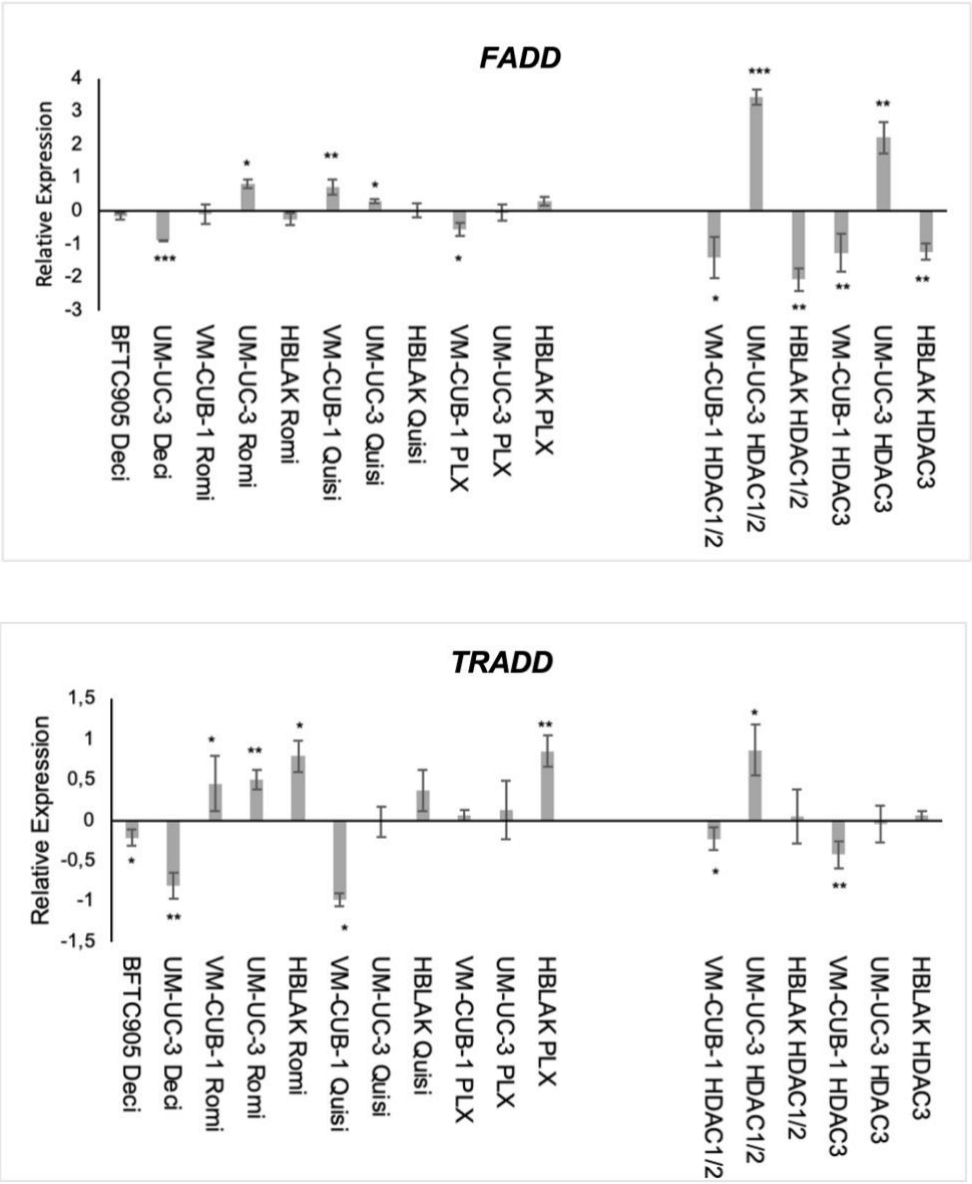
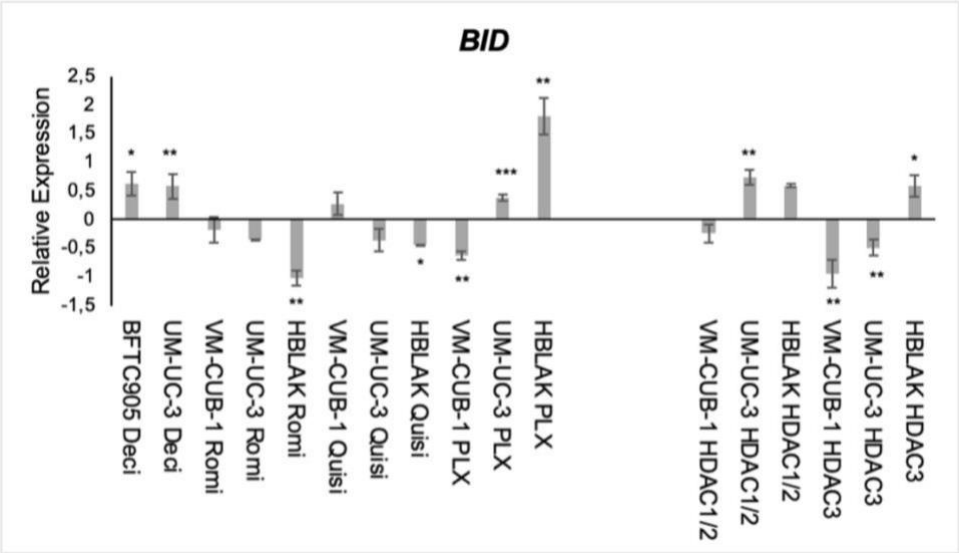


Abb. 13: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren *FADD* und *TRADD* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Die EPIis führen zu einer zelllinien- und faktorabhängigen Modifikation der Genexpression von Apoptosefaktoren. Die Verwendung von Decitabin resultiert in einer konsistenten Abnahme von *FADD* und *TRADD*, während die Wirkung von Romidepsin variabler ausfällt und in Bezug auf *FADD* z.B. expressionssteigernd oder -senkend wirkt. Hinsichtlich *TRADD* führt Romidepsin ausschließlich zu einer Verstärkung der Genexpression, die in der Kontroll-ZL HBLAK ausgeprägter ist als in den UCCs. Quisinostat sowie der BETi

PLX51107 weisen eine ebenso heterogene Wirkung auf die Genexpression auf wie Romidepsin. Wenn man die Resultate eines siRNA vermittelten HDAC-*Knockdowns* auf die Expression von *FADD* und *TRADD* beleuchtet, wird deutlich, dass der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 stärkere Genexpressionsveränderungen induziert als der alleinige *Knockdown* von HDAC3. Auch hier liegt abermals eine zelllinienabhängige Wirkung vor, wobei der HDAC-*Knockdown* in der UCC UM-UC-3 überwiegend am potentesten wirkt.

Wenn der Effekt einer epigenetischen Inhibition und die Resultate eines siRNA vermittelten HDAC-*Knockdowns* auf die Expression von *FADD* und *TRADD* nebeneinander betrachtet werden, fällt auf, dass letzterer v.a. in Bezug auf *FADD* die Genexpression stärker modifiziert als es EPIis vermögen. Dies ist jedoch nicht immer förderlich, denn teilweise wird der proapoptotische Faktor *FADD* infolge einer Behandlung mit siRNA herunterreguliert, was in Krebszellen zu weniger Apoptose führen könnte. Hinsichtlich *TRADD* sind die Auswirkungen von EPIis und einem HDAC-*Knockdown* ähnlich.



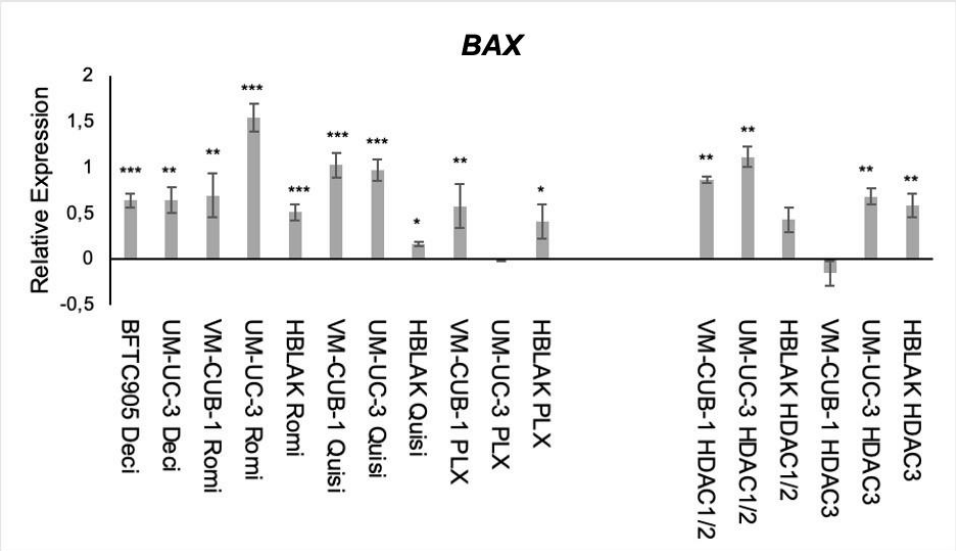


Abb. 14: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren *BID* und *BAX* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Im Gegensatz zu *FADD* und *TRADD* führt Decitabin in den an der intrinsischen Apoptose beteiligten Faktoren *BID* und *BAX* zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von Decitabin in Abhängigkeit von dem betrachteten Apoptoseweg variiert. Die HDACis Romidepsin und Quisinostat senken die Expression von *BID* überwiegend, während die Bildung von *BAX* gefördert wird. In Bezug auf PLX51107 zeichnet sich erneut ein heterogenes Bild. Während die Substanz in der Kontroll-ZL HBLAK die Expression von *FADD* und *TRADD* sowie von *BID* und *BAX* ausschließlich steigert, ist das Bild in den Tumor-ZL differenzierter. Im Fall von *BID* führt der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 zu ähnlich potenten Genexpressionsveränderungen wie der alleinige *Knockdown* von HDAC3, wobei sich die Richtung der Veränderungen häufig unterscheidet. *BAX* betreffend hat der von uns untersuchte HDAC-*Knockdown* eine verstärkte Expression des Faktors zur Folge, wobei die Wirkungsintensität ungefähr mit der von Romidepsin und Quisinostat vergleichbar ist.

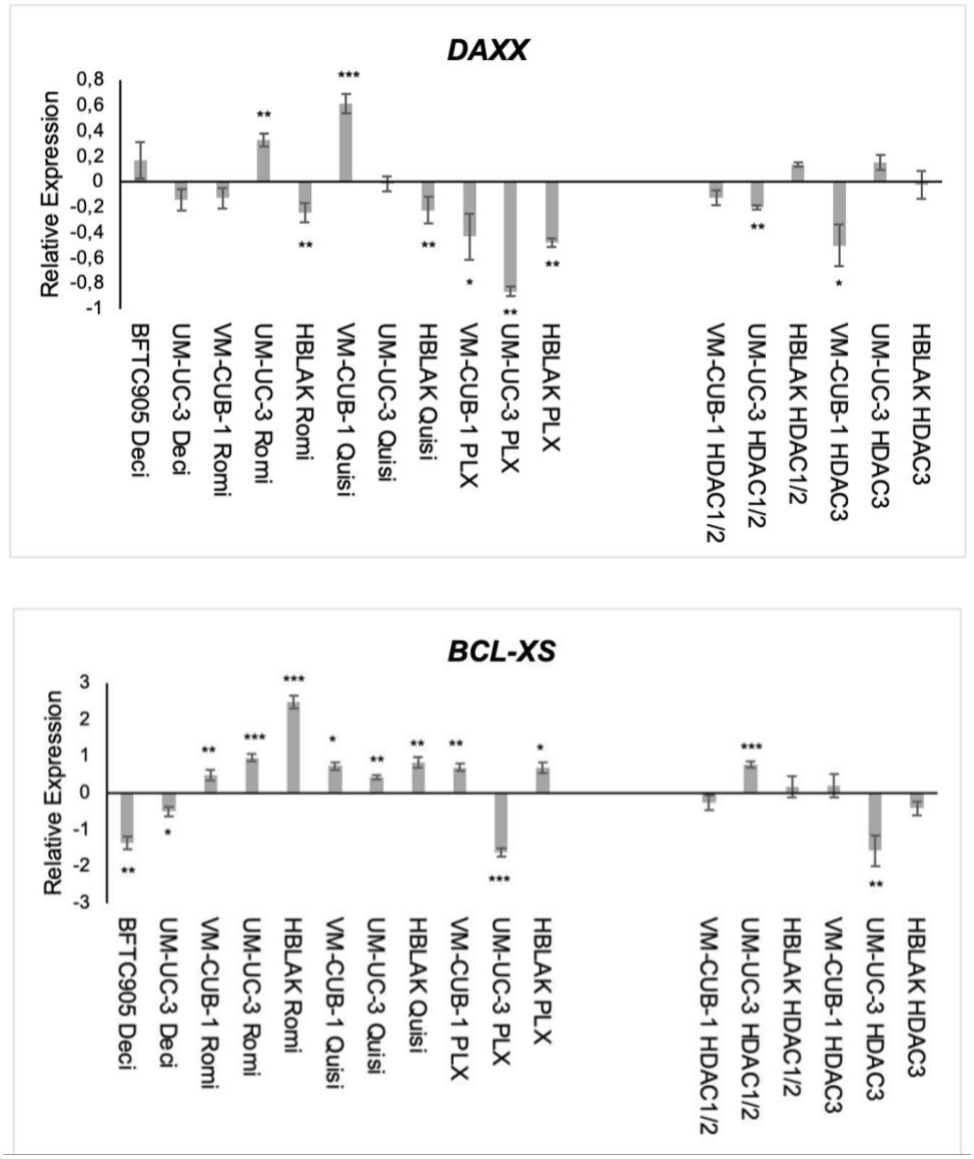


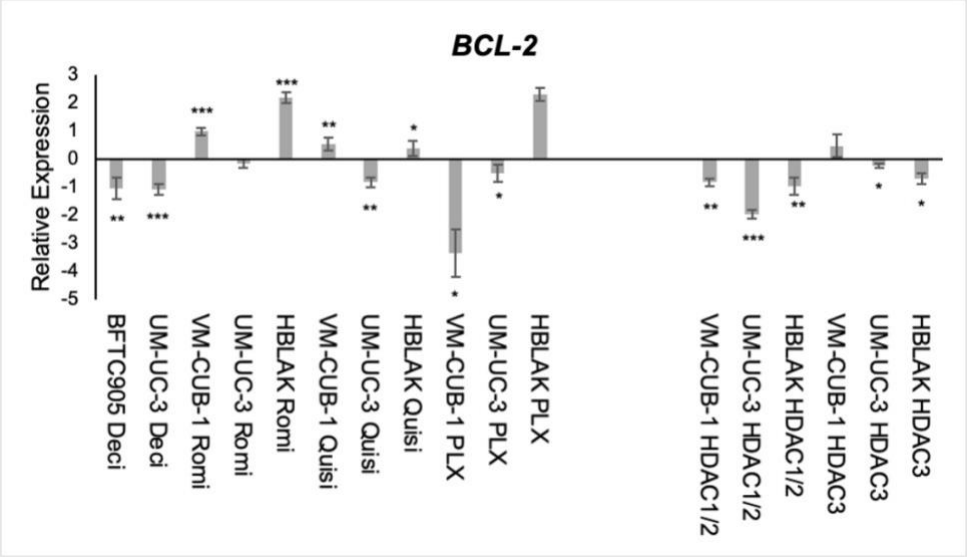
Abb. 15: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren *DAXX* und *BCL-XS* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Die Wirkung von Decitabin ist in *DAXX* das erste Mal nicht gleichgerichtet. Während es in der UCC BFTC905 unter Decitabin-Einfluss zu einer Steigerung der *DAXX*-Expression kommt, resultiert selbige Intervention in UM-UC-3 in einer reduzierten Bildung. Dabei sind die induzierten Expressionsveränderungen jedoch nicht signifikant. Die HDACis Romidepsin und Quisinostat führen erneut ein uneinheitliches Expressionsmuster herbei. In Zusammenschau mit den vorherigen Grafiken scheint es, als ob Romidepsin in der UCC UM-UC-3 potentere Genexpressionsveränderungen hervorruft als in VM-CUB-1.

Quisinostat hingegen scheint stärker in VM-CUB-1 zu wirken. Diese Beobachtung deutet auf eine zellspezifische Wirkungsweise von HDACis hin. PLX51107 senkt die *DAXX*-Expression in allen untersuchten ZL, während die Bildung von *BCL-XS* nur in UM-UC-3 reduziert wird.

Insgesamt zeigt sich, dass die untersuchten EPIis zelllinienabhängige und teils gegensätzliche Effekte auf die Expression von proapoptotischen Faktoren aufweisen. Während Romidepsin in der Regel (i.d.R.) eine höhere Potenz in UM-UC-3 aufweist, zeigt Quisinostat einen größeren Effekt in VM-CUB-1. PLX51107 hat eine größere Wirksamkeit in der Kontroll-ZL HBLAK im Vergleich zu den UCCs, was auf eine unterschiedliche Sensitivität und ein divergierendes Antwortverhalten der ZL hindeutet. Alles in allem lässt sich jedoch feststellen, dass EPIis, speziell solche die mit der Histonacetylierung interferieren, wie HDACis und BETis, die Expression von proapoptitischen Faktoren in den Tumor-ZL steigern. Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 führt im Vergleich zur pharmakologischen Inhibition zu stärkeren Expressionsveränderungen von *FADD* und *TRADD*, jedoch nicht immer in die gewünschte Richtung. Im Falle von *BID* und *BAX* sind die Auswirkungen eines HDAC-*Knockdowns* mit denen von EPIis vergleichbar, was auf funktionelle Überschneidungen hindeutet.

Ob sich ähnliche Beobachtungen auch für antiapoptotische Faktoren machen lassen, zeigen die nun folgenden Abbildungen.



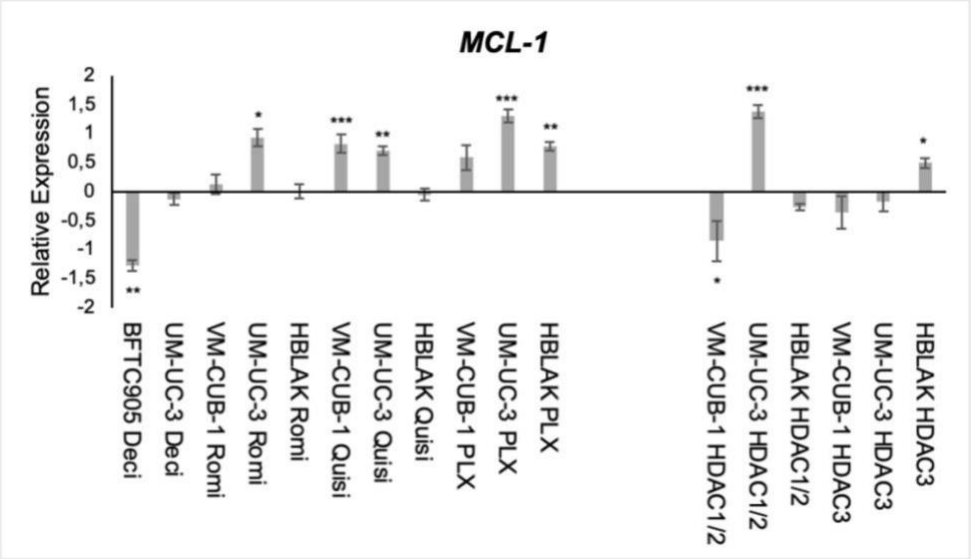
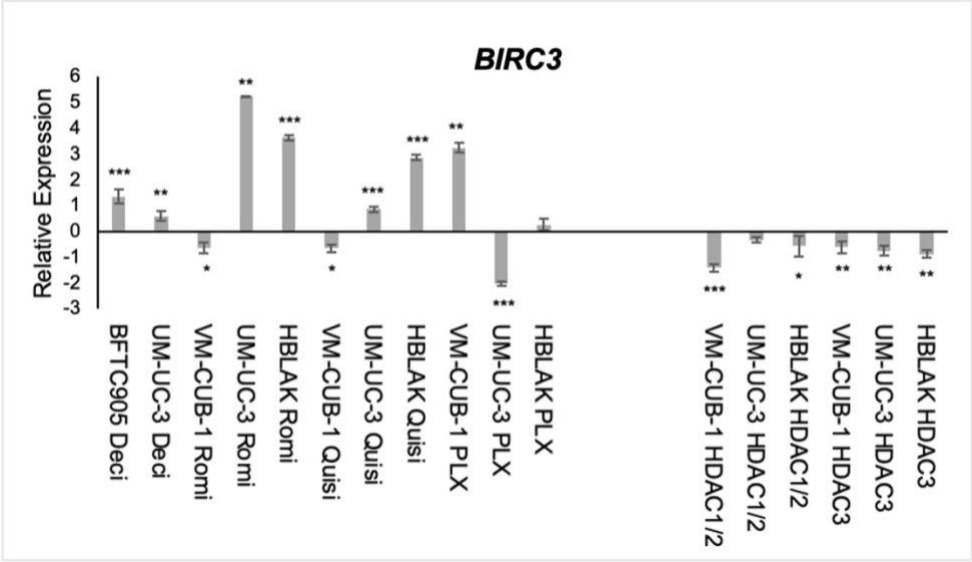


Abb. 16: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der antiapoptotischen Faktoren *BCL-2* und *MCL-1* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Decitabin führt in den verwendeten UCCs zu einer signifikanten oder gar hochsignifikanten Reduktion der *BCL-2*-Expression. Der Effekt der HDACis Romidepsin und Quisinostat ist diverser. Während sich die beiden Substanzen in der Kontroll-ZL HBLAK förderlich auf die *BCL-2*-Expression auswirken, präsentiert sich in den UCCs ein heterogenes Muster. In UM-UC-3 resultiert der Einsatz von Romidepsin oder Quisinostat in der verringerten Bildung von *BCL-2*. Die Anwendung genannter HDACis in VM-CUB-1 hat das Gegenteil zur Folge. Die hier detektierbaren Veränderungen der Genexpression sind teils hochsignifikant und von biologischer Relevanz. PLX51107 steigert die Bildung von *BCL-2* in HBLAK signifikant und senkt sie in den UCCs in vergleichbarer Signifikanz, wobei das Medikament in VM-CUB-1 stärkere Genexpressionsveränderungen hervorruft als in UM-UC-3. Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 in der UCC UM-UC-3 bewirkt die stärksten Veränderungen der *BCL-2*-Expression unter allen getesteten siRNAs. In der Kontroll-ZL HBLAK sowie in der UCC UM-UC-3 wirkt der kombinierte *Knockdown* potenter als der einzelne *Knockdown* von HDAC3. Vom Ausmaß her verändert der siRNA-induzierte *Knockdown* die Expression von *BCL-2* ähnlich stark wie der Einsatz von HDACis. Jedoch besteht bzgl. des *Knockdowns* der Vorteil, dass dieser nicht in einer vermehrten, sondern in einer geringeren Expression von *BCL-2* mündet.

Vergleichbar mit *BCL-2* reduziert Decitabin auch in Bezug auf *MCL-1* die Genexpression. In BFTC-905 erfolgt dies auf signifikante Art und Weise, in UM-UC-3 in geringerem Ausmaß. Der Einsatz von Romidepsin und Quisinostat führt in den untersuchten UCCs zu einer Steigerung der *MCL-1*-Expression, wobei es in der Kontroll-ZL lediglich zu einer minimalen Expressionssteigerung oder -senkung kommt. PLX51107 steigert sowohl in der Kontroll-ZL als auch in den UCCs die Bildung von *MCL-1*. Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 führt zu einer Abnahme der Genexpression von *MCL-1* in VM-CUB-1 und zu einer Steigerung des Faktors in UM-UC-3. Die induzierten Genexpressionsveränderungen fallen stärker aus als nach einer Behandlung mit HDAC3-siRNA. In Bezug auf *MCL-1* ist der gleichzeitige *Knockdown* von HDAC1 und 2 wahrscheinlich vorteilhafter als der Einsatz von EPIis, da ersterer zu einer stärkeren Reduktion dieses antiapoptotischen Faktors führt.



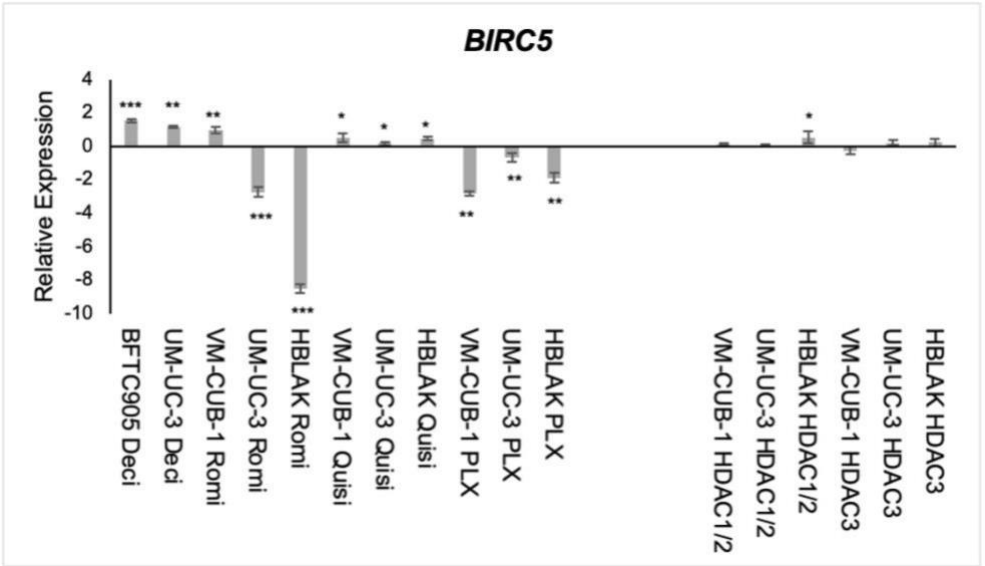


Abb. 17: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der antiapoptotischen Faktoren *BIRC3* und *BIRC5* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Decitabin führt in allen untersuchten UCCs zu einer Reduktion der Genexpression von *BIRC3* und *BIRC5*. Das Ausmaß dieser Reduktion ist für beide Apoptosefaktoren ähnlich, jedoch im Falle der UCC BFTC-905 etwas ausgeprägter als in UM-UC-3. Die Verwendung von Romidepsin induziert in HBLAK und v.a. in UM-UC-3 eine starke Expressionssteigerung von *BIRC3*. Interessanterweise hat Romidepsin auf *BIRC5* eine gegenteilige Wirkung. Hier senkt es die Expression von *BIRC5* stark, v.a. in der Kontroll-ZL HBLAK. Quisinostat zeigt in Bezug auf die *BIRC3*-Expression ein heterogenes Effektprofil, denn in einigen ZL führt Quisinostat zu einer Steigerung der Genexpression, in anderen jedoch zu einer Reduktion dieser. Hinsichtlich *BIRC5* führt Quisinostat zu einer leichten Expressionssteigerung und zeigt somit eine gegensätzliche Wirkung zu Romidepsin, wobei die induzierten Expressionsveränderungen geringer ausgeprägt sind als unter dem Einfluss von Romidepsin. PLX51107 wirkt in Bezug auf den Faktor *BIRC3* sehr heterogen auf die Genexpression und induziert die stärksten Expressionsveränderungen in VM-CUB-1. In *BIRC5* führt PLX51107 ausschließlich zu einer Herabregulation des Apoptosefaktors und das, in Analogie zu *BIRC3*, abermals am stärksten in der UCC VM- CUB-1. Anders als der Einsatz von EPIis führt die Verwendung von HDAC-siRNA in den untersuchten ZL zu einer Herabregulation von *BIRC3*. Am potentesten wirkt dabei der Einsatz von HDAC1- und 2-siRNA in VM-CUB-1. Der Effekt eines HDAC-siRNA vermittelten *Knockdowns* in Bezug auf *BIRC5* ist deutlich marginaler als in *BIRC3* und fällt schwächer aus als nach dem Einsatz von EPIis.

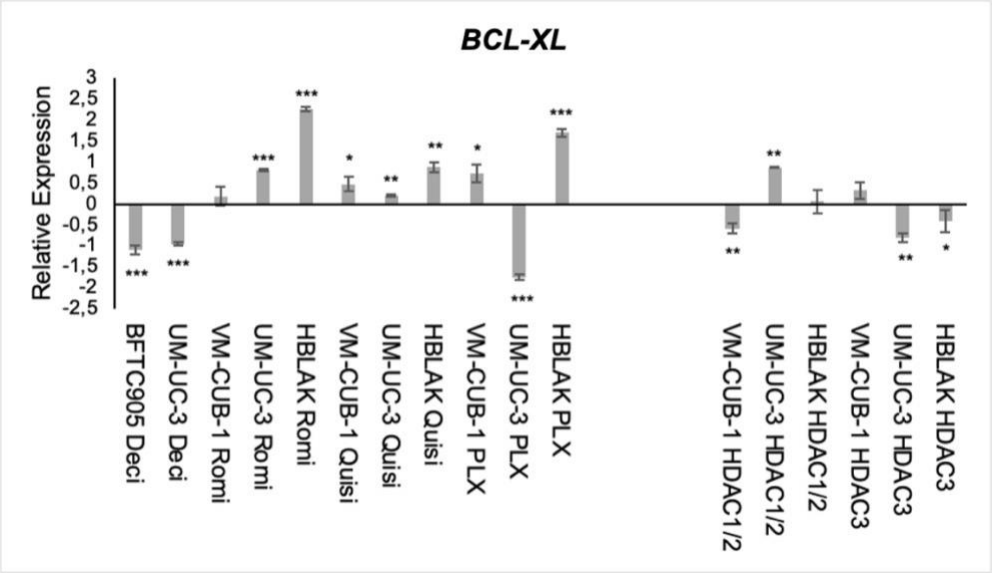


Abb. 18: Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression des antiapoptotischen Faktors *BCL-XL* in UCCs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO- oder siRNA-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO- oder siRNA-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Analog zu den Effekten in *BCL-2* und *MCL-1* führt Decitabin auch zu einer Reduktion der *BCL-XL*-Expression, die hochsignifikant ausfällt. Die Applikation der HDACis Romidepsin und Quisinostat resultiert ausschließlich in der gesteigerten Bildung von *BCL-XL*, wobei Romidepsin erneut stärkere Expressionsveränderungen hervorruft als Quisinostat. PLX51107 zeigt erneut ein heterogenes Wirkungsmuster und senkt die *BCL-XL*-Expression am potentesten in UM-UC-3 sowie in HBLAK. Hinsichtlich eines siRNA-induzierten *Knockdowns* zeichnet sich abermals ein uneinheitliches Muster ab: In einigen Fällen wird die *BCL-XL*-Expression verringert, in anderen gesteigert.

Alles in allem führt Decitabin zu einer effektiven Senkung antiapoptotischer Faktoren der BCL-2-Familie, jedoch nicht der IAPs, deren Expression es steigert. Die HDACis Romidepsin und Quisinostat führen zu teils gegensätzlichen Effekten, wobei Romidepsin i.d.R. stärkere Genexpressionsveränderungen hervorruft als Quisinostat. PLX51107 führt heterogene Expressionsveränderungen herbei. Im Bereich der HDAC-siRNA führt der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 zu stärkeren Genexpressionsveränderungen als der einzelne *Knockdown* von HDAC3.

4.2.2 Epigenetische Inhibitoren verändern die Abundanz verschiedener Apoptosefaktoren auf Proteinebene nur marginal

Weiterer Untersuchungsgegenstand ist, ob die in den Abbildungen 16 und 18 aufgeführten Ergebnisse auch auf die Proteinebene übertragbar sind. Anhand der nachfolgenden Grafik lässt sich Klarheit in Bezug auf die Fragestellung gewinnen.

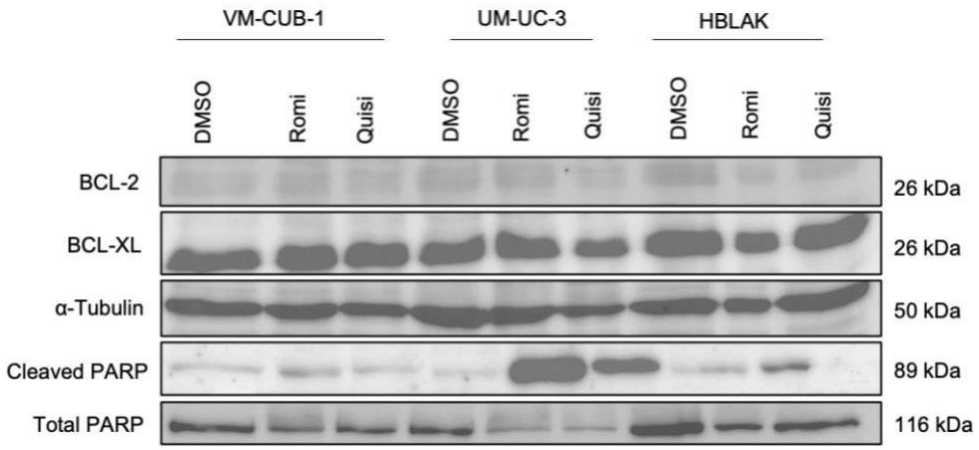


Abb. 19: Nachweis von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL sowie von *cleaved* PARP auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat. Der Nachweis erfolgte mittels *Western Blot*. Als Ladungskontrollen fungierten α-Tubulin (50 kDa) und *total* PARP (116 kDa).

Abbildung 19 zeigt die Abundanz von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL auf Proteinebene nach einer Behandlung mit Romidepsin und Quisinostat. Darüber hinaus wird die Abundanz von *cleaved* PARP veranschaulicht, bei dem es sich um einen Apoptoseindikator handelt (Kaufmann et al., 1993). Die Untersuchungen erfolgten mittels *Western Blot* unter der Verwendung der UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie der Kontroll-ZL HBLAK als Zellmodelle. In Analogie zu 4.2.1 wurde die Effizienz des HDAC-*Knockdown* anhand von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe validiert.

Die Abbildung zeigt, dass es zu keiner deutlichen Veränderung der Signalintensität von BCL-2 und BCL-XL in den UCCs kommt, nachdem diese mit Romidepsin und Quisinostat behandelt wurden. Alleinig hinsichtlich des Zelltodmakers *cleaved* PARP treten Unterschiede auf. Dieser wird besonders stark in UM-UC-3 nach der Behandlung mit HDACis exprimiert. Insgesamt fällt auf, dass die Bandenintensität von *cleaved* PARP in den drei betrachteten ZL nach Verwendung von Romidepsin eine stärkere Ausprägung zeigt als nach dem Gebrauch von Quisinostat. Dies deutet darauf hin, dass Romidepsin mehr Apoptose induziert als Quisinostat.

Um die Effekte einer HDAC-Inhibition mit denen eines *Knockdowns* auf Proteinebene vergleichen zu können, wurde das oben dargestellte Untersuchungsverfahren nochmals unter Verwendung von HDAC-siRNA durchgeführt.

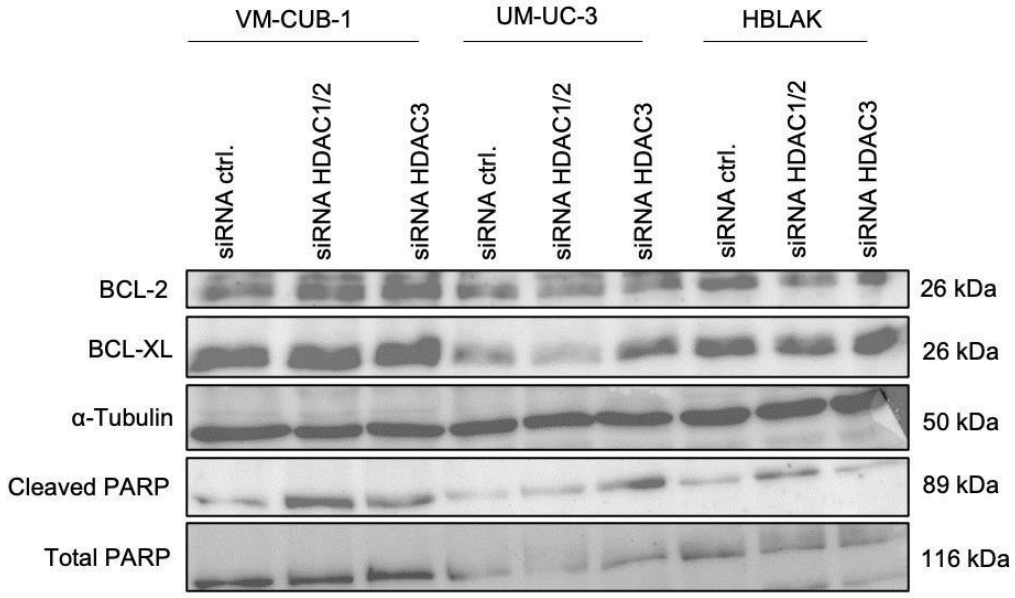


Abb. 20: Nachweis von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL sowie von *cleaved* PARP auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit HDAC-siRNA. Der Nachweis erfolgte mittels *Western Blot*. Als Ladungskontrollen fungierten α-Tubulin (50 kDa) und total PARP (116 kDa).

Die Abbildung verdeutlicht, dass der antiapoptotische Faktor BCL-2 sowohl in der siRNA-Kontrolle als auch nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA gebildet wird. Die Abundanz von BCL-XL hingegen wird durch einen siRNA induzierten HDAC-*Knockdown* kaum verändert. In der UCC UM-UC-3 sowie in der Kontroll-ZL HBLAK resultiert eine Behandlung mit siRNA, die gegen HDAC1 und 2 gerichtet ist, in einer leichten Reduktion des BCL-XL-Proteinniveaus. *Cleaved* PARP ist in der siRNA-Kontrolle nur geringfügig nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass in unbehandelten Zellen nur wenig Apoptose stattfindet. In VM-CUB-1 und HBLAK hat der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 einen Anstieg von *cleaved* PARP und damit eine verstärkte Apoptose zur Folge. In UM-UC-3 führt der *Knockdown* von HDAC3 zu der höchsten *cleaved* PARP-Abundanz.

Alles in allem zeigt sich, dass Romidepsin und Quisinostat die Bildung von BCL-2 und BCL-XL in UCCs auf Proteinebene nur wenig regulieren. Der HDAC-*Knockdown* übt ebenfalls nur marginale Effekte aus, wobei diese dennoch stärker ausfallen als nach der Behandlung mit HDACis. Romidepsin scheint die Apoptose stärker zu induzieren als Quisinostat, was sich anhand des vermehrten Nachweises von *cleaved* PARP visualisieren lässt.

4.2.3 HDACis verändern die Bildung verschiedenster pro- und antiapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene

HDACis sind dafür bekannt, im UC nicht nur die Expression von Apoptosefaktoren der BCL-2-Familie oder der IAPs zu modifizieren, sondern auch verschiedene weitere Prozesse zu beeinflussen, zu denen der Zellzyklus oder die Zellteilung gehören (Kaletsch et al., 2018). Zur detaillierten Erfassung der Veränderungen, die aus einer Behandlung mit Klasse I HDACis resultieren, wurde die UCC UM-UC-3 repräsentativ mit Romidepsin und Quisinostat behandelt und im Anschluss ein Apoptose *Array* durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Zytostatikum Etoposid verwendet, als Lösungskontrolle fungierte DMSO. Gemessen wurde die Abundanz von 14 primär proapoptotisch wirkenden Faktoren sowie die von 17 vorrangig antiapoptotischen Mediatoren auf Proteinebene. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

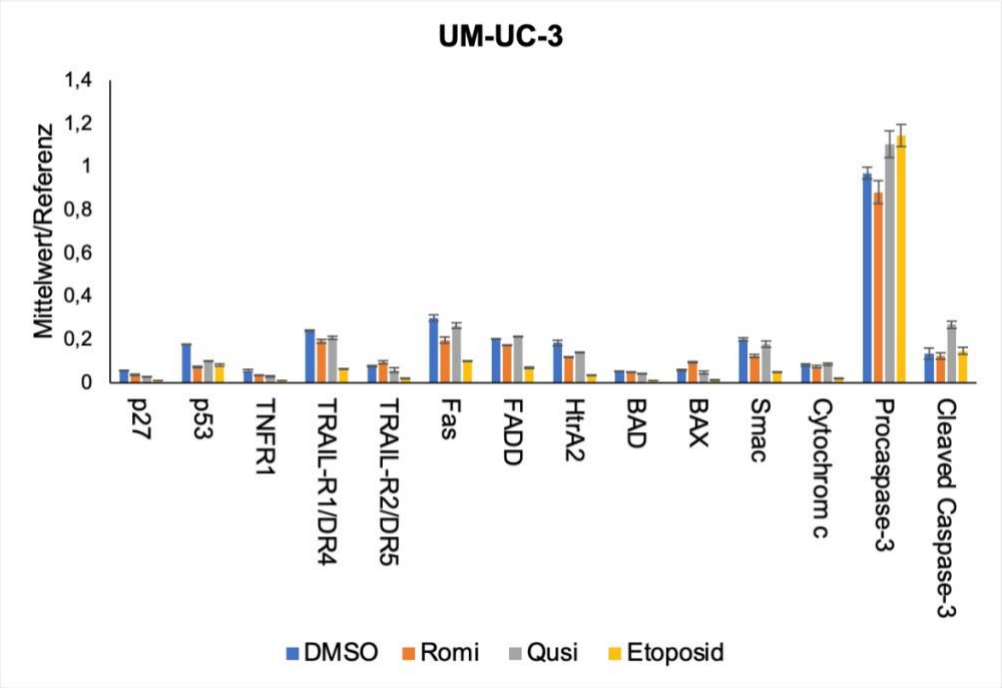


Abb. 21: Nachweis verschiedener proapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene in UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit dem Zytostatikum Etoposid. Der Nachweis erfolgte durch einen Apoptose *Array*. Als Lösungskontrolle fungierte DMSO. Die Abszisse zeigt die proapoptotisch wirksamen Faktoren, die Ordinate den Mittelwert/Referenz.

Abbildung 21 zeigt, dass die analysierten proapoptotischen Faktoren in der Lösungskontrolle unterschiedliche Proteinlevel aufweisen. Während manche Faktoren, wie z.B. p27, TNF-Rezeptor 1 oder BAD nur schwach detektierbar sind, werden andere, darunter Procaspase-3, vermehrt gebildet. Auffallend ist, dass auch Etoposid, das als Positivkontrolle dient, zu keinem nennenswerten Zuwachs der Menge proapoptotischer Faktoren auf Proteinebene führt. Eine Ausnahme stellt lediglich Procaspase-3 dar.

Eine Behandlung mit Romidespin führt in UM-UC-3 zu einer geringeren Abundanz der meisten proapoptotischen Faktoren. Alleinig die Proteinlevel von TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 2 (TRAIL-R2) und BAX werden nach der Intervention mit Romidepsin gesteigert. Anhand von Abbildung 21 wird deutlich, dass Romidepsin nicht nur die Abundanz von proapoptotischen Faktoren aus der BCL-2-Familie modifiziert, sondern auch die weiterer krebsunterdrückender Faktoren, die z.B. am Zellyzklus beteiligt sind oder der Gruppe der Caspasen bzw. den Apoptoserezeptoren zuzuordnen sind.

Analog zu Romidepsin führt auch Quisinostat in UM-UC-3 zu einer geringeren Abundanz der meisten proapoptotisch wirkenden Faktoren. Ausnahmen stellen FADD, Cytochrom c, Pro-Caspase 3 und *cleaved* Caspase 3 dar. Die Mengenunterschiede, die aus einer Behandlung mit Quisinostat resultieren, fallen jedoch insgesamt eher gering aus, abgesehen von den Proteinleveln von Pro-Caspase 3 sowie *cleaved* Caspase 3.

Wie oben dargelegt, resultiert die Verwendung von Etoposid ebenfalls in einer geringeren Abundanz zahlreicher proapoptotischer Faktoren. Vergleicht man die Wirkung von HDACis mit der von Etoposid, so fällt auf, dass letztere Substanz eine ausgeprägtere Reduktion der Proteinlevel bewirkt, obwohl es sich bei Etoposid um die Positivkontrolle handelt und dementsprechend mit einem gegenteiligen Effekt zu rechnen gewesen wäre. Mögliche Gründe für die überraschende Beobachtung könnten z.B. in der Aktivierung von DNA-Reparaturprozessen infolge der Topoisomerase-II-Hemmung oder in der Autoregulation der Tumorzellen mit Reduktion der Abundanz proapoptotischer Faktoren zu finden sein. Da jedoch nahezu alle proapoptotischen Proteine gegenüber der DMSO-Kontrolle vermindert detektierbar sind, ist ein Auswertungs-Artefakt nicht vollkommen auszuschließen.

Abbildung 22 zeigt die Proteinlevel diverser vorrangig antiapoptotisch wirkender Faktoren nach einer Behandlung mit HDACis und Etoposid.

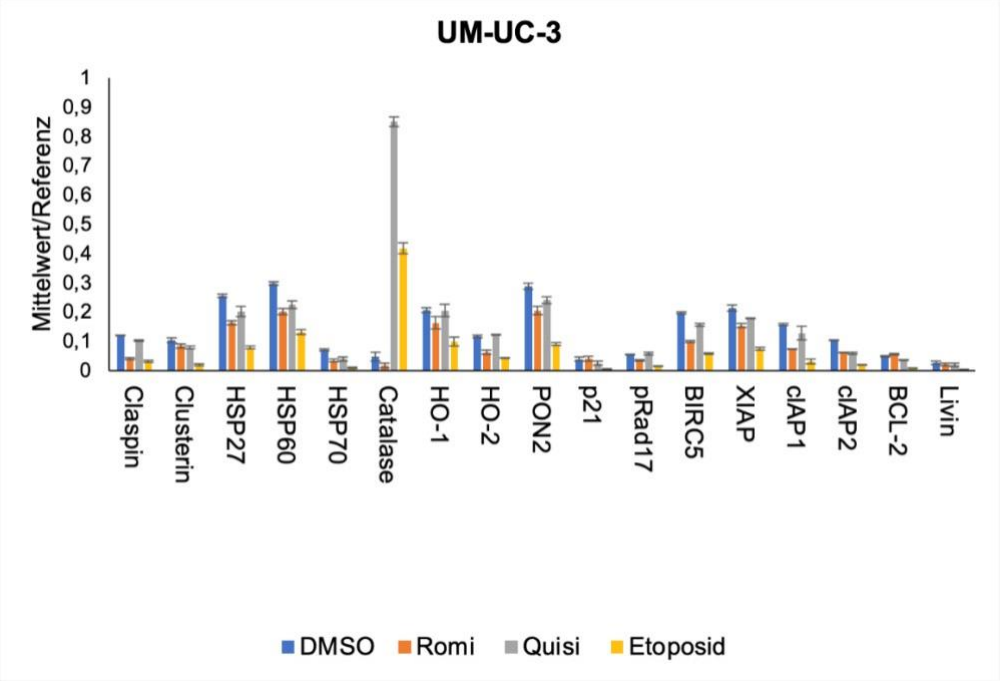


Abb. 22: Nachweis verschiedener antiapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene in UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit dem Zytostatikum Etoposid. Der Nachweis erfolgte durch einen Apoptose *Array*. Als Lösungskontrolle fungierte DMSO. Die Abszisse zeigt die untersuchten antiapoptotisch wirkenden Faktoren. Die Ordinate zeigt den Mittelwert/Referenz.

In Übereinstimmung mit den proapoptotischen Faktoren variiert auch die Abundanz der mehrheitlich antiapoptotisch wirkenden Modulatoren in der Lösungskontrolle. Das Wort „mehrheitlich“ gilt es an dieser Stelle zu betonen, denn unter den antiapoptotischen Faktoren finden sich auch solche, die proapoptotische Aspekte aufweisen, wie z.B. die Catalase (Glorieux & Calderon, 2024) oder Clusterin (Cunin et al., 2016; Zhang et al., 2005). Aus didaktischen Gründen wurden sie jedoch den antiapoptotischen Faktoren zugeordnet.

Die Versorgung mit Romidepsin führt in UM-UC-3 zu einer reduzierten Abundanz aller untersuchten antiapoptotischen Faktoren mit Ausnahme von BCL-2 und p21, deren Proteinlevel jedoch nur geringfügig gesteigert werden.

Quisinostat zeigt ähnliche Effekte wie Romidepsin, jedoch mit einigen Unterschieden in der Abundanz bestimmter Faktoren. So werden Catalase, Hämoxygenase (HO) 1 und 2 sowie phosphoryliertes Rad 17 vermehrt gebildet. Während Quisinostat das Proteinlevel der Catalase um das 10-fache steigert, wird die Bildung der anderen Faktoren nur marginal erhöht. Im direkten Vergleich von Romidepsin und Quisinostat fällt auf, dass Quisinostat die Abundanz antiapoptotischer Faktoren auf Proteinebene überwiegend stärker reduziert als Romidepsin.

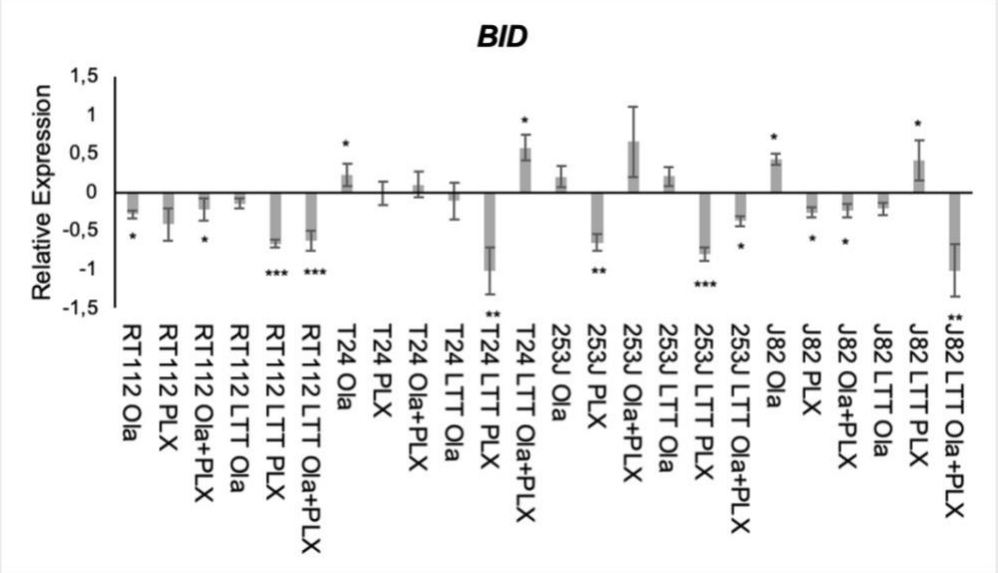
Die Behandlung von UM-UC-3 mit Etoposid führt zu einer allgemeinen Abnahme der Abundanz aller betrachteten Faktoren, mit Ausnahme der Catalase. Dabei steigert Etoposid die Abundanz der Catalase jedoch weniger stark als Quisinostat. Wie schon bei den proapoptotischen Faktoren beobachtet, führt Etoposid stärkere Unterschiede der Proteinniveaus herbei als die HDACis. Eine Rangfolge der Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz in Bezug auf die Veränderung der Abundanzen würde dementsprechend wie folgt aussehen: Etoposid > Romidepsin > Quisinostat.

4.2.4 Die Kombinationsbehandlung mit einem PARPi und einem BETi verändert die Genexpression in UCCs und LTTs stärker als eine Einzelbehandlung

PARPis sind Substanzen, die die Reparatur von DNA-Schäden verhindern und im UC in Kombination mit EPIis eine synergistische Wirkung entfalten (Thy et al., 2021; Criscuolo et al., 2019). Diese ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Kombinationsbehandlung die Expression von Apoptosefaktoren stärker verändert als die Einzeltherapie.

Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurden verschiedene UCCs und ihre korrespondierenden LTTs mit dem PARPi Olaparib sowie dem BETi PLX51107 behandelt. Die Behandlung wurde sowohl einzeln als auch in Kombination durchgeführt. Anschließend wurde mit Hilfe der qRT-PCR die Expression von sechs pro- und antiapoptotischen Faktoren gemessen.

Abbildung 23 stellt die relative Expression der proapoptotischen Faktoren dar.



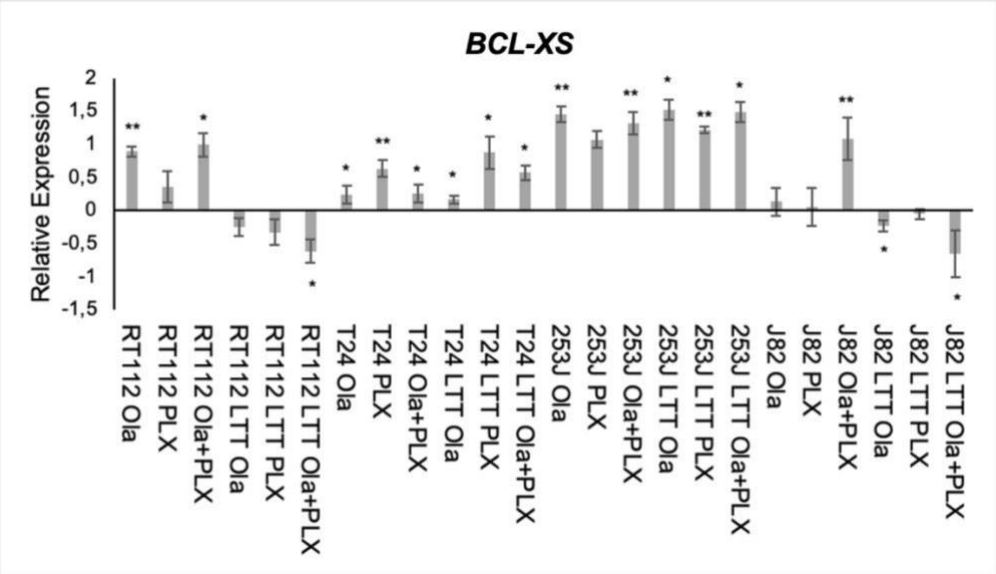


Abb. 23: Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von proapoptotischen Faktoren in UCCs und korrespondierenden LTTs. Dargestellt sind die Faktoren *BID* und *BCL-XS*. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, führt sowohl die Monotherapie mit Olaparib oder PLX51107 als auch die kombinierte Behandlung mit beiden Substanzen zu Genexpressionsveränderungen von proapoptotischen Faktoren in UCCs und LTTs. Die induzierten Veränderungen sind zelllinien- und faktorabhängig und führen nicht nur zu einer stärkeren Bildung proapoptotischer Faktoren, sondern auch zu einer geringeren Produktion dieser.

Die Medikation mit Olaparib resultiert in einer verstärkten, aber auch reduzierten Expression von *BID* und *BCL-XS*, wobei die herbeigeführten Expressionsveränderungen mehrheitlich gering ausfallen. Interessanterweise scheinen die in der Arbeit untersuchten LTTs unempfindlicher gegenüber Olaparib zu sein als ihre korrespondierenden UCCs, was sich in geringer ausgeprägten Expressionsveränderungen proapoptotischer Faktoren zeigt.

Anders als Olaparib führt PLX51107 in den meisten UCCs und LTTs eine geringere *BID*-Expression herbei, während der Effekt auf die Expression von *BCL-XS* uneinheitlicher ist. Im Vergleich zu Olaparib induziert PLX51107 stärkere Genexpressionsveränderungen von proapoptotischen Faktoren. Des Weiteren reagieren LTTs sensibler auf PLX51107 als auf den PARPi.

Die kombinierte Behandlung mit Olaparib und PLX51107 kann dazu führen, dass die Expression proapoptotischer Faktoren weniger stark gedrosselt wird als infolge einer Monotherapie. Dies würde dazu führen, dass UCCs und LTTs stärker zur Apoptose neigen. Gleichzeitig kann eine Kombinationsbehandlung aber auch zu einer stärkeren Induktion proapoptotischer Faktor führen als die Einzelintervention, was antiapoptotische Tendenzen zur Folge hätte.

Ob sich in Bezug auf die antiapoptotischen Faktoren ein ähnliches Bild zeichnen lässt, geben die Abbildung 24 und 25 preis. Aus didaktischen Gründen erfolgt die Visualisierung der Ergebnisse in zwei getrennten Abbildungen, die schriftliche Erläuterung jedoch überwiegend in einem zusammengehörenden Text.

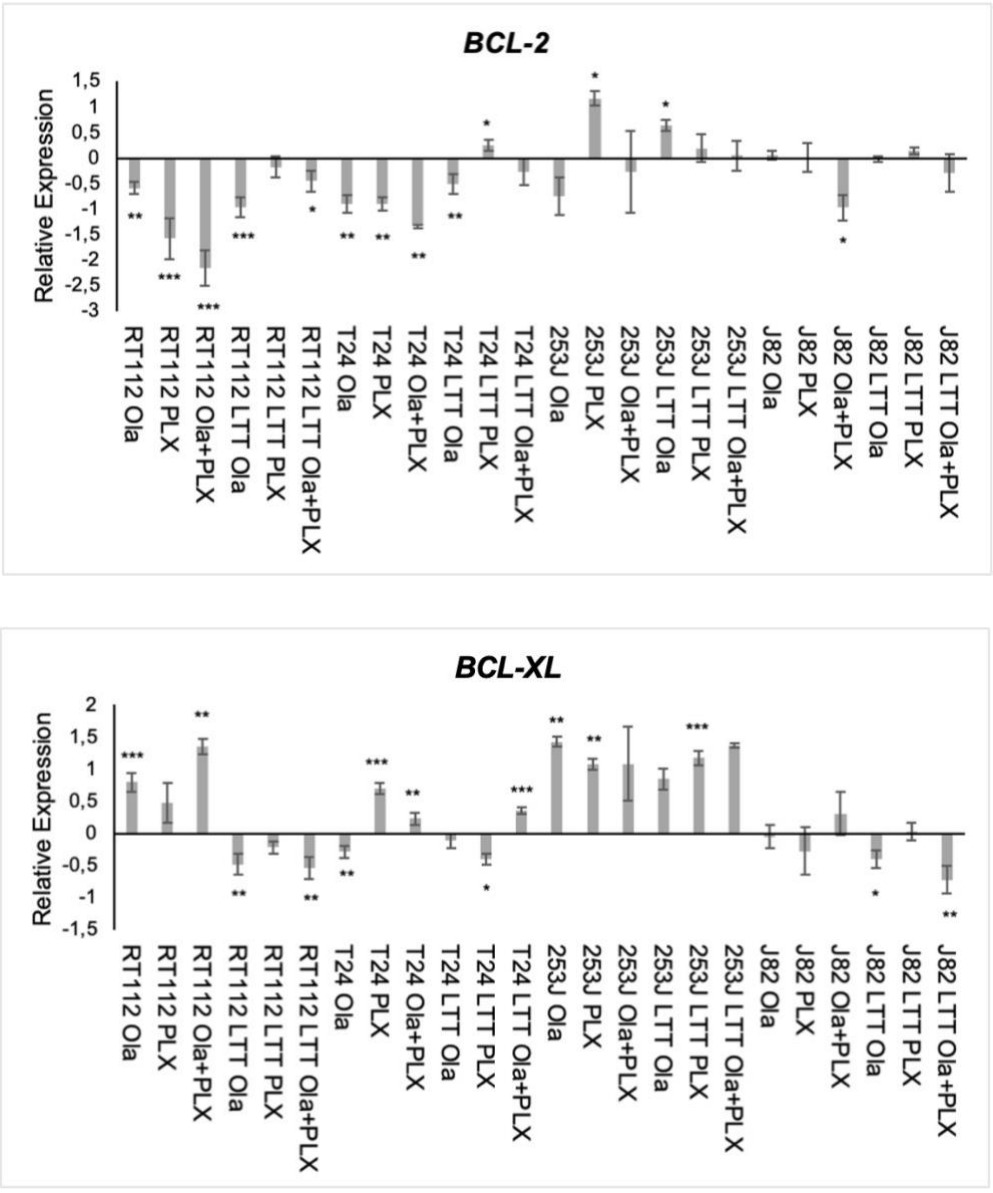


Abb. 24: Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von antiapoptotischem *BCL-2* und *BCL-XL* in UCCs und korrespondierenden LTTs. Der Mittelwert

wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

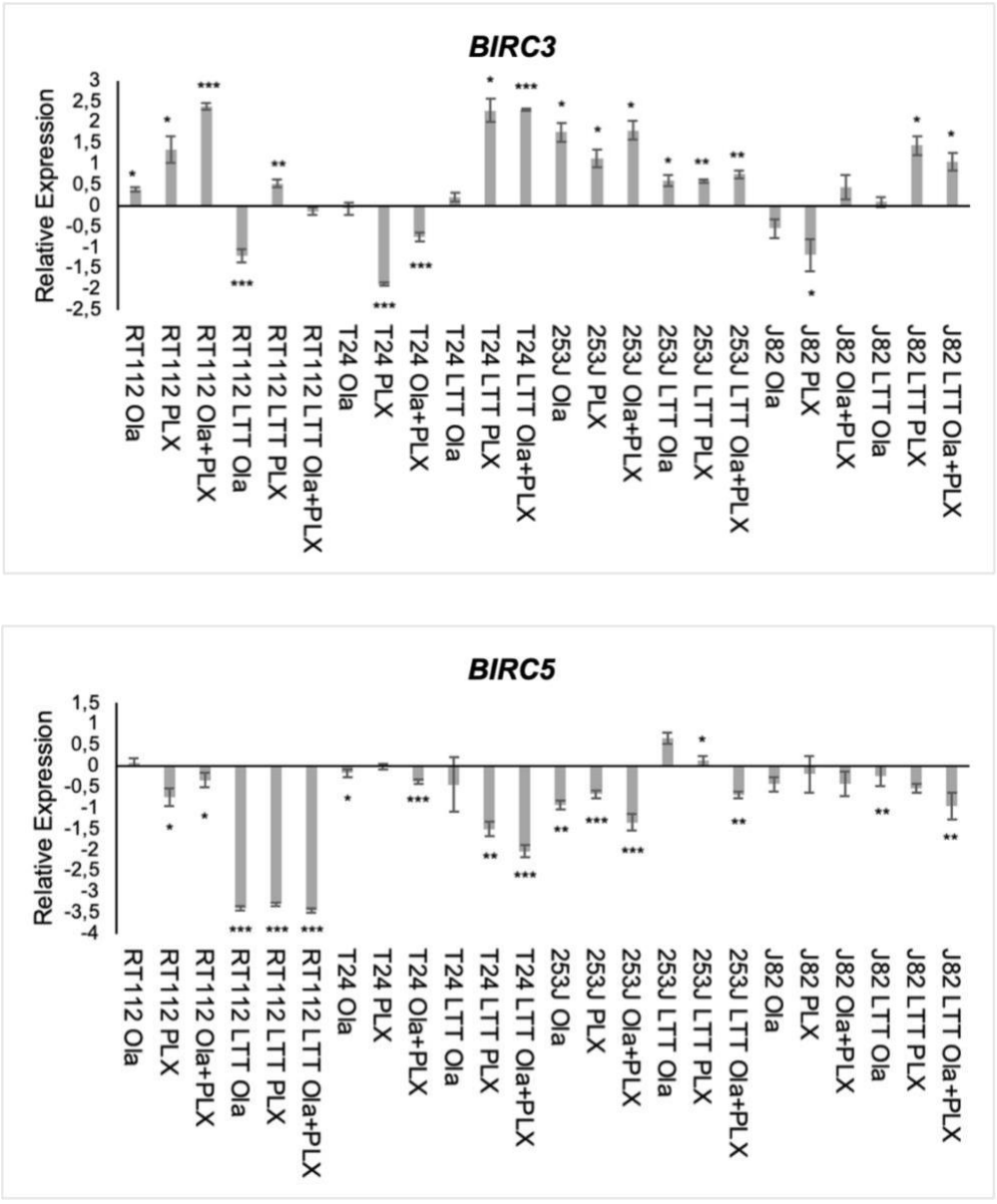


Abb. 25: Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von antiapoptotischem *BIRC3* und *BIRC5* in UCCs und korrespondierenden LTTs. Der Mittelwert wurde zunächst mit der Expression des *housekeeping* Gens TBP ins Verhältnis gesetzt, um die relative Genexpression zu berechnen. Im Anschluss wurde die finale Darstellung in Form eines log2 *fold changes* mit Standardabweichungen vorgenommen. Die Datenerhebung erfolgte in Triplikaten normalisiert gegen eine DMSO-Kontrolle. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte Substanz. Die Ordinate stellt die relative Genexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dar (entspricht einem Wert von 0). Signifikante Unterschiede sind mit * markiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Vergleichbar mit den Kernaussagen aus Abbildung 23 verdeutlichen auch die Darstellungen 24 und 25, dass Expressionsunterschiede antiapoptotischer Faktoren sowohl durch eine Einzelbehandlung mit Olaparib oder PLX51107 sowie durch eine Kombinationstherapie induziert werden können. Ein weiteres Mal sind die hervorgerufenen Veränderungen zelllinien- und faktorabhängig.

Der PARPi Olaparib führt sowohl zu einer stärkeren als auch zu einer reduzierten Expression von antiapoptotischen Faktoren. Im Gros der untersuchten UCCs werden *BCL-2* und *BIRC5* nach einer Behandlung mit Olaparib vermindert exprimiert. Im Falle von *BIRC3* und *BCL-XL* ist die Reaktion der ZL ausgewogener. Auffälligerweise sprechen die verschiedenen ZL unterschiedlich stark auf Olaparib an. RT112 LTT beispielsweise reagiert auf eine Behandlung mit dieser Substanz mit einer deutlichen Reduktion der *BIRC5*-Expression.

Im Vergleich zu Olaparib führt PLX51107 stärkere Expressionsveränderungen von antiapoptotischen Faktoren herbei. Dabei handelt es sich um eine Beobachtung, die bereits im Zusammenhang mit den proapoptotischen Faktoren gemacht wurde. Wenn Olaparib die Expression eines bestimmten antiapoptotischen Faktors erhöht, geschieht dies in der Regel auch durch PLX51107, jedoch in einem stärkeren Ausmaß. Ein ähnliches Muster zeigt sich bei der reduzierten Expression antiapoptotischer Faktoren.

Die kombinierte Behandlung mit Olaparib und PLX51107 kann dazu führen, dass die Expression antiapoptotischer Faktoren stärker gemildert wird als nach einer Einzelbehandlung. Gleichzeitig kann es aber auch dazu kommen, dass eine Kombinationsbehandlung die Expression antiapoptotischer Faktoren nicht verändert oder sogar stärker senkt, als es die Einzelbehandlung tut.

Alles in allem führt eine Kombinationsbehandlung von Olaparib mit PLX51107 zu einer verringerten Expression von antiapoptotischen Faktoren und einer gesteigerten Expression von proapoptotischen Faktoren. Eine Kombinationsbehandlung wirkt überwiegend potenter als eine Einzelbehandlung.

4.3 Die Hemmung und der *Knockdown* von HDACs führen zu Zelltod in Form einer Mischung aus Apoptose und Nekrose

4.3.1 HDACis führen im UC zu Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose

Die vorab präsentierten Abbildungen haben gezeigt, dass HDACis die Expression verschiedenster pro- und antiapoptotischer Faktoren verändern. Im Weiteren sollte untersucht werden, in welcher Zelltodform diese Veränderungen münden.

Dazu wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit Romidepsin und Quisinostat behandelt. Im Anschluss wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt und so die Zelltodform beurteilt.

Die Ergebnisse sind den Abbildungen 26 bis 28 zu entnehmen.

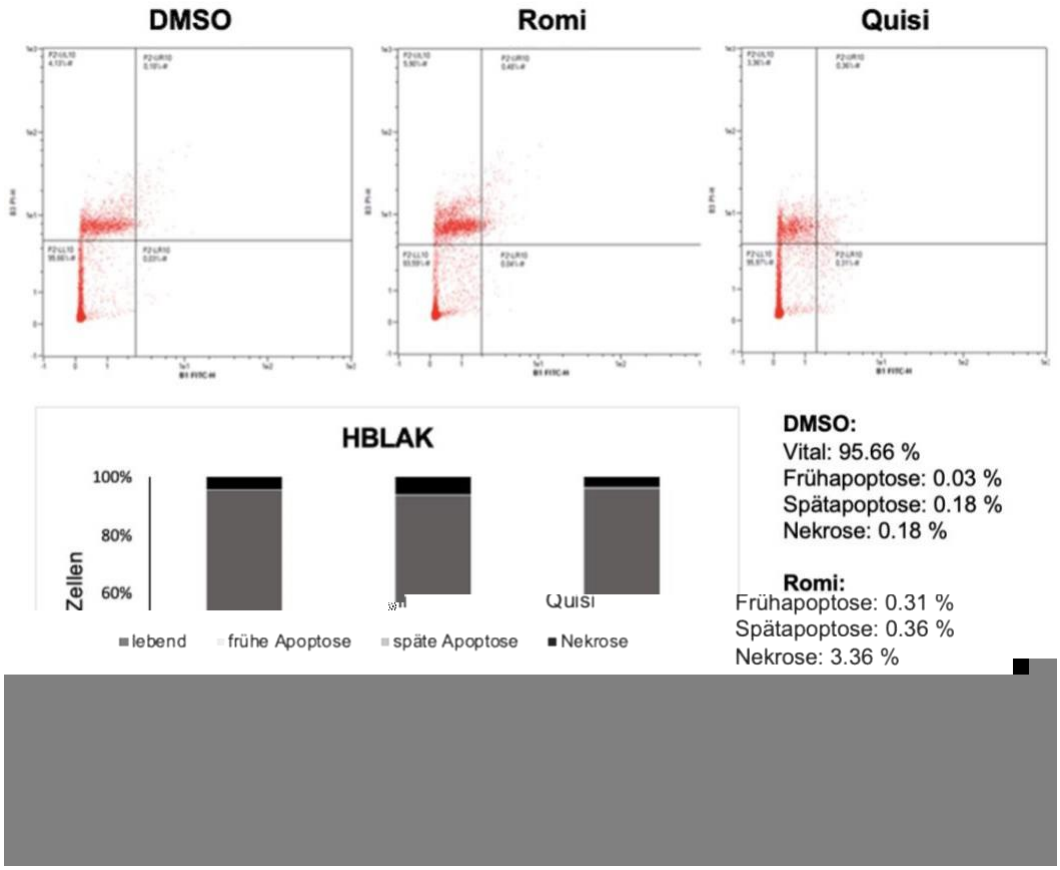


Abb. 26: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat. Die Lösungskontrolle ist DMSO. In der oberen Reihe werden jeweils die Rohdaten dargestellt. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

Abbildung 26 zeigt, dass die HDACis Romidepsin und Quisinostat in der Kontroll-ZL HBLAK wenig Zelltod induzieren. Nach einer Behandlung mit Romidepsin ist der Großteil der Zellen (93,59 %) lebendig. Nur ein kleiner Anteil geht durch Nekrose (6 %) oder Apoptose (0,5 %) zugrunde. Quisinostat wirkt im Vergleich zu Romidepsin weniger potent. So bleiben nach einer Behandlung rund 96 % der behandelten Zellen vital, was mit dem Wert in der DMSO-Kontrolle vergleichbar ist.

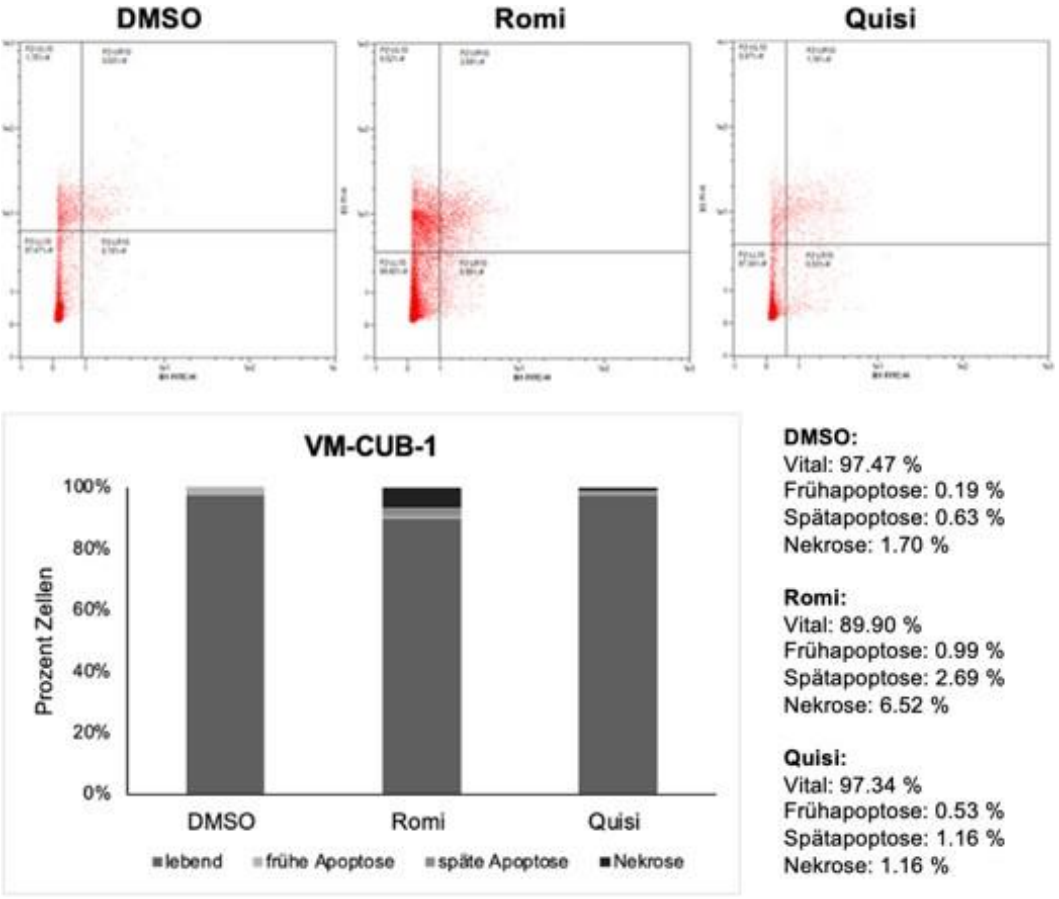


Abb. 27: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC VM-CUB-1 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat. Die Lösungskontrolle ist DMSO. In der oberen Reihe werden jeweils die Rohdaten dargestellt. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

Romidepsin wirkt in der UCC VM-CUB-1 etwas potenter als in HBLAK. Der Großteil der Zellen bleibt aber auch hier lebendig. Eine Behandlung mit Romidepsin führt in VM-CUB-1 zu Zelltod in Form einer Mischung aus Apoptose und Nekrose. Dabei überwiegt der nekrotische Anteil (6,5 %) die apoptotische Beteiligung (3,4 %). Die meisten apoptotischen Zellen befinden sich in der Spätapoptose (2,7 %). Analog zu den Beobachtungen in HBLAK, löst Quisinostat auch in VM-CUB-1 kaum Zelltod aus. Die Wirkung von Quisinostat ist erneut mit dem Effekt der DMSO-Kontrolle vergleichbar.

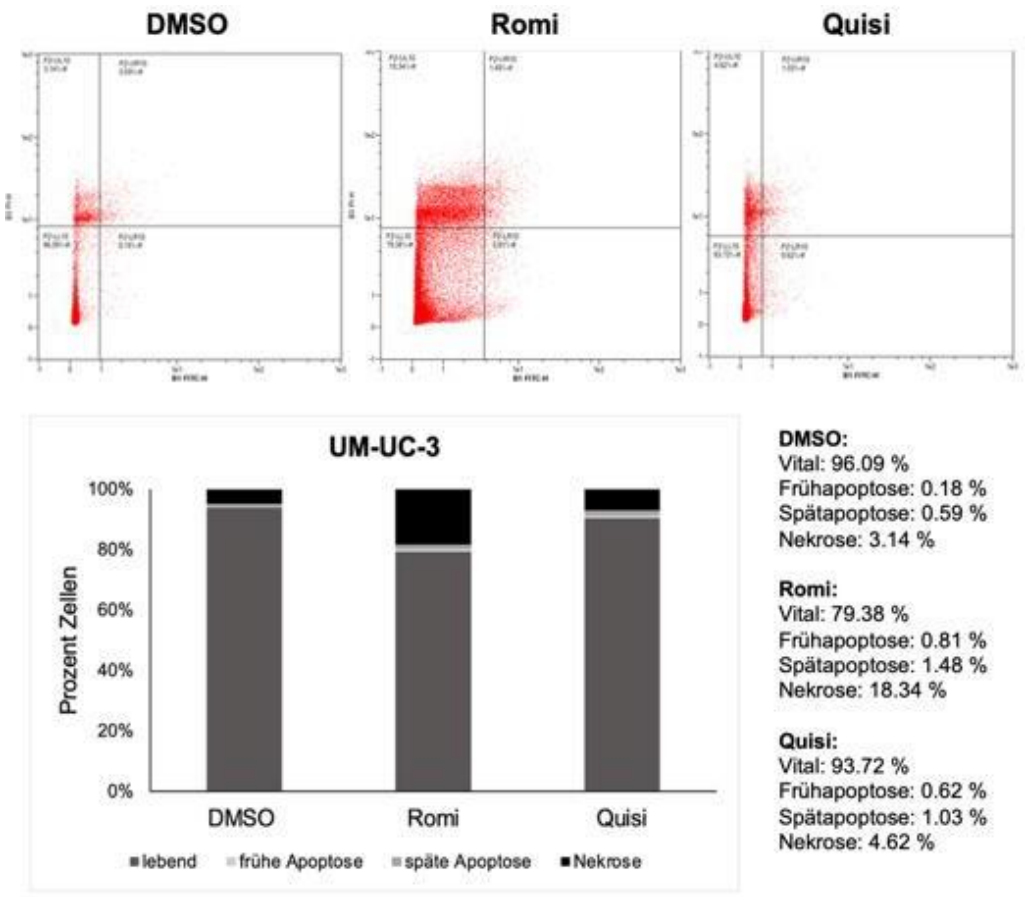


Abb. 28: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat. Die Lösungskontrolle ist DMSO. In der oberen Reihe werden jeweils die Rohdaten dargestellt. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

Romidepsin wirkt in UM-UC-3 potenter Zelltod induzierend als in der UCC VM-CUB-1 oder der Kontroll-ZL HBLAK. Nach einer Behandlung mit Romidepsin sind rund 18 % der Zellen durch Nekrose zugrunde gegangen, lediglich 3 % durch apoptotische Prozesse. Die Wirkung von Quisinostat ist zum wiederholten Mal gering. Quisinostat führt in UM-UC-3 zu einer Mischung aus nekrotischem (4,6 %) und apoptotischem (1,6 %) Zelltod.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Romidepsin in den untersuchten UCCs und in HBLAK potenter wirkt als Quisinostat. Nach einer Behandlung mit Romidepsin sterben die Zellen durch eine Mischung aus Apoptose und Nekrose. Romidepsin weist in der Kontroll-ZL HBLAK nur geringe Effekte auf, während es in der UCC UM-UC-3 am potentesten den Zelltod induziert. Die zytotoxische Wirkung von Quisinostat ist überwiegend mit der der DMSO-Kontrolle vergleichbar.

4.3.2 Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 induziert potenter den Zelltod als ein alleiniger *Knockdown*

Nachdem eine eingehende Exploration der durch HDACis induzierten Zelltodformen stattgefunden hat, bestand im Weiteren die Frage, ob ein siRNA vermittelter HDAC-*Knockdown* zu ähnlichen Resultaten führen würde. Um dies zu prüfen, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit HDAC-siRNA behandelt, was in dem *Knockdown* von HDAC1, 2 oder 3 resultierte. Zusätzlich erfolgte der kombinierte *Knockdown* von HDAC 1 und 2. Im Anschluss an die Behandlung wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse sich in den Abbildungen 29 bis 31 wiederfinden.

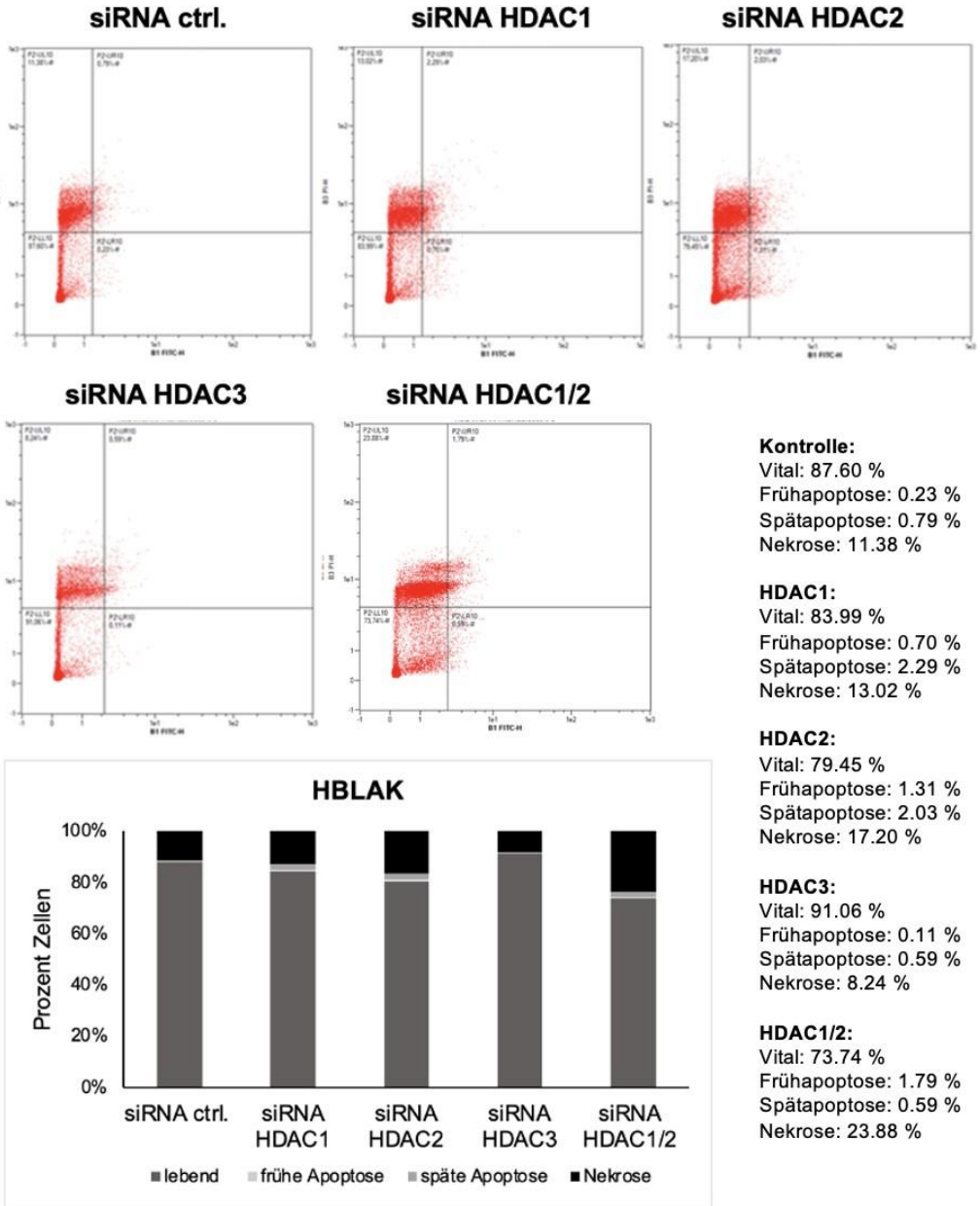


Abb. 29: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDAC-siRNA. Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC 1, 2 oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Als Kontrolle diente siRNA ctrl. Die obere Reihe zeigt jeweils die Rohdaten. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

Abbildung 29 zeigt, dass ein HDAC-*Knockdown* in der Kontroll-ZL HBLAK zum Zelltod führt. In Abhängigkeit von der HDAC, die von dem *Knockdown* betroffen ist, wird unterschiedlich häufig der Zelltod ausgelöst. So führen der *Knockdown* von HDAC2 sowie der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 am stärksten den Zelltod herbei. Dabei gehen die Zellen vorrangig durch Nekrose und zu einem geringen Anteil auch apoptotisch zugrunde. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, führt ein HDAC-*Knockdown* in der Kontroll-ZL HBLAK zu keiner wesentlich höheren Zelltodrate als in der unbehandelten Kontrolle.

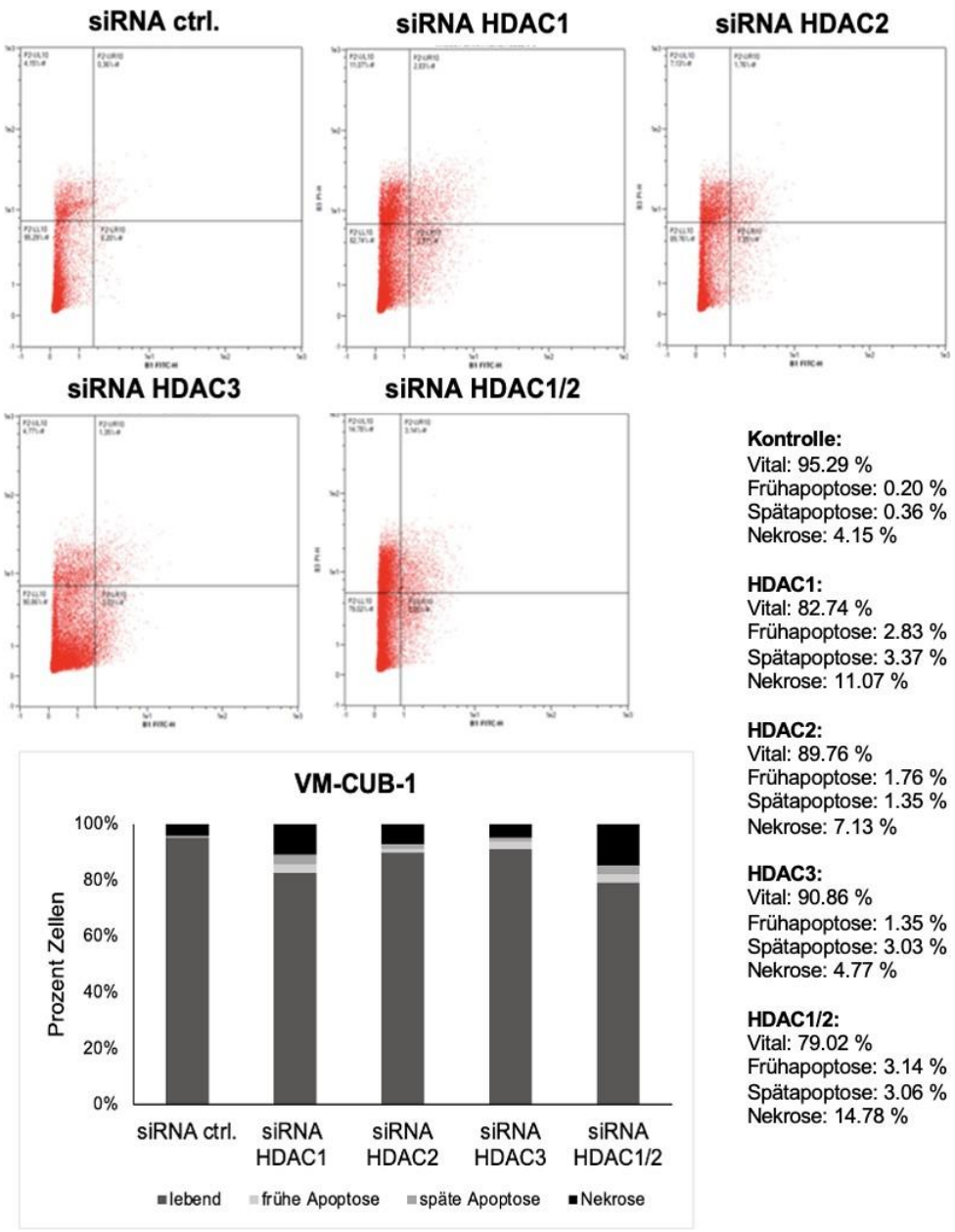


Abb. 30: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC VM-CUB-1 nach Behandlung mit den HDAC-siRNA. Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC 1, 2 oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Als Kontrolle diente siRNA ctrl. Die obere Reihe zeigt jeweils die Rohdaten. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

Ein HDAC-*Knockdown* führt auch in der UCC VM-CUB-1 zu Zelltod. Hier wirken der *Knockdown* von HDAC1 und der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 am stärksten. Die geringste Zelltod-induzierende Wirkung hat der *Knockdown* von HDAC3. Der gleichzeitige *Knockdown* von HDAC1 und HDAC2 führt vorrangig zur Nekrose, ein Teil

der Zellen stirbt jedoch auch durch Apoptose. Dabei befindet sich eine vergleichbare Anzahl an Zellen in der Früh- und Spätapoptose.

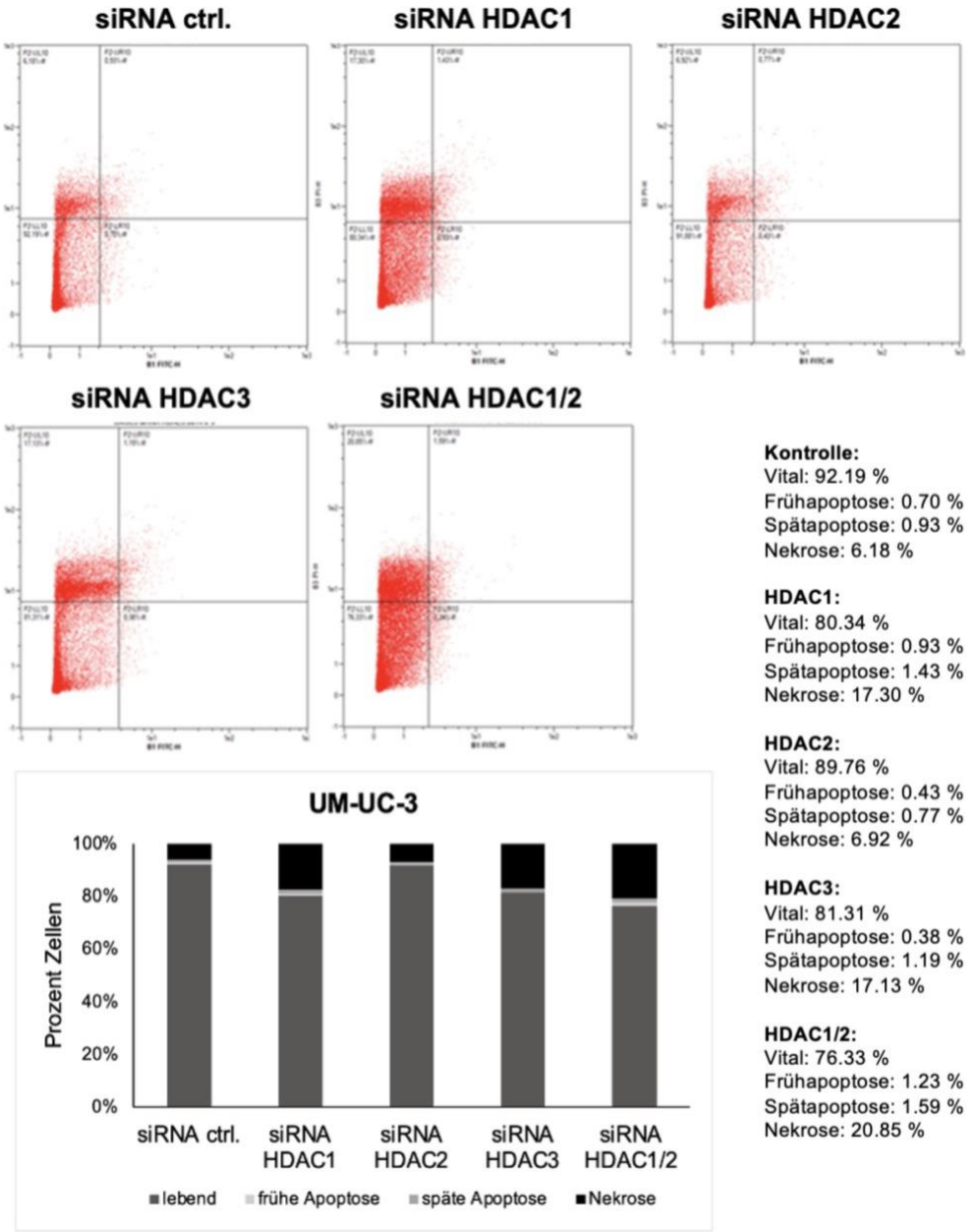


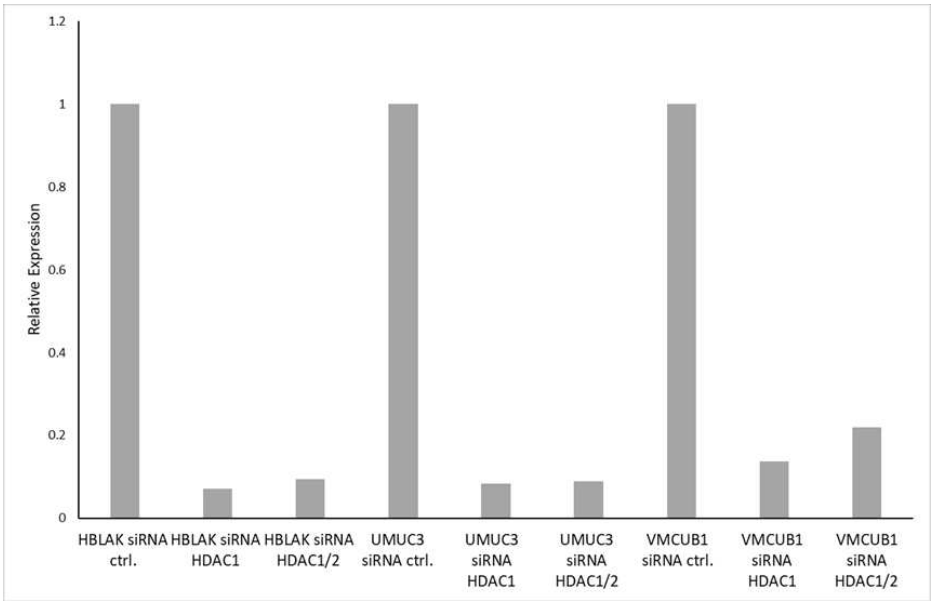
Abb. 31: Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDAC-siRNA. Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC 1, 2 oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Als Kontrolle diente siRNA ctrl. Die obere Reihe zeigt jeweils die Rohdaten. Im Uhrzeigersinn ausgehend von links oben finden sich: Nekrose, Spätapoptose, Frühapoptose, vitale Zellen. Nach dem *Gating* wurde ein Balkendiagramm angefertigt. Die Abszisse zeigt das Medikament, mit dem die Zellen behandelt wurden. Die Ordinate zeigt den Anteil der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der Zelltodform. Es handelt sich um eine repräsentative Darstellung von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die genauen Prozentangaben sind neben dem Balkendiagramm zu finden.

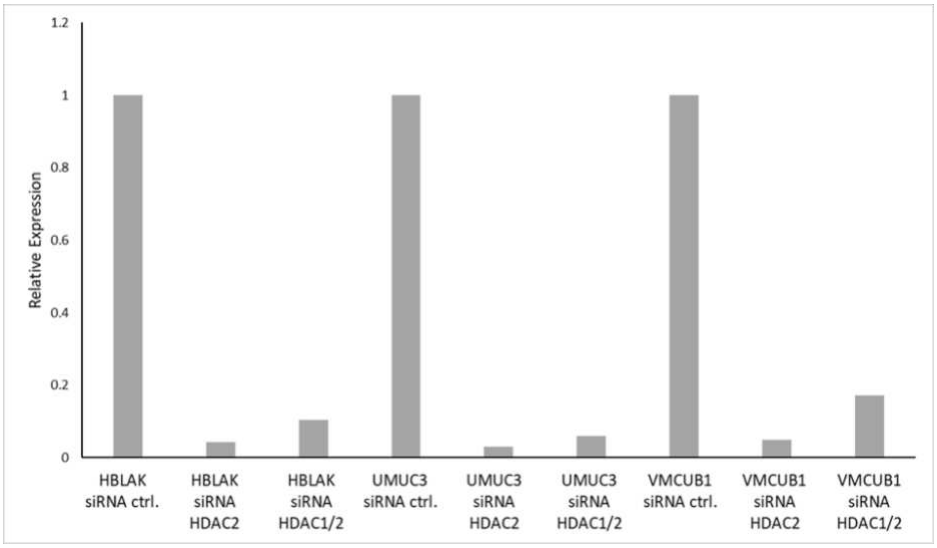
Analog zu HBLAK und VM-CUB-1, wirkt der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 auch in UM-UC-3 am effektivsten zelltodfördernd. Der Zelltod ist abermals gekennzeichnet

durch eine Mischung aus Nekrose und Apoptose, wobei die meisten Zellen nekrotisch untergehen. Am wenigsten wirksam in Bezug auf den Zelltod ist der *Knockdown* von HDAC2.

Der kombinierte *Knockdown* von HDAC 1 und HDAC2 führt in allen betrachteten ZL am potentesten zu Zelltod. UCCs scheinen auf einen HDAC-*Knockdown* sensitiver zu reagieren als es die Kontroll-ZL HBLAK tut. Dies unterstreicht die Bedeutung des Zusammenspiels von HDAC1 und 2 für die Entstehung und das Wachstum des UC.

Dass der *Knockdown* zuvor genannter HDACs geglückt ist und die aufgezeigten Daten damit aussagekräftig sind, lässt sich anhand von Abbildung 32 beweisen.





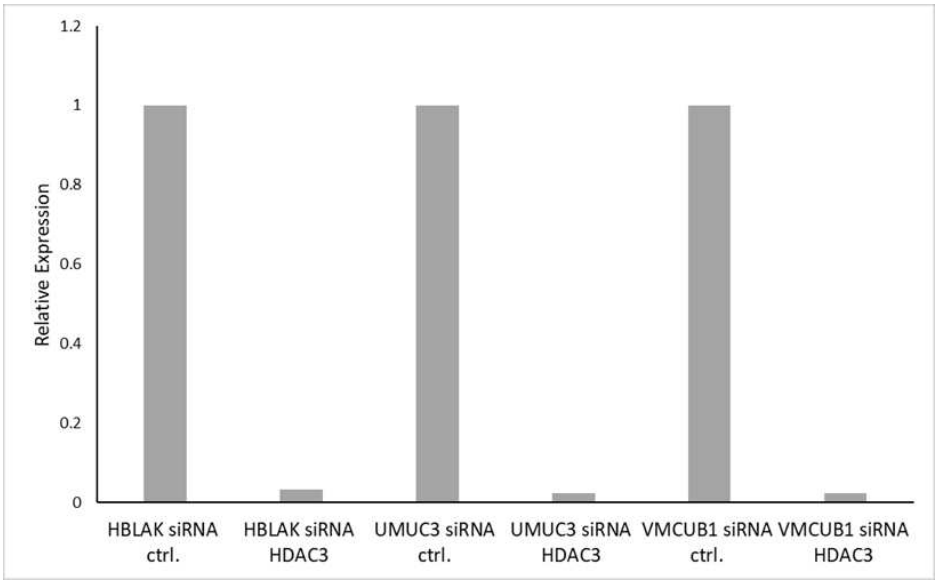


Abb. 32: Nachweis über den erfolgreichen Einzel-*Knockdown* von HDAC1, 2 und 3 sowie über den kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 mittels HDAC-siRNA in der Kontroll-ZL HBLAK sowie in den UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3. Die oberste Abbildung zeigt den Einzel-*Knockdown* von HDAC1 sowie den kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Die mittlere Abbildung geht auf den Einzel-*Knockdown* von HDAC2 und den kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 ein. Die unterste Abbildung nimmt den *Knockdown* von HDAC3 in den Fokus. Die Abszisse zeigt die betrachtete ZL sowie die verabreichte HDAC-siRNA. Die Ordinate stellt die relative Genexpression dar. Der besseren Darstellung halber wurde auf die Bezeichnung von Standardabweichungen verzichtet.

4.3.3 Die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ist an der Zelltodinduktion im UC beteiligt

Wie im vorherigen Textabschnitt erläutert, führte der siRNA vermittelte HDAC-*Knockdown* im UC zum Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose. Da die Bildung von DSBs in Apoptose resultieren kann, galt es zu untersuchen, ob der festgestellte Zelltod in HBLAK und UCCs durch die Induktion von DSBs ausgelöst wurde.

Um dem nachzugehen, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit HDAC-siRNA behandelt, die zu einem *Knockdown* von HDAC1, 2 oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 führte. Im Anschluss wurden die ZL mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Mithilfe von DAPI konnten die Zellkerne dargestellt werden. Zur Identifizierung von DSBs wurde yH2AX verwendet.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 33 bis 35 dargestellt.

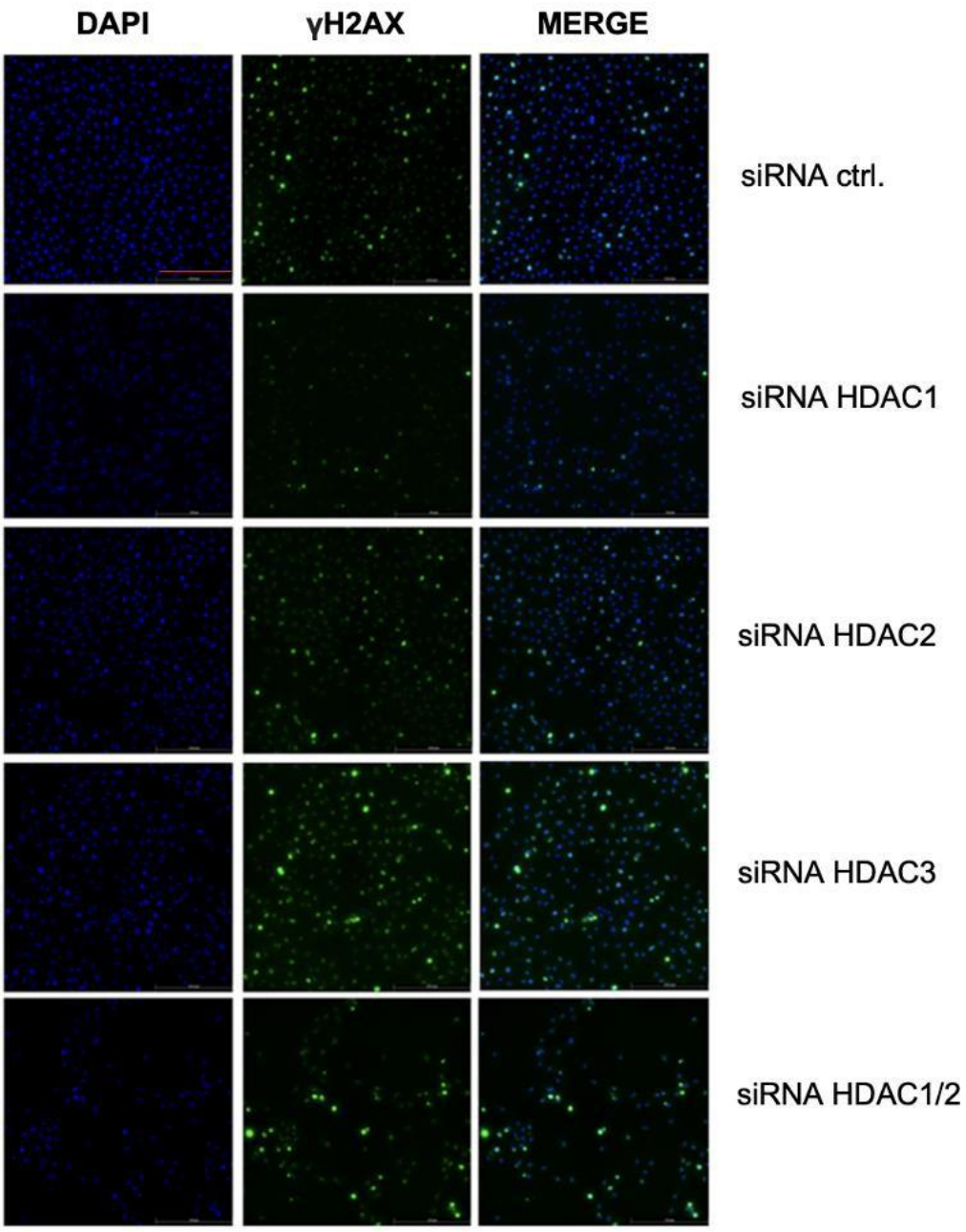


Abb. 33: Nachweis von DSBs und Zellkernen in HBLAK nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA. Dargestellt sind verschiedene Aufnahmen nach Fluoreszenzfärbung mit DAPI (blau) sowie phosphoryliertem γH2AX (grün) und deren Überlagerung (*MERGE*). Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC1, 2, oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Die Bilder wurden in einer vierfachen Vergrößerung aufgenommen. Der in der Abbildung rot hervorgehobene Maßstab entspricht in seiner vollen Länge 111,7 Mikrometer (µm).

Ein HDAC-*Knockdown* führt in der Kontroll-ZL HBLAK zu Veränderungen der Zellkernanzahl sowie zur Bildung von DSBs. Die Auswirkungen des *Knockdowns* variieren je nachdem, welche HDAC betroffen ist. In der Kontrollgruppe sind die meisten Zellkerne sichtbar, während die Zellkernanzahl nach einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 am geringsten ausfällt. Die meisten DSBs lassen sich nach einem *Knockdown* von

HDAC3 detektieren, während nach einer Behandlung mit HDAC1-siRNA die geringste Zahl von DSBs nachgewiesen wird.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HDAC-Typen in der Kontroll-ZL HBLAK spezifische Funktionen zu erfüllen haben. So scheint HDAC3 beispielsweise eine wichtige Rolle in der Reparatur von DSBs einzunehmen.

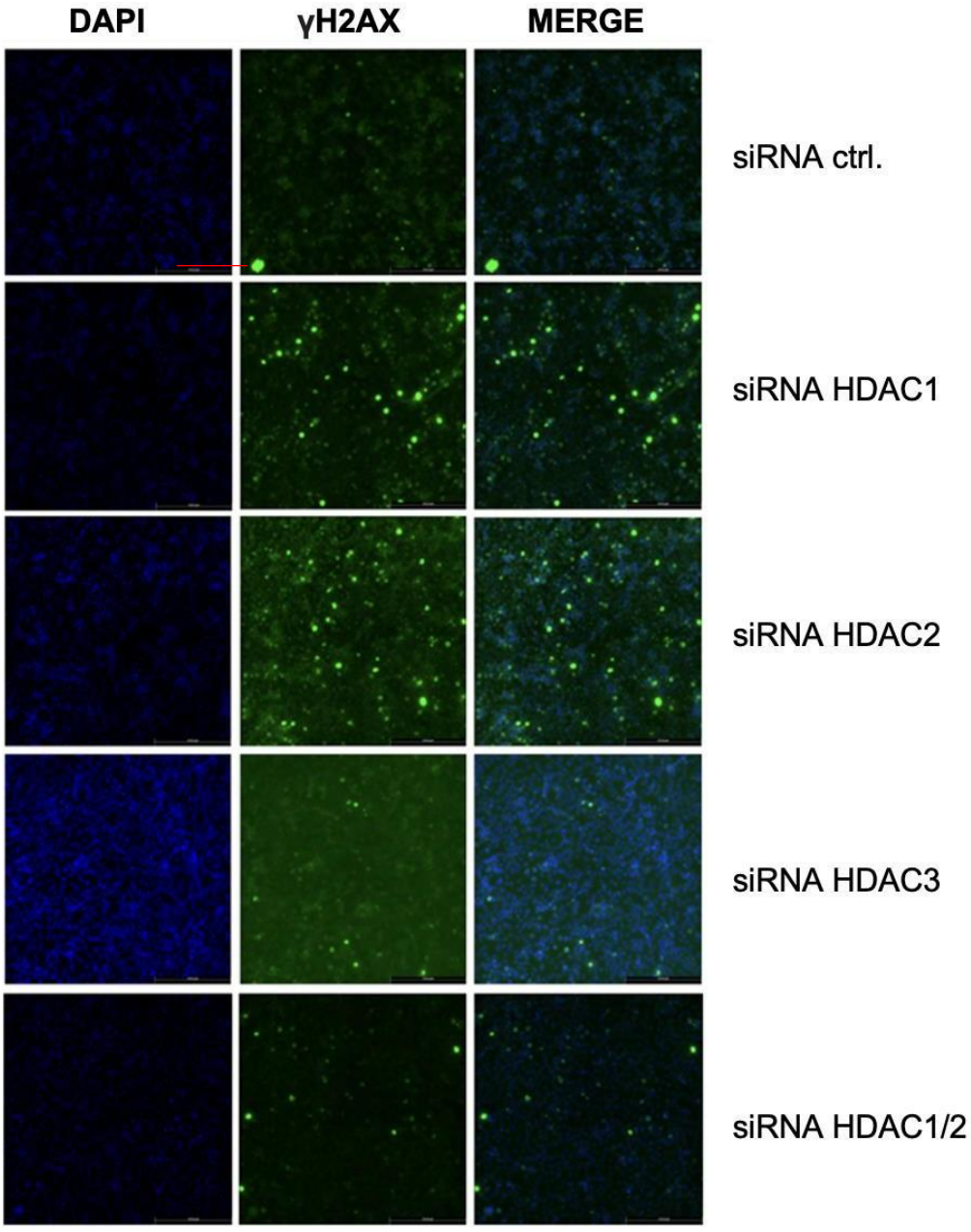


Abb. 34: Nachweis von DSBs und Zellkernen in VM-CUB-1 nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA. Dargestellt sind verschiedene Aufnahmen nach Fluoreszenzfärbung mit DAPI (blau) sowie phosphoryliertem γH2AX (grün) und deren Überlagerung (*MERGE*). Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC1, 2, oder 3 sowie zu einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Die Bilder wurden in einer vierfachen Vergrößerung aufgenommen. Der in der Abbildung rot hervorgehobene Maßstab entspricht in seiner vollen Länge 111,7 µm.

Auch in der UCC VM-CUB-1 führt ein HDAC-*Knockdown* zu Veränderungen der Zellkernanzahl und zur Entstehung von DSBs. In VM-CUB-1 sind die meisten Zellkerne nach einer Behandlung mit HDAC1- oder HDAC2-siRNA sichtbar. In Übereinstimmung mit HBLAK ist die niedrigste Zellkernanzahl auch in VM-CUB-1 nach dem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 sichtbar. Die meisten DSBs treten nach dem *Knockdown* von HDAC3 auf. Die geringste Anzahl von DSBs ist nach dem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2 erkennbar.

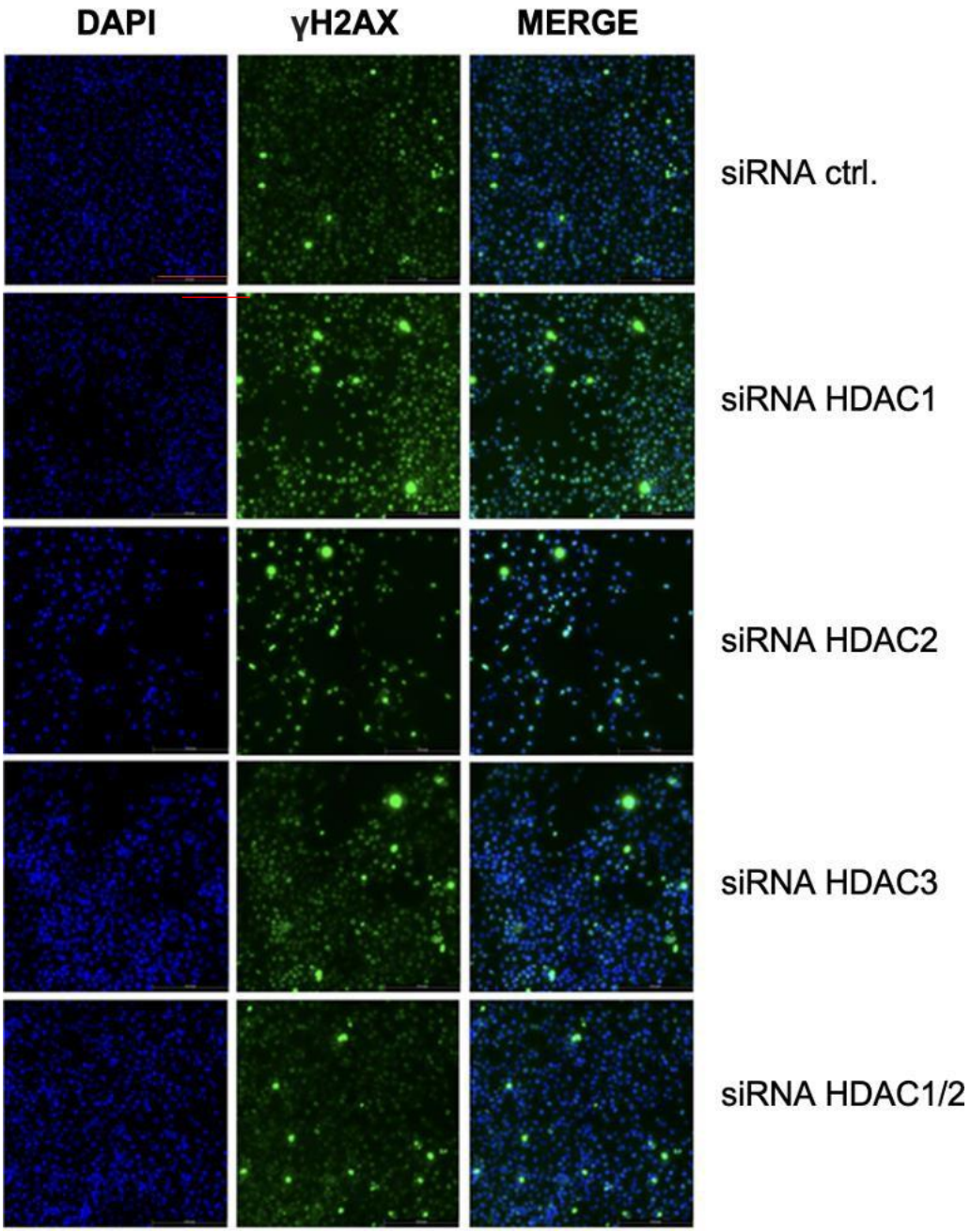


Abb. 35: Nachweis von DSBs und Zellkernen in UM-UC-3 nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA. Dargestellt sind verschiedene Aufnahmen nach zytochemischer Fluoreszenzfärbung mit DAPI (blau) sowie phosphoryliertem γH2AX (grün) und deren Überlagerung (*MERGE*). UM-UC-3 wurde zuvor mit HDAC-siRNA behandelt. Die Behandlung führte zu einem *Knockdown* von HDAC1, 2, und 3 sowie einem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Die Bilder wurden in

einer vierfachen Vergrößerung aufgenommen. Der in der Abbildung rot hervorgehobene Maßstab entspricht in seiner vollen Länge 111,7 µm.

Vergleichbar mit der Kontroll-ZL HBLAK und der UCC VM-CUB-1 treten auch in UM-UC-3 nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA DSBs und eine veränderte Zellkernanzahl auf. Die meisten Zellkerne lassen sich in der Kontrolle nachweisen, die wenigsten nach der Intervention mit HDAC1- oder HDAC2-siRNA. Die meisten DSBs treten nach einer Behandlung mit HDAC1-siRNA auf, gefolgt von dem gleichzeitigen *Knockdown* von HDAC1 und 2.

Alles in allem bleibt festzuhalten, dass die verschiedenen HDACs unterschiedlich stark in die Reparatur bzw. Induktion von DSBs in den verschiedenen ZL eingebunden sind. Besonders potent auf die Reduktion der Zellzahl wirkt in allen drei untersuchten ZL der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2.

4.4 Wirkungsanalysen von HDACis in Kombination mit BCL-2is im UC

4.4.1 Die Kombination von HDACis mit Venetoclax wirkt in UCCs teils synergistisch und teils antagonistisch

HDACis vermögen die Expression von sowohl pro- als auch antiapoptotischen Faktoren im UC zu steigern. Antiapoptotische Faktoren, wie z.B. BCL-2, die in Tumor-ZL oftmals *per se* vermehrt exprimiert werden als in den normalen Kontroll-ZL, werden auf diese Weise nochmals stärker induziert. Auf Basis der genannten Beobachtungen stellt sich die Frage, ob sich die Apoptose stärker forcieren lässt, wenn man HDACis mit einem Inhibitor der BCL-2-Familie, wie Venetoclax, kombiniert.

Zunächst sollte der Effekt einer Venetoclax-Monotherapie auf die Kontroll-ZL HBLAK untersucht werden, um die Toxizität des BCL-2i auf das normale Harnblasengewebe einschätzen zu können. Um die Wirkung einer solchen Kombination zu untersuchen, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 mit Romidepsin oder Quisinostat gepaart mit Venetoclax behandelt. Im Anschluss erfolgte die Durchführung von MTT-Tests sowie die Übertragung der Daten in eine Chou-Talalay-Analyse. Die jeweiligen Analysen werden in den Abbildungen 37 und 38 gezeigt.

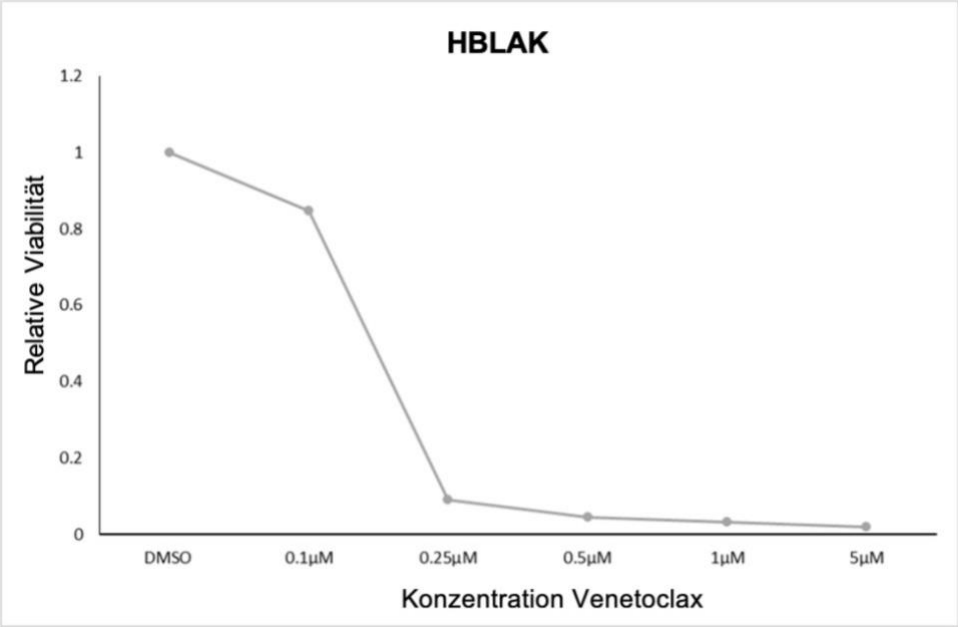


Abb. 36: Die IC50-Werte von Venetoclax fallen in der Kontroll-ZL HBLAK gering aus. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungs-Kurve, die durch MTT-Tests bestimmt wurde. Verwendet wurden unterschiedliche Dosierungen von Venetoclax, die auf der Abszisse dargestellt sind. DMSO ist die Lösungskontrolle. Die Behandlung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 72 h. Die Ordinate zeigt die relative Zellviabilität, normiert auf DMSO.

Wie aus Abbildung 36 hervorgeht, nimmt die relative Zellviabilität von HBLAK mit steigender Venetoclax-Dosis ab. Gemäß der Abbildung liegt der IC50-Wert von Venetoclax in HBLAK in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,25 µM, in dem gleichzeitig der stärkste Rückgang der relativen Zellviabilität zu verzeichnen ist. Bei einer Venetoclax-Dosis von 5 µM sind keine viablen HBLAK-Zellen mehr nachweisbar.

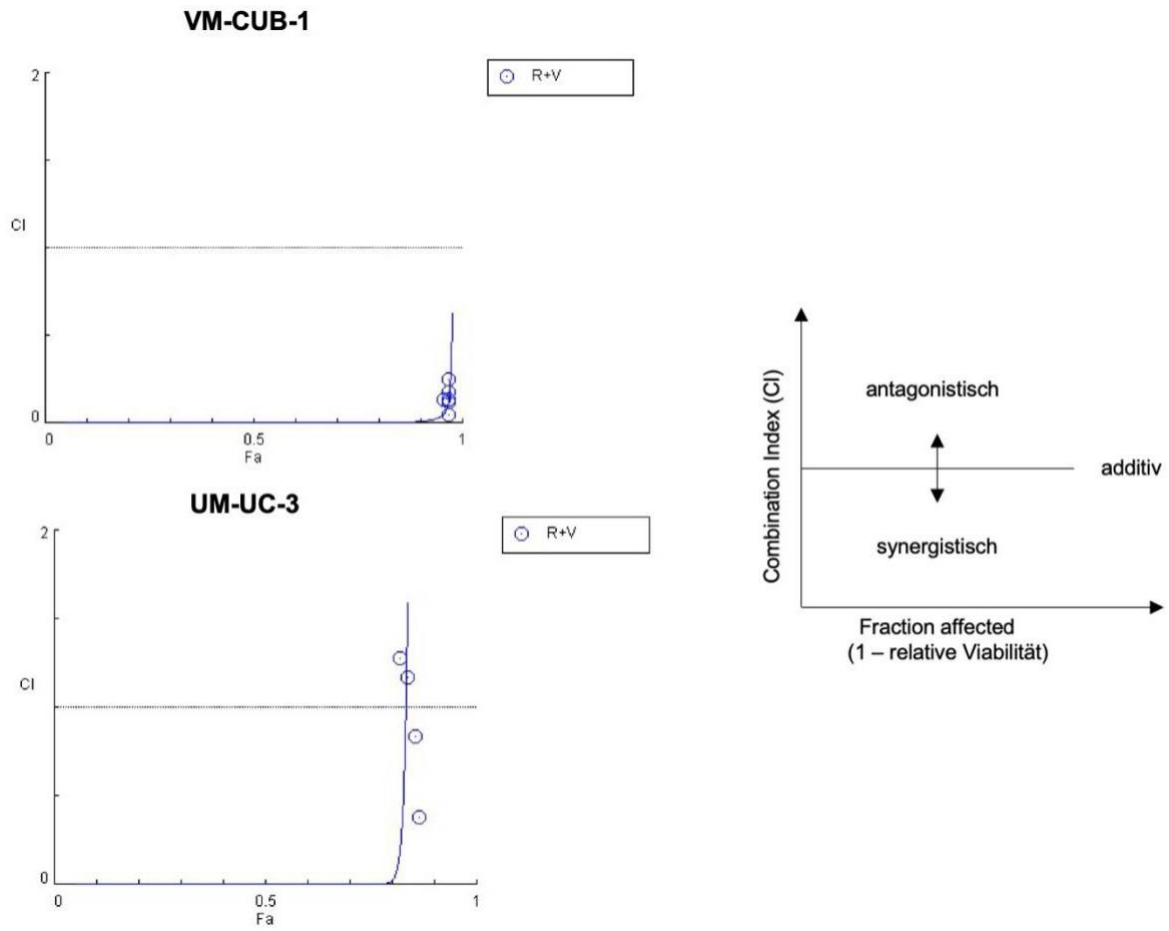


Abb. 37: Die Kombination von Romidepsin mit Venetoclax wirkt in Abhängigkeit von der betrachteten UCC und der Dosierung synergistisch oder antagonistisch. Die Darstellung erfolgt in Form einer Chou-Talalay-Analyse. Die Daten hierfür stammen aus einem MTT-Test. Die Chou-Talalay-Analyse zeigt auf der Abszisse die *fraction affected* (1 – relative Viabilität). Die Ordinate zeigt den *combination index*. *Der combination index* definiert Synergismus (CI < 1), additiven Effekt (CI = 1) oder Antagonismus (CI > 1).

Abbildung 37 zeigt, dass die Kombination aus Romidepsin und Venetoclax in den UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 synergistisch Zelltod induziert. In VM-CUB-1 zeigt sich der synergistische Effekt sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Dosen. In UM-UC-3 besteht der synergistische Effekt bis zu einer *fraction affected* von 0,8 und schlägt über diesen Wert hinaus in einen antagonistischen Effekt um.

Abbildung 37 präsentiert die Chou-Talalay Analysen für die Kombination von Quisinostat mit Venetoclax.

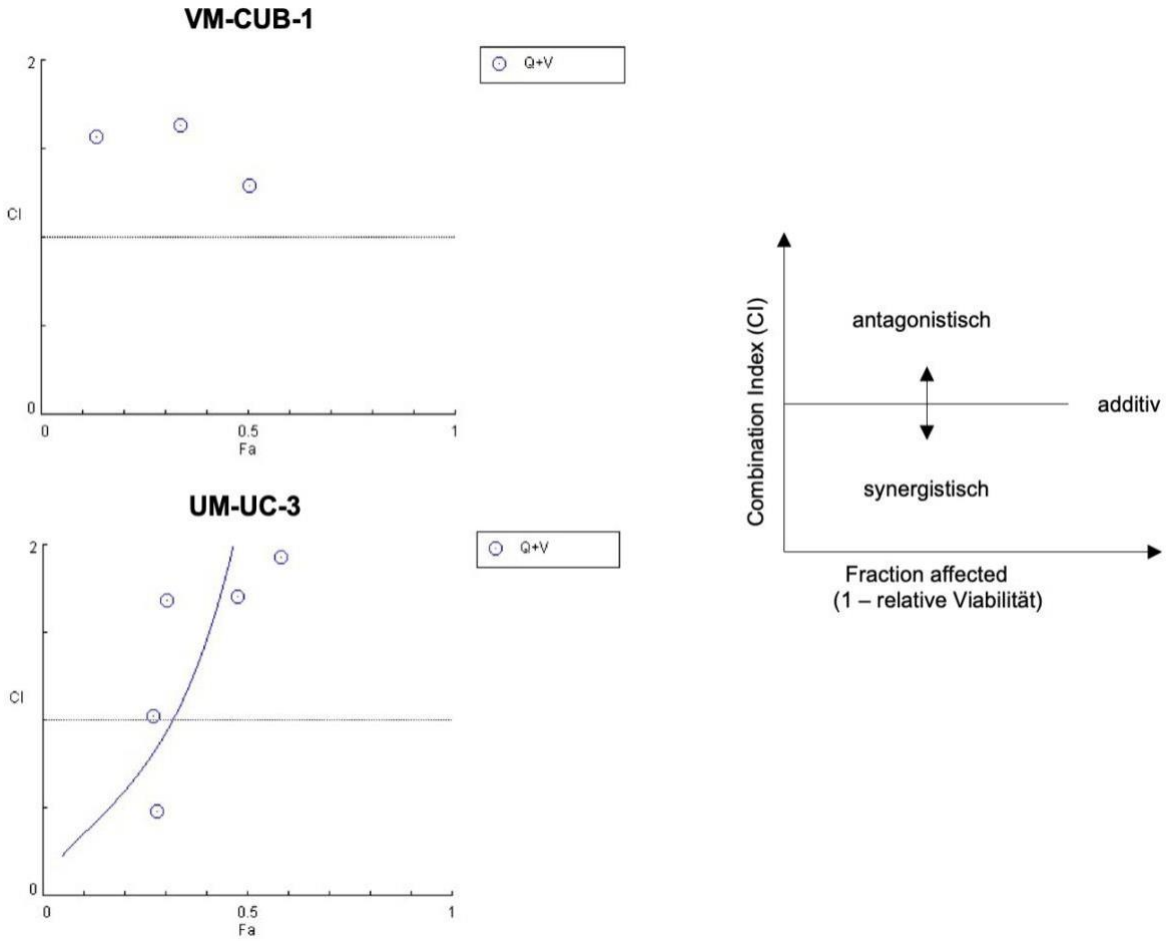


Abb. 38: Die Kombination von Quisinostat mit Venetoclax wirkt in Abhängigkeit von der betrachteten UCC und der Dosierung synergistisch oder antagonistisch. Die Darstellung erfolgt in Form einer Chou-Talalay-Analyse. Die Daten hierfür stammen aus einem MTT-Test. Die Chou-Talalay-Analyse zeigt auf der Abszisse die *fraction affected* (1 – relative Viabilität). Die Ordinate zeigt den *combination index*. Der *combination index* definiert Synergismus (CI < 1), additiven Effekt (CI = 1) oder Antagonismus (CI > 1).

Aus Abbildung 38 geht hervor, dass die Kombination von Quisinostat mit Venetoclax in VM-CUB-1 nur einen antagonistischen Effekt bewirkt. Dieser tritt bereits bei geringen Dosierungen auf und ist bei einer *fraction affected* von 0,3 am stärksten ausgeprägt. Über diesen Wert hinaus flacht der antagonistische Effekt ein wenig ab. In UM-UC-3 führt die Kombination von Quisinostat mit Venetoclax in geringen Dosierungen zu einem synergistischen Effekt. Bei höheren Dosierungen tritt jedoch auch hier ein antagonistischer Effekt ein. Der Wechsel von synergistischem zu antagonistischem Effekt erfolgt bei einer *fraction affected* von 0,3.

4.4.2 Die IC50-Werte von Navitoclax variieren zelllinienabhängig stark

Neben den selektiven BCL-2is existieren Breitspektrum-BCL-2is, zu denen Navitoclax zählt (Tse et al., 2008). Aufgrund ihres erweiterten Wirkungsbereichs könnte die Substanz im UC

potenter Zelltod induzieren als Venetoclax. Bislang sind noch keine IC50-Werte von Navitoclax im UC bestimmt worden.

Um diese Wissenslücke zu schließen, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit verschiedenen Navitoclax-Dosen behandelt und im Anschluss daran MTT-Tests durchgeführt. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt.

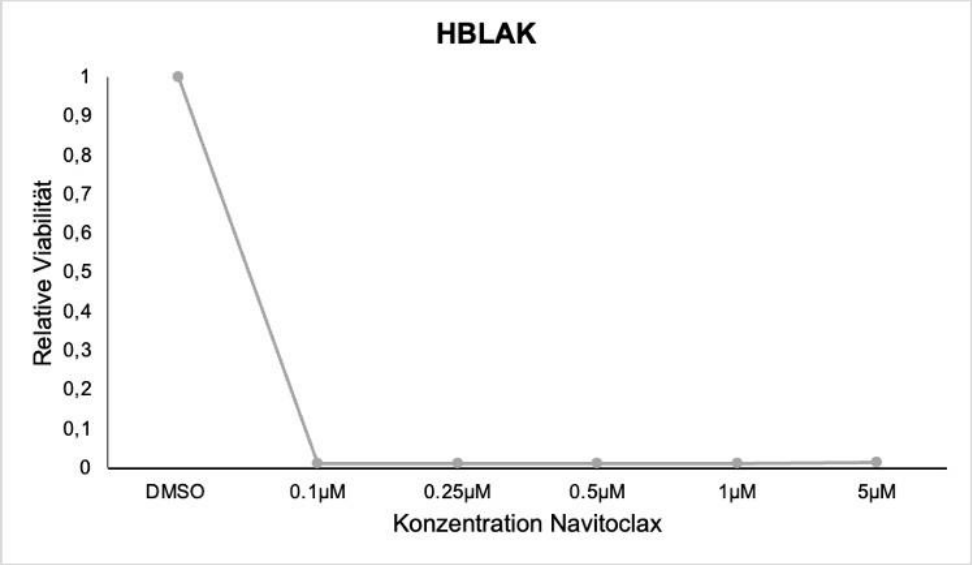
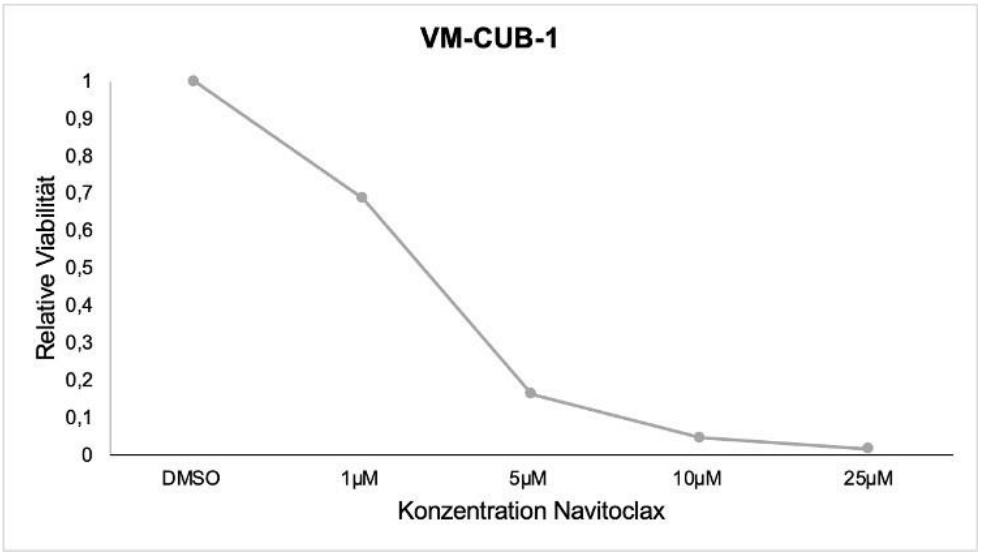


Abb. 39: Die IC50-Werte von Navitoclax fallen in der Kontroll-ZL HBLAK sehr gering aus. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungs-Kurve, die durch MTT-Tests bestimmt wurde. Verwendet wurden unterschiedliche Dosierungen von Navitoclax, die auf der Abszisse dargestellt sind. DMSO ist die Lösungskontrolle. Die Behandlung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 72 h. Die Ordinate zeigt die relative Zellviabilität, normiert auf DMSO.

Aus der folgenden Abbildung geht hervor, dass die untersuchten ZL unterschiedlich auf eine Behandlung mit Navitoclax reagieren. Dabei scheint die Kontroll-ZL HBLAK besonders sensibel auf die Medikation anzusprechen, denn schon geringe Navitoclaxmengen führen starken Zelltod herbei. Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, liegen nach einer Behandlung mit 0,1 µM Navitoclax bereits keine viablen HBLAK-Zellen mehr vor. Daraus lässt sich schließen, dass der IC50-Wert von Navitoclax in HBLAK unterhalb von 0,1 µM zu verorten ist.



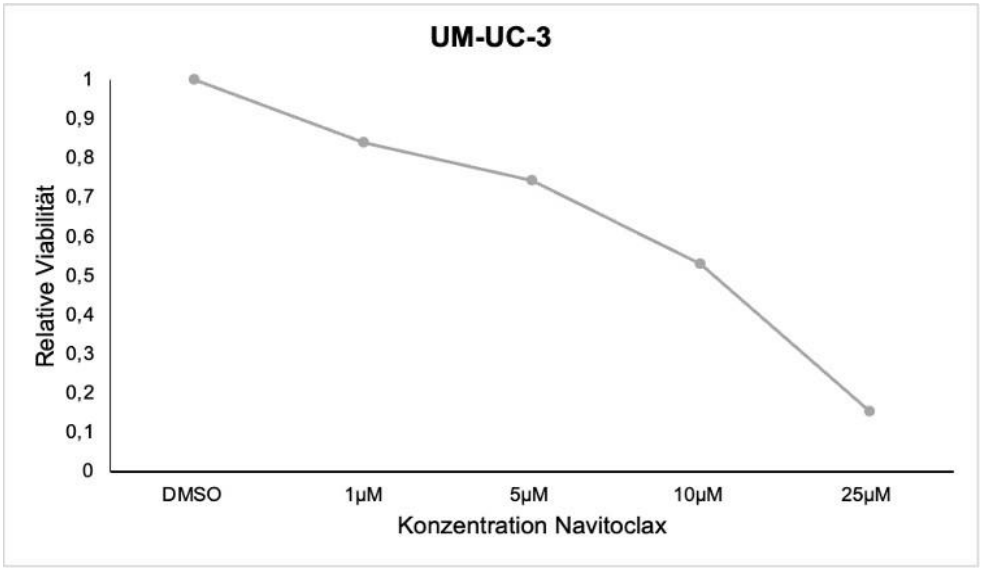


Abb. 40: Die IC50-Werte von Navitoclax in UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3. Dargestellt sind Dosis-Wirkungs-Kurven für Navitoclax, die durch MTT-Tests bestimmt wurden. Verwendet wurden unterschiedliche Dosierungen von Navitoclax, die auf der Abszisse dargestellt sind. DMSO ist die Lösungskontrolle. Die Behandlung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 72 h. Die Ordinate zeigt die relative Zellviabilität, normiert auf DMSO.

Im Falle von VM-CUB-1 zeigt Abbildung 40 eine abnehmende relative Zellviabilität nach Steigerung der Navitoclax-Dosis. Gemäß der Abbildung liegt der IC50-Wert von Navitoclax in VM-CUB-1 zwischen 1 µM und 5 µM. Mithilfe eines IC50-Rechners kann der Wert auf 2,79 µM präzisiert werden. Der stärkste Rückgang der relativen Zellviabilität ergibt sich in dem Bereich zwischen 1 µM und 5 µM. Dort sinkt die relative Zellviabilität von 70 % auf 20 % ab. Bei einer Navitoclax-Dosis von 25 µM sind keine viablen VM-CUB-1-Zellen mehr nachweisbar.

Auch die relative Zellviabilität von UM-UC-3 nimmt mit steigender Navitoclax-Dosis ab. Dies geschieht jedoch weniger schnell als bei HBLAK oder VM-CUB-1. Folglich reagieren nicht nur die Kontroll-ZL HBLAK und die UCCs unterschiedlich auf eine Behandlung mit Navitoclax, sondern auch innerhalb der Gruppe der UCCs bestehen Diskrepanzen. Abbildung 42 folgend liegt der IC50-Wert für Navitoclax in UM-UC-3 bei ca. 10 µM. Der IC50-Rechner gibt einen Wert von 12,89 µM an. Der größte Abfall der relativen Zellviabilität tritt zwischen 10 µM und 25 µM auf, wo ein Rückgang von 50 % auf 20 % zu verzeichnen ist. Anders als bei VM-CUB-1, sind im Falle von UM-UC-3 bei 25 µM noch 10 % bis 20 % der Zellen viabel.

Aufgrund der aufgeführten Daten und der daraus ableitbaren hohen Toxizität von Navitoclax in HBLAK, erscheint die Kombination dieses BCL-2i mit HDACis im UC wenig sinnvoll und wurde nicht weiter untersucht. Nach den ersten Untersuchungen dieser Arbeit sind beide Inhibitoren der BCL-2-Familie scheinbar keine geeignete Behandlungsoption für das UC.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung der fehlregulierten Apoptose im UC

5.1.1 Die Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren ist im UC fehlreguliert

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die Apoptoseregulation im UC eingehend zu untersuchen und basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen innovative Therapieansätze für das UC zu formulieren, die EPIis in den Vordergrund stellen. Zu dem Zweck erfolgte die Durchführung qRT-PCR gestützter Expressionsanalysen von elf verschiedenen Apoptosefaktoren in UCCs, LTTs sowie in Kontroll-ZL. Die untersuchten Apoptosefaktoren ließen sich entweder der BCL-2-Familie oder den IAPs zuordnen. Die gewonnen Daten implizieren eine umfassende Fehlregulation sowohl pro- als auch antiapoptotischer Faktoren im UC, die einem zelllinien- und faktorabhängigen Muster folgt.

Das Wissen um die Fehlregulation der Apoptose in Krebserkrankungen stellt kein Novum dar (Hanahan & Weinberg, 2011). Betroffen sind sowohl die Mitglieder der BCL-2-Familie (Tessoulin et al., 2019) als auch diverse Vertreter der IAPs (Falkenhorst et al., 2016).

Tabelle 41 zeigt eine detaillierte Aufschlüsselung über die Expressionsniveaus verschiedener Apoptosefaktoren in den gängigsten Krebsentitäten, einschließlich dem UC, anhand öffentlich zugänglicher Daten (Human Protein Atlas).

Tabelle 41: Übersicht über die Expression diverser Apoptosefaktoren in häufigen Krebsarten im Vergleich zum Normalgewebe (n). Die Daten entstammen dem *Human Protein Atlas* und werden in der Einheit *normalized Transcripts Per Million* (nTPM) angegeben. Die mehrheitlich proapoptotisch wirksamen Faktoren werden grün hervorgehoben, die antiapoptotischen rot.

	BAX	BID	FADD	TRADD	DAXX	BCL-2	BIRC3	BIRC5	MCL1
Blasenkrebs	138,4 n: 44,1	86,2 n: 33,1	58,1 n: 11,0	21,5 n: 17,6	17,6 n: 26,3	2,8 n: 5,2	26,2 n: 45,2	91,3 n: 2,5	157,7 n: 291,5
Prostatakrebs	58,5 n: 24,6	31,2 n: 6,5	35,5 n: 8,9	13,3 n: 20,5	14,1 n: 24,3	4,8 n: 6,2	12,7 n: 10,2	96,5 n: 0,6	105,3 n: 93,1
Brustkrebs	95,9 n: 26,3	71,5 n: 10,5	68,6 n: 13,2	17,0 n: 15,1	20,4 n: 24,4	4,4 n: 9,3	13,3 n: 17,8	101,7 n: 4,9	137,3 n: 169,3
Lungenkrebs	111,3 n: 43,6	59,9 n: 13,0	46,4 n: 10,3	16,9 n: 17,1	46,4 n: 10,3	5,3 n: 3,6	34,4 n: 23,9	101,8 n: 1,8	148,9 n: 229,8
Darmkrebs	121,9 n: 74,7	63,6 n: 14,2	44,1 n: 14,3	14,7 n: 16,9	17,5 n: 27,0	1,5 n: 6,0	22,6 n: 24,1	79,8 n: 6,4	116,5 n: 133,1
Lymphome	179,7 n: 57,3	82,2 n: 34,7	38,3 n: 16,5	19,0 n: 12,1	30,2 n: 8,6	53,5 n: 14,3	130,3 n: 138,1	107,6 n: 15,9	238,7 n: 157,4

Es wird deutlich, dass in einer Vielzahl der präsentierten Krebsarten eine Überexpression von proapoptotischen Faktoren im Vergleich zum Normalgewebe zu verzeichnen ist. Speziell BAXX ist in allen angegebenen Entitäten stärker detektierbar. BIRC5 und MCL-1 sind die antiapoptotischen Faktoren, die in allen dargestellten Krebserkrankungen wesentlich hochreguliert sind. Dieses Wissen wurde bereits in der Vergangenheit genutzt,

um durch die Inhibition dieser antiapoptotischen Faktoren in Krebs eine therapeutische Wirkung zu erzielen (Oltersdorf et al., 2005; Tse et al., 2008). Die Daten aus der obigen Tabelle stimmen mit den Trends überein, die in Textabschnitt 4.1.1 formuliert wurden. Gleichzeitig überraschen sie, da im Zusammenhang mit Krebserkrankungen häufig von einer Überexpression antiapoptotischer Faktoren die Rede ist, während die Bildung proapoptotischer Faktoren reduziert ist (Pfeffer & Singh, 2018). Um zu eruieren, ob sich die beschriebenen Tendenzen auch in allgemein verfügbaren Daten zu UCCs wiederfinden lassen, erfolgt in Tabelle 42 zunächst die strukturierte Darstellung besagter Daten, die im Folgenden als Diskussionsgrundlage für weitere Ausführungen dienen soll.

Tabelle 42: Übersicht über die Expression diverser Apoptosefaktoren in gängigen UCCs im Vergleich zum Normalgewebe (Kontrolle). Die Daten entstammen dem *Human Protein Atlas* und werden in der Einheit nTPM angegeben. Die mehrheitlich proapoptotisch wirksamen Faktoren werden grün hervorgehoben, die antiapoptotischen rot.

	BAX	BID	FADD	TRADD	DAXX	BCL-2	BIRC3	BIRC5	MCL1
BFTC905	81,1	62,8	87,3	23,3	43,6	1,2	3,8	76,6	253,3
SW-1710	81,9	69,5	38,2	19,1	12,4	16,1	11	39,4	143,2
RT-4	186,6	129,2	30,5	15,7	1,1	7,7	8	77,5	115,2
647v	171,6	149,3	56,2	28	1,6	0,2	16,8	68,9	147,2
VM-CUB-1	36,1	38,8	36,7	12,8	0,6	0,6	22,7	38,3	333,4
UM-UC-3	143,7	61,8	66,5	13,8	1,1	3,7	73,8	153,1	90,1
5637	162,3	208	65,6	10,6	24,3	1,3	62,4	179,9	87
639v	124,7	74,8	42,2	9,9	24,9	1,7	3,3	105,9	86
SCaBER	126,7	63,6	71,2	33,7	17,4	0,5	52,4	85,2	186,6
Kontrolle	**44,1**	**33,1**	**11**	**17,6**	**26,3**	**5,2**	**45,2**	**2,5**	**291,5**

Im direkten Vergleich der Tabelleninhalte mit den in der Arbeit generierten Daten fällt auf, dass sowohl Übereinstimmungen als auch Diskrepanzen bestehen. Gemäß 4.1.1 wird der proapoptotische Faktor FADD in den UCCs UM-UC-3, 5637 und 639v schwächer exprimiert als in der Kontrollgruppe. Tabelle 42 zeigt Gegenteiliges. Äquivalente Unterschiede treten darüber hinaus in der Expression von TRADD in BFTC-905 und RT-4 sowie bei BAX in diversen UCCs auf. Übereinstimmend wird eine signifikante Überexpression von BIRC5 in beiden Datensätzen beobachtet. Die festgestellten Unterschiede könnten auf methodologische Variationen, unterschiedliche Probenquellen oder die biologische Heterogenität der UCCs zurückzuführen sein.

Studien, die sich mit der Expression von BCL-2-Familienmitgliedern und IAPs im UC auseinandersetzen, sind rar und nehmen oftmals nur wenige UCCs und Apoptosefaktoren in den Fokus. Ihre Aussagekraft ist folglich begrenzt. In Ermangelung großer und umfangreicher Datensätze, sollen besagte kleinere Studien an dieser Stelle zwecks

Vergleichs mit den in der Arbeit aufgeführten Ergebnissen dennoch Erwähnung finden: In Übereinstimmung mit den Resultaten aus 4.1.1 sowie den Angaben aus Tabelle 42 zeigten Kirsh et al. (1998), dass BCL-2 in UCCs nur schwach exprimiert wird, während BCL-XL und BCL-XS vermehrt gebildet werden (Kirsh et al., 1998). Korkolopoulou et al. (2002) berichteten zudem von einer vermehrten Expression von BAX und BCL-XL im Gros der untersuchten UC-Proben, während die Expression von BCL-2 und BCL-XS so gering ausfiel, dass die Faktoren kaum nachgewiesen werden konnten. Die ForscherInnen fanden überdies heraus, dass eine vermehrte Expression von BCL-X in direktem Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium stand (Korkolopoulou et al., 2002). Eine Studie von Zhang et al. (2021) zeigte, dass die IAPs BIRC2 und BIRC3 im UC vermehrt gebildet werden (Zhang et al., 2021). Diese Fehlregulation antiapoptotischer Faktoren ist oft mit einer schlechten Prognose des UC verbunden (Yoshimine et al., 2013) und könnte für die Sinnhaftigkeit einer IAP-Inhibition plädieren. Im Rahmen einer *Review* hob Wolf (2023) die zentrale Rolle der IAPs im UC hervor. Er kam zu dem Schluss, dass die Überexpression verschiedener IAPs im UC mit einer schlechten Prognose verbunden ist und das gezielte Adressieren dieser Proteine, etwa durch Smac-*Mimetika*, eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen könnte (Wolf, 2023). Die spezifische Rolle von BIRC5 im UC wird in Abschnitt 5.1.2 behandelt. Alles in allem bestätigen die aufgeführten Studien die Kernaussage der vorliegenden Arbeit, nach der die Apoptose im UC fehlreguliert ist und die Apoptosefaktoren in einem unterschiedlichen Ausmaß von der Fehlregulation betroffen sind.

Die potenziellen Ursachen für die beschriebene Fehlregulation sind vielgestaltig und auf unterschiedlichen Ebenen wiederzufinden: Da Krebszellen eine hohe Teilungsrate aufweisen, sind sie einer deutlichen DNA-Replikationsbelastung ausgesetzt (Hanahan & Weinberg, 2011), die in Synthesefehlern und letztlich Apoptose resultieren kann (Masamsetti et al., 2019). Darüber hinaus geht das Krebswachstum mit der Bildung von ROS einher. Die oxidativen Metaboliten können förderlich auf das Wachstum einwirken, führen jedoch in hohen Mengen mehrheitlich zu Zellschäden, die als Induktoren für den programmierten Zelltod fungieren (Arfin et al., 2021). Grundlage der beschriebenen Prozesse ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. p53 (Shi et al., 2021) oder c-Myc (Benassi et al., 2006), die die Expression von proapoptotischen Faktoren regulieren (Miyashita & Reed, 1995; Oda et al., 2000; Mitchell et al., 2000). p53-Mutationen sind im UC ein häufig vorkommendes Phänomen (Sidransky et al., 1991). Es ist denkbar, dass diese in einer Beeinträchtigung oder gar einem Funktionsverlust von p53 resultieren können.

Weitere Erklärungsansätze für die veränderte Expression proapoptotischer Faktoren im UC sind auf der Ebene von Mutationen oder epigenetischen Veränderungen zu verorten. Diese können in Krebserkrankungen sowohl im Bereich von Promotoren vorkommen (Huang et al., 2022), jedoch auch in *Enhancern* (Carullo & Day, 2019) oder *Silencern* (Diederichs et al., 2016) auftreten. Im Falle von BAX wurden in der B-Zell-Leukämie Promotormutationen beschrieben, die zu einer Vervielfältigung des Faktors führten (Moshynska et al., 2003). Im UC unterliegen zahlreiche Gene einer Regulation durch Promotorhypermethylierung (Lee & Song, 2017). Genetische Variationen in *Enhancern* und *Silencern* werden hingegen im UC überwiegend nicht beschrieben.

Das Auftreten von epigenetischen Veränderungen ist ein in Krebserkrankungen häufig beobachtetes Phänomen (Sharma et al., 2010), das zu einer Modifikation der Genexpression führt. Im Falle des UC ist bekannt, dass infolge der epigenetischen Prozesse die Bildung von proapoptotischem Apaf-1 gedrosselt wird (Christoph et al., 2006) und auch die Expression von Caspasen einer Reduktion unterliegen kann (Malekzadeh et al., 2009).

Es bleibt festzuhalten, dass die Veränderungen der Apoptoseregulation im UC auf komplexe Prozesse zurückzuführen sind und ebenso komplexe Therapieansätze erfordern. Die Beobachtung, dass das Expressionsmuster der Apoptosefaktoren zelllinienabhängig variiert, unterstreicht nicht nur die Notwendigkeit komplexer Therapien, sondern auch personalisierter Behandlungsverfahren im UC. Die im Ergebnisteil dieser Arbeit geschilderten Analysen, nach denen proapoptotische Faktoren in UCCs mitunter überexprimiert vorliegen, erlauben die Hypothese, dass diese UCCs empfindlich auf proapoptotische Stimuli reagieren könnten und so effizienter in Apoptose zu bringen sind. Die beobachtete Fehlregulation antiapoptotischer Faktoren hingegen bietet eine mögliche Begründung dafür, warum UCCs erfahrungsgemäß nur schwer dem Zelltod zuzuführen sind. Die medikamenteninduzierte Hemmung antiapoptotischer Faktoren könnte die Apoptose im UC fördern.

5.1.2 BIRC5: Ein Schlüsselfaktor der Apoptose im UC?

Wie oben beschrieben, handelt es sich bei BIRC5 um den einzigen antiapoptotischen Faktor, der in allen untersuchten UCCs und LTTs überexprimiert wurde. In den Kontroll-ZL hingegen war BIRC5 kaum detektierbar. Diese Umstände lassen die Vermutung zu, dass BIRC5 von übergeordneter Wichtigkeit für die Entstehung und den Progress des UC sein könnte.

Die Überexpression von BIRC5 wird nicht nur im UC beschrieben (Swana et al., 1999), sondern ist auch in anderen Krebsentitäten vorbekannt (Hernandez et al., 2011; Wright et al., 2023). Die im Kontext der vorliegenden Arbeit getätigte Beobachtung, dass BIRC5 nur marginal in gesunden Harnblasen-ZL gebildet wird, wurde bereits von anderen ForscherInnen beschrieben (Shariat et al., 2007; Chen et al., 2013) und unterstreicht damit die Validität der in 4.1.1 gewonnenen Daten. Studien stellen nicht nur die Überexpression von BIRC5 im UC heraus, sondern betonen darüber hinaus den Zusammenhang zwischen niedrigen BIRC5-Spiegeln und einem verlängerten Gesamtüberleben (Ecke et al., 2020) sowie einem erhöhten Rezidivrisiko infolge vermehrter BIRC5-Werte (Shariat et al., 2007). Weiterhin steht die Expression von BIRC5 im engen Zusammenhang mit der Entstehung von Chemotherapieresistenzen (Krafft et al., 2019). Eine Sensibilisierung des UC für Krebsmedikamente kann durch den gezielten *Knockdown* von BIRC5 erfolgen, der außerdem in einer reduzierten Tumorgröße mündet (Kunze et al., 2012). Neue Ansätze zur Reduktion der BIRC5-Expression werden derzeit erforscht und gelten als vielversprechend (Lin et al., 2021; Wang et al., 2022). Trotz bestehender Unsicherheiten hinsichtlich der zuverlässigen Verwendung von Urin-Biomarkern (Ng et al., 2021), stehen heute mehrere Urintests zur Detektion des UC zur Verfügung, die jedoch nicht auf dem Nachweis von BIRC5 fußen (Ecke et al., 2023). Basierend auf den vorangegangenen Erläuterungen verwundert dies, schließlich wurde die Bedeutung von BIRC5 für das UC offenbar und dessen Potenzial als Biomarker für das UC durch Dong et al. (2021) betont (Dong et al., 2021).

Zusammenfassend deutet die derzeitige Studienlage darauf hin, dass es sich bei BIRC5 um einen bedeutenden Faktor in der Entstehung und dem Wachstum des UC handelt. Daher sollten zukünftige Forschungsvorhaben BIRC5 zunehmend in den Blick nehmen und dessen Bedeutung v.a. im Rahmen personalisierter Therapieansätze eingehend evaluieren.

5.1.3 Die Fehlregulation von Apoptosefaktoren trägt im UC zur Entstehung der Cisplatinresistenz bei

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Expression von Apoptosefaktoren nicht nur in UCCs, sondern auch in LTTs fehlreguliert ist. Daraus resultiert die Vermutung, dass die veränderte Expression von Apoptosefaktoren an der Entstehung der Cisplatinresistenz im UC beteiligt sein könnte. Die Verwendung von Cisplatin stellt eine gängige Behandlungsmethode des UC dar (Niegisch et al., 2022), geht allerdings häufig mit der Ausbildung von Resistenzen einher (Buttigliero et al., 2017), was sich für die Therapie von Krebspatienten als nachteilig erweist.

Die Cisplatinresistenz im Allgemeinen basiert auf verschiedenen Mechanismen, zu denen epigenetische Veränderungen (Steele et al., 2009) und Modifikationen in der Genexpression von Apoptosefaktoren, vorrangig der BCL-2-Familie (van Oosterwijk et al., 2012), zählen. Das Umgehen apoptotischer Prozesse ist ein bedeutender Schritt in der *Post Target Resistance* von Cisplatin (Galluzzi et al., 2014). Vor dem Hintergrund erscheint die in der Arbeit getätigte Beobachtung, dass einige LTTs mehr antiapoptotische Faktoren exprimieren als die parentalen UCCs, plausibel. Während sich die gerade getätigten Aussagen auf verschiedene Tumorarten beziehen, sind die Mechanismen der Cisplatinresistenz im UC noch unzureichend erforscht. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der Expression von Apoptosefaktoren und dem Auftreten einer Cisplatinresistenz muss noch näher exploriert werden. In einer früheren Studie stellten Skowron et al. (2018) fest, dass die Expression von Apoptosefaktoren LTT-abhängig variierte. So wurden BCL-XL, BCL-XS und BIRC5 in einigen LTTs überexprimiert, während BCL-2 weniger stark gebildet wurde (Skowron et al., 2018). Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Die Relevanz der Fehlregulation von Apoptosefaktoren für die Ausbildung einer Cisplatinresistenz zeigt sich anhand der Effektivität von Kombinationstherapien, die sich aus Cisplatin und Apoptosefaktor-Inhibitoren zusammensetzen. So vermag der Pan-BCL-2i Obatoclax das UC für eine Behandlung mit Cisplatin zu sensibilisieren (Steele et al., 2019), während der BIRC5i YM155 die Wirkung von Cisplatin im UC verstärkt und auf diese Weise das Zellsterben steigert (Skowron et al., 2018). Neben der Paarung von Cisplatin mit einem weiteren Inhibitor, wirkt auch die Kombination mit Zweien Zelltod induzierend. Dies zeigt sich anhand des kombinierten *Knockdowns* von BCL-XL und BIRC5, die die Wirkung von Cisplatin unterstützten (Kunze et al., 2013).

5.1.4 Die komplexen Interaktionen der Apoptosefaktoren im UC

Der Nachweis von Korrelationen zwischen verschiedenen Apoptosefaktoren bietet die Möglichkeit, regulatorische Zusammenhänge im UC zu erfassen und sich diese ggf. zwecks Apoptoseinduktion zu Nutze zu machen. Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die Interaktionen zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren im UC vielfältig und überwiegend nicht klar korreliert sind. Jedoch konnten auch einige signifikante Korrelationen herausgearbeitet werden.

Eine positive Korrelation ist zwischen den proapoptotischen Faktoren BID und BAX nachweisbar. Beide sind für die Bildung des MOMP essenziell (Wei et al., 2001) und es besteht eine vorbekannte Wechselwirkung zwischen den Faktoren, im Rahmen derer BID

an der Aktivierung von BAX beteiligt ist (Eskes et al., 2000). Allerdings ist BID für den Aktivierungsprozess nicht zwingend vonnöten (Zhang et al., 2016), was darauf hindeutet, dass weitere Ursachen für die Korrelation zwischen beiden Faktoren vorliegen. Eine mögliche Begründung ist auf Ebene des Transkriptionsfaktors p53 zu finden, der sowohl auf die Expression von BID einwirkt (Sax et al., 2002) als auch die Bildung von BAX maßgeblich beeinflusst (Miyashita et al., 1994).

Ein weiteres Beispiel für eine Korrelation zwischen zwei proapoptotischen Faktoren stellt sich für BAX und DAXX dar. An dieser Stelle gilt es zu erwähnen, dass DAXX im Kontext der Apoptose als Hybrid fungiert und sowohl proapoptotische Elemente (Yang et al., 1997) als auch antiapoptotische Aspekte (Chen & Chen, 2003) in sich vereint. In der vorliegenden Arbeit wurde DAXX der Gruppe der proapoptotischen Faktoren zugeordnet, obgleich seine apoptosehemmende Wirkung nicht gänzlich vernachlässigt werden darf, schließlich unterbinden antiapoptotische Faktoren häufig proapoptotische Prozesse (Kale et al., 2017). Die positive Korrelation zwischen BAX und DAXX erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich, da die beiden Faktoren unterschiedliche Aufgaben im Kontext der Apoptose erfüllen. Während BAX für den Prozess der *outer membrane permeabilization* essenziell ist (Wei et al., 2001), nimmt DAXX verschiedene andere Aufgaben wahr (Yang et al., 1997) und ist darüber hinaus an der DNA-Reparatur beteiligt (Gulve et al., 2022). Auf transkriptionaler Ebene lässt sich ebenfalls keine eindeutige Begründung für die festgestellte Korrelation finden. In Bezug auf den Transkriptionsfaktor p53 verhält es sich z.B. so, dass dieser an der Regulierung der BAX-Expression beteiligt ist (Miyashita et al., 1994) und auch dessen Aktivität steuert (Chipuk et al., 2004). DAXX wiederum senkt die Aktivität von p53 (Zhao et al., 2004), was infolge in einer geringeren BAX-Expression und Aktivität resultieren müsste. Jedoch gibt es auch Hinweise, dass DAXX auf proapoptotische Weise mit p53 in Interaktion treten kann, wobei sich diese nicht auf die Expression von BAX auszuwirken scheint (Li et al., 2007). In der Fachliteratur wurde die Korrelation zwischen BAX und DAXX bisher noch nicht beschrieben. Berichte über die Effekte einer medikamenteninduzierten Hemmung beider Faktoren auf die Apoptoseinduktion lassen sich ebenfalls nicht identifizieren.

Ein zusätzliches Beispiel für eine positive Korrelation stellt das Zusammenspiel zwischen den antiapoptotischen Faktoren MCL-1 und BCL-XL dar. Studien haben ergeben, dass das gleichzeitige *Targeting* beider Faktoren die Apoptose in Tumorzellen deutlich verstärkt (Weeden et al., 2018; Kehr et al., 2020). Ähnlich wie bei BAX und BID könnte die Korrelation durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Die Expression

respektive Aktivierung von MCL-1 wird sowohl durch NF-κB (Liu et al., 2014) als auch durch *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (Bhattacharya et al., 2005) vermittelt. Ähnlich verhält es sich im Falle von BCL-XL (Lee et al., 2008).

In Summe zeigt sich, dass im UC nur wenige Korrelationen zwischen Apoptosefaktoren feststellbar sind. Die Korrelationen, die vorhanden sind, unterliegen komplexen Mechanismen, die es weiter zu erforschen und besser zu verstehen gilt. Einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt könnten gemeinsame Transkriptionsfaktoren darstellen.

5.2. EPIis verändern die Expression von Apoptosefaktoren im UC

5.2.1 EPIis und Apoptosefaktoren im UC: Zelllinienabhängige Effekte

Ein bedeutendes Ziel dieser Arbeit war, die Effekte einer epigenetischen Behandlung auf die Expression von Apoptosefaktoren im UC zu untersuchen und auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse ein eingehenderes Verständnis dafür zu entwickeln, wie EPIis im Kontext der Apoptose wirken. Dazu wurden UCCs und die Kontroll-ZL HBLAK mit verschiedenen EPIis behandelt und im Anschluss qRT-PCRs durchgeführt. Wie in Textpassage 4.2.1 dargestellt, wies der DNMTi Decitabin eine vorranging proapoptotische Wirkung auf, was sich an der Expressionssteigerung proapoptotischer Faktoren zeigte, während die Bildung antiapoptotischer Modulatoren gesenkt wurde. Anders als Decitabin führten die HDACis Romidepsin und Quisinostat eine gemischte Regulation herbei, im Rahmen derer es zu einer Expressionssteigerung und -reduktion von sowohl pro- als auch antiapoptotischen Faktoren kam. Im direkten Vergleich beider HDACis wies Quisinostat weniger stark ausgeprägte Effekte auf die Genexpression auf als Romidepsin. Der BETi PLX51107 wies die größte Variabilität aller untersuchten EPIis auf die Genexpression auf, wobei er tendenziell die intrinsische Apoptose förderte. Dies wurde anhand der Induktion von proapototischem BAX offenbar. Die Auswahl fiel auf die genannten EPIis, da sich diese in der Vergangenheit bereits als wirksame Krebsmedikamente erwiesen hatten (Ueda et al., 1994; Arts et al., 2009; Yu et al., 2018) oder in diesem Kontext als vielversprechend gelten (Erkes et al., 2019). Einige Substanzen wurden bereits im UC untersucht, jedoch wurde ihr Einfluss auf die Apoptoseregulation häufig nicht ausreichend berücksichtigt (Li et al., 2016; Wu et al., 2019; Thy et al., 2021).

Die divergierenden Effekte der EPIis auf die Expression von Apoptosefaktoren in UCCs können sowohl auf molekularen Mechanismen beruhen als auch auf die zelluläre Heterogenität des UC zurückgeführt werden. Einen wesentlichen Aspekt stellen darüber hinaus die Wirkmechanismen der EPIis dar, die sich teils deutlich unterscheiden. DNMTis

entfalten ihre Wirkung durch die Reaktivierung von Genen, die zuvor durch Hypermethylierung stumm geschaltet worden waren. Bei den stummgeschalteten Genen kann es sich auch um proapoptotische Vertreter handeln (Sakai et al., 1991). Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass der DNMTi Decitabin darüber hinaus die Expression antiapoptotischer Faktoren im UC fördert. Daraus lässt sich ableiten, dass Hypermethylierungsprozesse an der Expressionsregulation antiapoptotischer Faktoren im UC beteiligt sind und nicht nur proapoptotische Proteine betreffen. Eine Schlussfolgerung, die durch die Forschungsergebnisse von Grunewald et al. (2021) im UC gestützt wird. Die in der Arbeit festgestellte zelllinienabhängige Wirkung von Decitabin könnte auf variierende Methylierungsmuster zwischen den ZL zurückzuführen sein. Jene Vermutung wurde in der Vergangenheit auch in anderen Tumorentitäten bestätigt (Suzuki & Bird, 2008).

HDACis modifizieren das Chromatinmuster, indem sie Einfluss auf die Histonacetylierung nehmen (Furumai et al., 2002; Arts et al., 2009). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass HDACis die Expression proapoptotischer Faktoren verstärken, während die Bildung antiapoptotischer Faktoren reduziert wird (Duan et al., 2005; Condorelli et al., 2008; Bolden et al., 2013). Aus den Ausführungen unter Punkt 4.2.1 geht hervor, dass sich die genannten Erkenntnisse nicht ohne Weiteres auf das UC übertragen lassen. Vielmehr sind die Effekte in UCCs heterogen: Romidepsin reduziert z.B. die Expression verschiedener proapoptotischer Komponenten der intrinsischen und extrinsischen Apoptose, zu denen Smac, Cytochrom c, Pro-Caspase 3 oder der Fas-Ligand zählen. Durch die verminderte Expression proapoptotischer und die gesteigerte Expression antiapoptotischer Faktoren könnte die zelltodinduzierende Wirkung von HDACis negativ beeinflusst werden. Abhilfe stellt die Kombination von HDACis mit weiteren Medikamenten dar. Ramakrishnan et al. (2019) weisen z.B. auf die Potenz einer Kombinationstherapie von Romidepsin mit MEK-Inhibitoren (MEKis) oder BCL-2is im multiplen Myelom hin (Ramakrishnan et al., 2019). Anhand verschiedener Tumorentitäten außerhalb des UC konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Genexpression von Apoptosefaktoren in Abhängigkeit von der ZL und den spezifischen Faktoren durch Romidepsin (Paoluzzi et al., 2010; Cortiguera et al., 2019) und Quisinostat (He et al., 2018; Bao et al., 2016) verändert werden kann. Diese Erkenntnis wurde auch schon im Zusammenhang mit dem UC gewonnen (Hölscher et al., 2018) und unterstreicht dessen molekulare Heterogenität. Besagte Heterogenität könnte eine auf der Apoptose basierende Therapie des UC erschweren, da eine *One-size-fits-all*-Lösung nicht geeignet wäre. Vielmehr scheint ein personalisierter Therapieansatz empfehlenswert. Zwischen den HDACis Romidepsin und Quisinostat bestehen Potenzunterschiede, die

bereits anhand ihrer wirksamen Dosis offenbar werden. Während Romidepsin im nanomolaren Bereich wirksam ist, wurde Quisinostat in dieser Arbeit im zweistelligen mikromolaren Sektor eingesetzt, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen. Die Potenzunterschiede beider Substanzen sind vermutlich auf eine spezifischere Hemmung von HDAC1 und 2 durch Romidepsin zurückzuführen (Furumai et al., 2002). Beide HDACs gehören zur Klasse 1, deren besondere Bedeutung für die Tumorentstehung und das -wachstum anhand von Abbildung 3 nachvollzogen werden kann. Die anderen HDAC-Klassen, z.B. Klasse 2, sind hingegen weniger relevant (Glaser et al., 2003). Quisinostat wird von Pharmaherstellern als pan-HDACi vertrieben (MedChemExpress), was ein breiteres Wirkspektrum im Vergleich zu Romidepsin betont. Dies könnte zulasten der HDAC1 und 2-Inhibition gehen.

BETis, zu denen PLX51107 zählt, verhindern die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit acetylierten Histonen und unterbinden auf diese Weise die Genaktivierung (Filippakopoulos et al., 2010). PLX51107 ist ein weitgehend unerforschter BETi, der bisher nur in wenigen Publikationen Berücksichtigung fand. Eine im März 2025 durchgeführte *PubMed*-Recherche ergab lediglich 21 Treffer für PLX51107 (PubMed). Im UC ist die Datenlage noch begrenzter. Die in der Arbeit ermittelte zelllinienspezifische Wirkung von PLX51107 in UCCs deutet auf das Vorliegen verschiedener, zelltypbezogener Signalwege hin, die durch den BETi beeinflusst werden. Eine Publikation, die sich mit der Wirkung von PLX51107 im UC befasst, berichtet von einer reduzierten BCL-2-Expression (Thy et al., 2021). Die Verwendung von JQ1, einem BETi der ersten Stunde (Filippakopoulos et al., 2010), resultierte im UC in der vermehrten Bildung von BCL-2, BCL-XL und BCL-XS, wobei manche UCCs besonders empfindlich auf die Behandlung reagierten (Hölscher et al., 2018). Anhand beider Studien wird die Genexpressions-modifizierende Wirkung von BETis betont und lässt sich durch Arbeiten in verschiedenen weiteren Krebsentitäten, wie lymphatischen Tumoren (Cummin et al., 2020) oder dem malignen Melanom (Tiago et al., 2020) ergänzen. Vergleichbar mit JQ1 beeinflusst PLX51107 wahrscheinlich verschiedenste Signaltransduktionswege, darunter die MAPK- oder PI3K/AKT-Signalwege. Daraus folgen unterschiedliche Apoptose- oder Überlebenssignale je nach genetischer und epigenetischer Ausstattung der Zelle (Jiang et al., 2020). In bestimmten ZL könnten daher verstärkte proapoptotische Signale auftreten, während in anderen antiapoptotische Mechanismen überwiegen.

Wie eingangs erwähnt, könnten unterschiedliche molekulare Mechanismen und deren Veränderungen Gründe für die variable Wirkung von EPIis im UC darstellen. Bei dem UC

handelt es sich um eine sowohl in genetischer als auch epigenetischer Hinsicht heterogene Tumorart (Robertson et al., 2017). Unterschiede in Methylierungs- und Acetylierungsmustern sowie in der Expression von Apoptose-regulierenden Faktoren, wie p53 (Berggren et al., 2001) oder Rb (Miyamoto et al., 1995), könnten die Empfindlichkeit gegenüber epigenetischen Modulatoren beeinflussen. So könnten Zellen möglicherweise auf die Reaktivierung proapoptotischer Gene mit einer Hochregulation von Überlebensfaktoren reagieren, was die Effektivität einer Therapie schmälern könnte. Darüber hinaus interagieren EPIis mit anderen Signalwegen, wie PI3K/AKT oder MAPK, was das Gesamtergebnis beeinflussen kann.

Die getätigten Beobachtungen und Erläuterungen unterstreichen die Wichtigkeit einer ganzheitlichen Betrachtungsweise des UC und seines zellulären Kontextes. Nur auf diese Weise ist das Treffen effektiver Therapieentscheidungen möglich, die im Idealfall einem individualisierten Ansatz folgen sollten. UC mit hoher DNA-Methylierung könnten auf DNMTis besser ansprechen, während solche, die eine erhöhte HDAC-Aktivität aufweisen, sensibler auf HDACis reagieren würden. Während der Therapie sollte stets auf eine mögliche Überexpression von antiapoptotischen Faktoren geachtet werden, um den Therapieerfolg nicht zu gefährden.

5.2.2 Synergistische Effekte von PARPis und BETis auf die Expression von Apoptosefaktoren im UC

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die kombinierte Behandlung von UCCs mit dem BETi PLX51107 sowie dem PARPi Olaparib überwiegend stärkere Genexpressionsveränderungen der Apoptosefaktoren induzierte als die alleinige Verwendung eines der Medikamente.

PARPis hemmen das Enzym PARP (Rouleau et al., 2010), das an der Reparatur von DNA-Schäden, vornehmlich DSBs, beteiligt ist (Herceg & Wang, 2001) und darüber hinaus auch die Genexpression modulieren kann (Ke et al., 2019). PARPis wirken besonders effizient in Krebserkrankungen, die mit Mutationen in DNA-Reparaturproteinen einhergehen. Diese Mutationen können z.B. *breast cancer gene* (BRCA) 1 oder 2 betreffen (Audeh et al., 2010), sind im UC jedoch tendenziell selten nachweisbar (Mouw, 2017).

Verschiedene Studien haben sich bereits mit den Effekten einer Kombinationstherapie aus BETis und PARPis in Krebserkrankungen auseinandergesetzt und berichteten von einem unterstützenden Effekt auf die Zelltodinduktion. Zu den in dem Zusammenhang untersuchten Tumorentitäten zählten das Ovarial-CA (Lui et al., 2020) sowie Brust- (Yang

et al., 2017) oder Pankreaskrebs (Miller et al., 2019). Vorbestehende Forschungsergebnisse legen nahe, dass die BETis-induzierte Sensibilisierung von Krebszellen gegenüber PARPis eine wichtige Grundlage des Synergismus darstellt (Yang et al., 2017; Thy et al., 2021). Auf welcher Stufe der Sensibilisierungsprozess erfolgt, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Eine Möglichkeit stellt die Ebene der Apoptosefaktoren dar, wie sich anhand von Textabschnitt 4.2.4 zeigt: Die Kombination von PLX51107 und Olaparib führte zu zelllinien- und faktorabhängigen Genexpressionsänderungen in UCCs, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Faktoren betrafen. In manchen Fällen resultierte die Kombination im Vergleich zur Einzelbehandlung in einer verstärkten Expression antiapoptotischer Faktoren, was aus krebstherapeutischer Sicht ungünstig ist und gleichzeitig die Komplexität der zugrunde liegenden Mechanismen betont. Interessanterweise führte die Kombinationsbehandlung in LTTs stärkere Genexpressionsveränderungen herbei als in den parentalen ZL. Grund für diese Beobachtung könnte das vermehrte Aufkommen von Mutationen in DNA-Reparaturgenen in LTTs sein, was sie empfänglicher für eine Behandlung mit PARPis macht. Tatsächlich konnten ForscherInnen in Cisplatin-resistenten Zellen ein vermehrtes Vorkommen von Mutationen der DNA-Reparaturmaschinerie nachweisen (Aebi et al., 1996). Gegen diesen Erklärungsansatz spricht allerdings, dass die Kombination aus einem BETi und einem PARPi auch in Tumoren mit intakter DNA-Reparatur synergistisch wirkt (Yang et al., 2017; Karakashev et al., 2017; Mio et al., 2018). Folglich gilt es andere Begründungen auszuloten. Eine solche könnte sein, dass PARP1 nicht nur an der DNA-Reparatur beteiligt ist, sondern auch an der Regulation der Genexpression mitwirkt, indem es das aufspiralisierte Chromatin öffnet und so die Transkription ermöglicht (Krishnakumar & Kraus, 2010). PARP1 wirkt darüber hinaus an der Aktivierung von Promotoren, *Enhancern* sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren mit, zu denen NFκB (Hassa & Hottiger, 1999), Aktivator-Protein-1 (AP-1) (Andreone et al., 2003) und p53 (Gajewski & Hartwig, 2020) gehören. Letzteres fungiert als bedeutender Regulator der Expression verschiedener Mitglieder der BCL-2-Familie und führt z.B. zu der vermehrten Bildung von BAX (Basu & Haldar, 1998) oder BID (Sax et al., 2002). BETis vermögen die Aktivierung von p53 zu unterstützen (Adams et al., 2018) und könnten auf diese Weise die Genexpression noch einmal mehr steigern.

Die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse betonen den potenziellen Nutzen von Kombinationstherapien im UC. Die Wechselwirkung zwischen PLX51107 und Olaparib könnte UCCs empfindlicher für proapoptotische Stimuli machen, was im klinischen *Setting* hilfreich wäre. Ihre verstärkte Wirkung in LTTs macht Hoffnung auf neue Therapieoptionen,

da die Behandlung des chemotherapieresistenten UC derzeit noch eine große Herausforderung darstellt.

5.3 HDACis induzieren Zelltod im UC

5.3.1 HDACis im UC: Multimechanistische Induktion von Apoptose und Nekrose

Die Effekte von HDACis auf molekularer Ebene sind vielfältig, komplex und daher teils schwer greifbar. Um das errungene Wissen zu konkretisieren und herauszufinden, wie sich die Verwendung von HDACis auf die Zelltodinduktion auswirkt, wurden die UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 sowie die Kontroll-ZL HBLAK mit Romidepsin und Quisinostat behandelt und im Anschluss durchflusszytometrische Zelltod-Messungen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung mit HDACis zu Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose führte, wobei der nekrotische Anteil quantitativ überwog. Das Gros der Zellen blieb nach der Behandlung vital. Die UCCs wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Sensibilität gegenüber Romidepsin und Quisinostat auf, was auf eine selektive Wirkung von HDACis in Krebszellen hindeutet. Darin könnte ein entscheidender Vorteil gegenüber herkömmlichen Krebsmedikamenten, wie Cisplatin, bestehen, die auch gesundes Gewebe schädigen.

Verschiedene Studien haben bereits auf die selektive Wirksamkeit von HDACis in Krebszellen verwiesen, während normales Gewebe nach einer Behandlung überwiegend intakt blieb. Die vorhandenen Forschungen beziehen sich sowohl auf das UC (Hoffmann et al., 2021; Paillas et al., 2020), als auch auf weitere Krebserkrankungen (Ueda et al., 1994; Byrd et al., 1999). ForscherInnen haben die vermehrte Expression von P-Glykoprotein (P-gp) als einen Resistenzmechanismus gegen Romdepsin identifiziert (Robey et al., 2011). Es besteht die Möglichkeit, dass HBLAK mehr P-gp exprimiert als die untersuchten UCCs, was ihm eine relative Resistenz gegenüber HDACis verleiht. Paillas et al. (2020) zeigten, dass Romidepsin in UCCs DNA-Schäden hervorrief, während solche in gesundem Harnblasengewebe nicht detektierbar waren (Paillas et al., 2020). Es besteht die Möglichkeit, dass gesunde Zellen über eine intaktere DNA-Reparaturmaschinerie verfügen als Krebszellen, wodurch sie in der Lage sind, Schädigungen des Erbmaterials effektiver zu korrigieren und dadurch vital zu bleiben. Darüber hinaus konnte anhand von Kapitel 4.2 gezeigt werden, dass HDACis die Expression von Apoptosefaktoren in UCCs stärker veränderten als in der Kontroll-ZL HBLAK, wodurch das Zellsterben nochmal stärker induziert werden könnte.

Wie eingangs erwähnt, ergaben die eigenen Messungen, dass das Gros der Zellen nach einer Behandlung mit HDACis lebendig blieb, während sich der überwiegende Rest in Nekrose oder dem Stadium der Spätapoptose wiederfand. Die Ergebnisse unterscheiden sich damit von den Befunden von Hölscher et al. (2018), nach denen Romidepsin in der UCC VM-CUB-1 überwiegend frühapoptotisches Zellsterben induzierte, während nur wenige Zellen durch Nekrose zugrunde gingen (Hölscher et al., 2018). Die festgestellten Unterschiede könnten auf unterschiedliche Behandlungszeiten und -dosierungen zurückzuführen sein. Dass HDACis zu apoptotischem Zellsterben führen, überrascht nicht und zeigt sich auch daran, dass sie z.B. die extrinsische Apoptose aktivieren, indem die Bildung von Todesrezeptoren (Zhang & Zong, 2014) sowie deren Liganden (Nebbioso et al., 2004; Zhang & Zong, 2014) gesteigert wird. Darüber hinaus *triggern* HDACis die Bildung von ROS, die wiederum Zellschäden induzieren und auf diesem Weg zur Apoptose führen (Mizutani et al., 2010). HDACis stellen Zellgifte dar, was sich an ihrem umfangreichen Nebenwirkungsprofil zeigt (Frye et al., 2012). Die bestehende Zytotoxizität kann als Auslöser für Nekrose betrachtet werden.

Die Beobachtung, dass das Gros der Zellen nach einer Behandlung mit HDACis vital bleibt, könnte mit der vermehrten Expression ausgewählter antiapoptotischer Faktoren begründet werden (vgl. 4.2.1). Darüber hinaus ist bekannt, dass HDACis im UC zu Zellzyklusarrest führen, bevorzugt in der G2/M-Phase (Hoffmann et al., 2021), aber auch im Bereich der G1/S-Transition, was sich an der erhöhten Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 zeigt (Satyanarayana et al., 2008). Zellen, die sich in einem Zellzyklusarrest befinden, bleiben vital und durchlaufen weder Apoptose noch Nekrose. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass stets ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren über Zelltod oder -überleben entscheidet und die im Verlauf des Textes genannten Aspekte lediglich als Beispiele für ein komplexeres Gefüge im Hintergrund gewertet werden sollten.

5.3.2 Der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 führt zu Zelltod und DSBs im UC

Im Anschluss an die Untersuchung der Folgen einer HDACis-Behandlung auf die Zelltodform in UCCs, wurden die Experimente unter Verwendung von HDAC-spezifischer siRNA wiederholt, um einen Wirkungsvergleich zwischen beiden Substanzgruppen zu ermöglichen. Besonders relevant war in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Hemmung oder der Verlust einzelner HDAC-Proteine stärker zelltodinduzierend wirkt. Die Applikation von siRNA resultierte in dem einzelnen *Knockdown* von HDAC1, 2 oder 3 sowie in dem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2. Letzterer wies die stärkste

zelltodinduzierende Wirkung auf. Romidepsin ähnelte in seiner Potenz dem kombinierten *Knockdown* von HDAC1 und 2, während Quisinostat insgesamt weniger Zelltod auslöste.

Eine Behandlung mit HDAC-spezifischer siRNA reduziert die Bildung der *targetierten* HDACs, wobei eine vollständige Expressions-Suppression nicht immer gewährleistet ist (Elbashir et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Behandlungen führten zu einer deutlichen Reduktion der HDAC-Expression in UCCs, ein vollständiger Proteinverlust war jedoch nicht zu verzeichnen. Das bedeutet, dass trotz suffizienter Behandlung ein Teil der HDACs aktiv bleibt, wodurch die zum Zelltod führende Wirkung von HDAC-siRNA geschmälert wird. In Bezug auf HDACis gilt es zu erwähnen, dass diese neben der Hemmung von HDACs weitere, nicht-kanonische Wirkmechanismen aufweisen, die die zelltodinduzierende Wirkung im Vergleich zu einem HDAC-*Knockdown* nochmals verstärken könnte. Zu den nicht-kanonischen Effekten zählt u.a. die Induktion von oxidativem Stress (Ruefli et al., 2001) oder von DNA-Schäden (Rosato et al., 2010), die in der Zusammenschau die Propaoptose fördern. Auffällig ist jedoch, dass Quisinostat gemäß 4.3.1 und 4.3.2 zu weniger Zelltod führt als ein siRNA-vermittelter HDAC-*Knockdown*, was darauf hindeutet, dass die erwähnten nicht-kanonischen Effekte von HDACis nicht dazu führen, dass HDACis einem HDAC-*Knockdown* prinzipiell überlegen sind. Die geringere Potenz von Quisinostat könnte damit zusammenhängen, dass HDACs trotz medikamentöser Hemmung noch dazu in der Lage sind, an der Bildung von Multiprotein-Co-Repressor-Komplexen mitzuwirken, die an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind. Ein vollständiger HDAC-*Knockdown* könnte diese Partizipation unterbinden.

Die in Textabschnitt 4.3.2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass der kombinierte *Knockdown* von HDAC1 und 2 eine ausgeprägte Zelltodinduktion in UCCs zur Folge hat, was die Bedeutung genannter HDACs für das Überleben und die Persistenz des UC hervorhebt. Die Effizienz eines kombinierten *Knockdowns* von HDAC1 und 2 gegenüber einem Einzel-*Knockdown* auf die Zelltodinduktion wurde auch in anderen Krebsarten beschrieben. Dort wurde beobachtet, dass der *Knockdown* einer einzelnen HDAC zu einer kompensatorischen Überexpression des jeweils anderen Isoenzyms führte, was als ursächlich für die beobachteten Potenzunterschiede angenommen wurde (Lagger et al., 2002; Lin et al., 2019). Diese Annahme lässt sich möglicherweise auf das UC übertragen und wurde in diesem Kontext bereits von Pinkerneil et al. (2016) aufgegriffen. Die ForscherInnen bestätigten die Hypothese, indem sie zeigten, dass der gleichzeitige *Knockdown* von HDAC1 und 2 in UCCs zu mehr Apoptose führte als der Einzel-*Knockdown*. Auch in diesem Fall konnte eine kompensatorische Überexpression des jeweils anderen Isoenzyms beobachtet werden, wobei

die Mehrexpression von HDAC2 weniger stark ausgeprägt war als die von HDAC1 (Pinkerneil et al., 2016). Dieser Umstand könnte eine Begründung dafür liefern, warum der *Knockdown* von HDAC1 in den UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3 effektiver Zelltod induzierte als der *Knockdown* von HDAC2. Die enge Verbindung von HDAC1 und 2 ist nicht überraschend, schließlich weisen beide Enzyme nicht nur überlappende Funktionen auf (Hontecillas-Prieto et al., 2020), sondern stellen Bestandteile derselben Multiprotein-Co-Repressor-Komplexe dar (Kelly & Cowley, 2013). Besagte Komplexe spielen eine wichtige Rolle für die Regulierung der DNA-Reparatur sowie der Apoptose (Smeenk et al., 2010) und wirken zudem als Transkriptionsregulatoren (Konwar et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Inhibition von HDAC1 und 2 Potenzial für die suffiziente Therapie des UC hat und weiter erforscht werden sollte. Die Hemmung kann durch die Verwendung von siRNA oder Inhibitoren, wie Romidepsin, erfolgen. In dem Zusammenhang ist es jedoch wichtig herauszustellen, dass sich nicht jeder Inhibitor gleichermaßen für die Therapie des UC eignet, wie am Beispiel von Quisinostat deutlich wird.

5.4 Kombinationsbehandlungen von HDACis und BCL-2is im UC

5.4.1 Synergistische Effekte der HDACis- und Venetoclax-Kombination

Anhand von Kapitel 4.2 konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der HDACis Romidepsin und Quisinostat im UC in einer vermehrten Expression antiapoptotischer Faktoren, darunter BCL-2, resultieren kann. Da dieser Umstand die Apoptose fördernde Wirkung von HDACis einschränkt, sollte der Effekt einer Kombinationsbehandlung aus HDACis mit dem BCL-2i Venetoclax näher untersucht werden. Die Kombinationsbehandlung zeigte eine dosis- sowie zelllinienabhängige Wirkung. Die Kombination aus Romidepsun mit Venetoclax wies in geringen Dosen einen synergistischen Effekt auf, der später in einen Antagonismus mündete. Das Zusammenspiel von Quisinostat mit Venetoclax war von Beginn an antagonistischer Natur.

Verschiedene Studien haben sich bereits mit dem Effekt einer Kombinationsbehandlung aus HDACis mit BCL-2is, wie Obatoclax oder befasst, darunter sowohl in soliden Tumoren wie dem Glioblastom (Pont et al., 2014) als auch in Lymphomen (Xargay-Torrent et al., 2011). In beiden Tumorarten wurde ein überwiegend synergistischer Effekt beobachtet (Pont et al., 2014; Xargay-Torrent et al., 2011), der im Falle des CTCL aber erst bei höheren Dosierungen auftrat (Cyrenne et al., 2017).

Neben den Effekten von Romidepsin auf die Expression von Apoptoseregulatoren ist denkbar, dass weitere Mechanismen für die synergistische Wirkung ursächlich sind. So stellten Cyrenne et al. (2017) fest, dass die Kombination von Romidepsin mit Venetoclax zu einer stärkeren Caspase-Aktivierung führte als dies eine Einzeltherapie tat (Cyrenne et al., 2017).

Neben synergistischen Aspekten beobachteten wir auch antagonistische Elemente, die auf zelluläre Abwehrmechanismen gegen den Zelltod zurückzuführen sein könnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen.

5.4.2 Die begrenzte Anwendbarkeit von Navitoclax im UC

Im Zuge der IC50-Bestimmung von Navitoclax in UCCs und der Kontroll-ZL HBLAK stellte sich heraus, dass die UCCs wenig sensitiv auf eine Behandlung mit Navitoclax reagierten, während das Medikament in der Kontroll-ZL bereits in geringen Dosen starkes Zellsterben induzierte.

Bei Navitoclax handelt es sich um eine Substanz, die zu einer Hemmung der antiapoptotischen Faktoren BCL-2, BCL-XL sowie BCL-W führt (Tse et al., 2008) und den Vorläufer von Venetoclax darstellt (Souers et al., 2013). Studien haben gezeigt, dass sich die Navitoclax-Sensitivität in Abhängigkeit von der betrachteten Krebsentität unterscheidet. Während maligne hämatologische Erkrankungen überwiegend empfindlich auf eine Behandlung mit Navitoclax reagieren, stellt sich dies bei soliden Tumoren anders dar (Tse et al., 2008). Da das UC den soliden Tumoren zuzurechnen ist, ist es nachvollziehbar, dass die in der Arbeit generierten Daten hohe IC50-Werte für Navitoclax ergaben und damit auf eine reduzierte Sensitivität gegenüber der Substanz hindeuten. Diese Sensitivitätsreduktion ist möglicherweise auf Veränderungen in der Genexpression von Apoptosefaktoren zurückzuführen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von BCL-2 und BCL-XL Zellen für Navitoclax sensibilisierte, während MCL-1 sowie ein Mangel der proapoptotischen Faktoren BAX und BAK das Auftreten einer Navitoclax-Resistenz begünstigten (Tse et al., 2008). Zusätzlich hemmt Navitoclax BCL-2, BCL-XL und BCL-W unterschiedlich stark, wobei die Hemmung von BCL-2 von besonderer Relevanz zu sein scheint (Rooswinkel et al., 2012). Der *Human Protein Atlas* zeigt, dass normale Blasen-ZL mehr BCL-2 und BCL-XL exprimieren als UCCs (Human Protein Atlas). Dies könnte ein Erklärungsansatz für die gesteigerte Sensitivität von HBLAK gegenüber Navitoclax sein.

Die Ergebnisse legen nahe, dass sich Navitoclax nicht für die Behandlung des UC eignet. Dies ist vorrangig auf die ausgeprägte Toxizität gegenüber der normalen Blasen-ZL HBLAK

zurückzuführen, bei gleichzeitiger relativer Unempfindlichkeit der UCCs. Zudem kann die Anwendung von Navitoclax zu einem Blutplättchenmangel führen (Rudin et al., 2012), was die Substanz für den klinischen Gebrauch zusätzlich unattraktiv macht. Zukünftig sollten weitere benigne Zellarten auf ihre Sensitivität gegenüber Inhibitoren der BCL-Familie untersucht werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: *Eigene Darstellung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose*..... 5
Abb. 2: *Übersicht über die epigenetischen Modifikationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden*..... 9
Abb. 3: *Übersicht über die verschiedenen Prozesse, an denen HDACs in Krebserkrankungen beteiligt sind*..... 13
Abb. 4: *Beispielhafte Auswertung einer FACS-Messung* 33
Abb. 5: *Die proapoptotischen Faktoren FADD und TRADD sind in UCCs fehlreguliert* .. 44
Abb. 6: *Die proapoptotischen Faktoren BID und BAX sind in UCCs fehlreguliert*..... 45
Abb. 7: *Die proapoptotischen Faktoren DAXX und BCL-XS sind in UCCs fehlreguliert*... 47
Abb. 8: *Die antiapoptotischen Faktoren BCL-2 und MCL-1 sind in UCCs fehlreguliert*... 48
Abb. 9: *Die antiapoptotischen Faktoren BIRC3 und BIRC5 sind in UCCs fehlreguliert*.... 50
Abb. 10: *Der antiapoptotische Faktor BCL-XL ist in UCCs fehlreguliert*..... 51
Abb. 11: *Nachweis von proapoptotischem BID und antiapoptotischem BCL-2 auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK*..... 52
Abb. 12: *Beispielhafte Darstellung ausgewählter Apoptosefaktor-Kombinationen*..... 54
Abb. 13: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren FADD und TRADD in UCCs*..... 56
Abb. 14: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren BID und BAX in UCCs* 58
Abb. 15: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der proapoptotischen Faktoren DAXX und BCL-XS in UCCs*..... 59
Abb. 16: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der antiapoptotischen Faktoren BCL-2 und MCL-1 in UCCs* 61
Abb. 17: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression der antiapoptotischen Faktoren BIRC3 und BIRC5 in UCCs*..... 63
Abb. 18: *Die Behandlung mit EPIis sowie mit siRNA verändert die Expression des antiapoptotischen Faktors BCL-XL in UCCs* 64
Abb. 19: *Nachweis von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL sowie von cleaved PARP auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat*..... 65

Abb. 20: *Nachweis von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL sowie von cleaved PARP auf Proteinebene in verschiedenen UCCs sowie in der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit HDAC-siRNA* 66
Abb. 21: *Nachweis verschiedener proapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene in UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit dem Zytostatikum Etoposid* 67
Abb. 22: *Nachweis verschiedener antiapoptotisch wirkender Faktoren auf Proteinebene in UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat sowie mit dem Zytostatikum Etoposid* 69
Abb. 23: *Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von proapoptotischen Faktoren in UCCs und korrespondierenden LTTs* 71
Abb. 24: *Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von antiapoptotischem BCL-2 und BCL-XL in UCCs und korrespondierenden LTTs* 72
Abb. 25: *Die Behandlung mit Olaparib und PLX51107 verändert die Expression von antiapoptotischem BIRC3 und BIRC5 in UCCs und korrespondierenden LTTs* 73
Abb. 26: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat* 75
Abb. 27: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC VM-CUB-1 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat* 76
Abb. 28: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDACis Romidepsin und Quisinostat* 77
Abb. 29: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der Kontroll-ZL HBLAK nach Behandlung mit den HDAC-siRNA* 79
Abb. 30: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC VM-CUB-1 nach Behandlung mit den HDAC-siRNA* 80
Abb. 31: *Durchflusszytometrische Zelltodanalyse der UCC UM-UC-3 nach Behandlung mit den HDAC-siRNA* 81
Abb. 32: *Nachweis über den erfolgreichen Einzel-Knockdown von HDAC1, 2 und 3 sowie über den kombinierten Knockdown von HDAC1 und 2 mittels HDAC-siRNA in der Kontroll-ZL HBLAK sowie in den UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3* 83
Abb. 33: *Nachweis von DSBs und Zellkernen in HBLAK nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA* 84
Abb. 34: *Nachweis von DSBs und Zellkernen in VM-CUB-1 nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA* 85

Abb. 35: *Nachweis von DSBs und Zellkernen in UM-UC-3 nach einer Behandlung mit HDAC-siRNA* 86
Abb. 36: *Die IC50-Werte von Venetoclax fallen in der Kontroll-ZL HBLAK gering aus* ... 88
Abb. 37: *Die Kombination von Romidepsin mit Venetoclax wirkt in Abhängigkeit von der betrachteten UCC und der Dosierung synergistisch oder antagonistisch* 89
Abb. 38: *Die Kombination von Quisinostat mit Venetoclax wirkt in Abhängigkeit von der betrachteten UCC und der Dosierung synergistisch oder antagonistisch* 90
Abb. 39: *Die IC50-Werte von Navitoclax fallen in der Kontroll-ZL HBLAK sehr gering aus*. 91
Abb. 40: *Die IC50-Werte von Navitoclax in UCCs VM-CUB-1 und UM-UC-3* 92

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: *Übersicht über die verwendeten Zelllinien* 18
Tabelle 2: *Übersicht über die verwendeten Zellkulturmaterialien* 19
Tabelle 3: *Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien* 20
Tabelle 4: *Übersicht über die verwendeten Pharmaka* 20
Tabelle 5: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die siRNA-Transfektion* 20
Tabelle 6: *Übersicht über die verwendeten Materialien für den MTT-Test* 21
Tabelle 7: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die FACS-Messungen* 21
Tabelle 8: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die Immunfluoreszenzfärbung.* 21
Tabelle 9: *Übersicht über den verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung* 22
Tabelle 10: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die RNA-Isolation* 22
Tabelle 11: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung der qRT-PCR* 22
Tabelle 12: *Übersicht über die verwendeten Primer für die qRT-PCR* 23
Tabelle 13: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die Proteinextraktion* 24
Tabelle 14: *Übersicht über die Inhaltsstoffe des RIPA-Puffers* 24
Tabelle 15: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung eines BCA-Tests* 24
Tabelle 16: *Übersicht über die verwendeten Materialien für Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE und Western Blot* 24
Tabelle 17: *Übersicht über die verwendeten Chemikalien für Puffer und Polyacrylamid (PAA)-Gele* 25
Tabelle 18: *Pufferzusammensetzung für SDS-PAGE und Western Blot* 25
Tabelle 19: *Übersicht über die verwendeten primären Antikörper für den Western Blot* ... 26
Tabelle 20: *Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper für den Western Blot.* 26
Tabelle 21: *Übersicht über die verwendeten Materialien für das Stripping* 26
Tabelle 22: *Übersicht über die verwendeten Materialien für die Durchführung des Proteome Profiler Arrays* 26
Tabelle 23: *Übersicht über die verwendete Software* 27
Tabelle 24: *Menge ausgesäter Zellen pro Well in 6-Well-Platten* 29

Tabelle 25: *Menge ausgesäter Zellen pro Well in 96-Well-Platten* 29
Tabelle 26: *Übersicht über die IC50-Werte der im MTT-Test verwendeten Substanzen*..... 30
Tabelle 27: *Auflistung der verwendeten Wirkstoffkonzentrationen von Romidepsin, Quisinostat und Venetoclax im Rahmen des MTT-Tests*..... 30
Tabelle 28: *Verschiedene Dosierungen zur IC50-Bestimmung von Navitoclax* 31
Tabelle 29: *Übersicht über die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen für die Zelltodanalysen* 32
Tabelle 30: *Zusammensetzung des FACS-Mastermix* 32
Tabelle 31: *Zusammensetzung der Ansätze 1 und 2 sowie deren Mengenangaben* 33
Tabelle 32: *Komponenten des ersten Mastermixes für die reverse Transkription* 36
Tabelle 33: *Komponenten des zweiten Mastermixes für die reverse Transkription* 36
Tabelle 34: *Zusammensetzung des Primermixes für die qRT-PCR* 37
Tabelle 35: *Zusammensetzung des Lysemixes für die Proteinextraktion* 37
Tabelle 36: *Übersicht über die Standardlösungen und deren jeweiliger Konzentration für den BCA-Test* 38
Tabelle 37: *Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels* 39
Tabelle 38: *Zusammensetzung von 100 ml mildem Strippingpuffer*..... 40
Tabelle 39: *Übersicht über die verwendeten Substanzen für den Proteome Profiler Array und deren jeweilige Konzentration* 40
Tabelle 40: *Tabellarische Zusammenfassung der berechneten Korrelationskoeffizienten (r) verschiedener Apoptosefaktor-Kombinationen*..... 53
Tabelle 41: *Übersicht über die Expression diverser Apoptosefaktoren in häufigen Krebsarten im Vergleich zum Normalgewebe (n).*..... 94
Tabelle 42: *Übersicht über die Expression diverser Apoptosefaktoren in gängigen UCCs im Vergleich zum Normalgewebe (Kontrolle)*..... 95

8 Literaturverzeichnis[1]

Adams, J. M. & Cory, S. (2001). “Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family.” Trends in Biochemical Sciences 26(1): 61-66.

Adams, P. D., Latif, A. L., Newcombe, A., Robertson, N., Terradas, M., Stewart, H., Reid, C., Delori, L. R., Chevassut, T., Huang, X., Keeshan, K., Blyth, K. & Copland, M. (2018). “BET Inhibitors Potentiate Activation of p53 and Killing of AML By MDM2 Inhibitors — a Candidate Combination Therapy.” Blood 132(1): 3912.

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R. & Howell, S. B. (1996). “Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin.” Cancer Research 56(13): 3087-3090.

Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. (1964). “Acetylation and Methylation of Histones and their possible Role in the Regulation of RNA Synthesis.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 51(5): 786-794.

Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. (1997). “A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.” Nature Medicine 3: 917-921.

Andersson, K.-E. & Arner, A. (2004). “Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology.” Physiological Reviews 84(3): 935-986.

Andreone, T. L., O'Connor, M., Denenberg, A., Hake, P. W. & Zingarelli, B. (2003). “Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts.” Journal of Immunology 170(4): 2113-2120.

Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B. & Kumar, D. (2021). “Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism.” Antioxidants 10(5): 642.

Arts, J., King, P., Mariën, A., Floren, W., Beliën, A., Janssen, L., Pilatte, I., Roux, B., Decrane, L., Gilissen, R., Hickson, I., Vreys, V., Cox, E., Bol, K., Talloen, W., Goris, I., Andries, L., Du Jardin, M., Janicot, M., Page, M., van Emelen, K. & Angibaud, P. (2009). “JNJ-26481585, a novel "second-generation" oral histone deacetylase inhibitor, shows broad-spectrum preclinical antitumoral activity.” Clinical Cancer Research 15(22): 6841-6851.

Asangani, I. A., Dommeti, V. L., Wang, X., Malik, R., Cieslik, M., Yang, R., Escara-Wilke, J., Wilder-Romans, K., Dhanireddy, S., Engelke, C., Iyer, M. K., Jing, X., Wu, Y. M., Cao, X., Qin, Z. S., Wang, S., Feng, F. Y., “Chinnaiyan AM. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer.” Nature 510(7504): 278-282.

Ashkenazi, A. & Dixit, V. M, (1998). “Death Receptors: Signaling and Modulation.” Science 281: 1305-1308.

Audeh, M. W., Carmichael, J., Penson, R. T., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K. M., Scott, C., Weitzel, J. N., Oaknin, A., Loman, N., Lu, K., Schmutzler, R. K., Matulonis, U., Wickens, M. & Tutt, A. (2010). “Oral poly(ADP-ribose) polymerase

[1] Alle verwendeten Internetquellen wurden zuletzt abgerufen am 7.4.2025.

inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial." The Lancet 376(9737): 245-251.

Bao, L., Diao, H., Dong, N., Su, X., Wang, B., Mo, Q., Yu, H., Wang, X. & Chen, C. (2016). "Histone deacetylase inhibitor induces cell apoptosis and cycle arrest in lung cancer cells via mitochondrial injury and p53 up-acetylation." Cell Biology and Toxicology 32(6): 469-482.

Bao, Q. & Shi, Y. (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death & Differentiation 14, 56-65.

Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ørntoft, T., Lukas, J. & Bartek, J. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." Nature 434(7035): 864-870.

Basu, A. & Haldar S. (1998). "The relationship between BcI2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death." Molecular Human Reproduction. 4(12): 1099-1109.

Beijert, I. J., Wever, B. M. M., Hentschel, A. E., van den Burgt, Y., Kauer, P. C., Lissenberg-Witte, B. I., van Moorselaar, R. J. A., Steenbergen, R. D. M. & Nieuwenhuijzen, J. A. (2024). "Bladder cancer detection in urine by novel methylation markers." Scientific Reports 14: 28705:

Benassi, B., Fanciulli, M., Fiorentino, F., Porrello, A., Chiorino, G., Loda, M., Zupi, G. & Biroccio, A. (2006). "c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress." Molecular Cell 21(4): 509-519.

Bender, L. M., Morgan, M. J., Thomas, L. R., Liu, Z.-G. & Thorburn, A. (2005). "The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm." Cell Death & Differentiation 12: 473-481.

Berggren, P., Steineck, G., Adolfsson, J., Hansson, J., Jansson, O., Larsson, P., Sandstedt, B., Wijkström, H. & Hemminki, K. (2001). "p53 mutations in urinary bladder cancer." British Journal of Cancer 84(11): 1505-1511.

Berghauser Pont, L. M., Spoor, J. K., Venkatesan, S., Swagemakers, S., Kloezeman, J. J., Dirven, C. M., van der Spek, P. J., Lamfers, M. L. & Leenstra, S. (2014). "The Bcl-2 inhibitor Obatoclax overcomes resistance to histone deacetylase inhibitors SAHA and LBH589 as radiosensitizers in patient-derived glioblastoma stem-like cells." Genes & Cancer 5(11-12): 445-459.

Bestor, T. H. (1992). "Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain." The EMBO Journal 11(7): 2611-2617.

Bhattacharjee, S., Sullivan, M. J., Wynn, R. R., Demagall, A., Hendrix, A. S., Sindhwani, P., Petros, F. G. & Nadiminty, N. (2022). "PARP inhibitors chemopotentiate and synergize with cisplatin to inhibit bladder cancer cell survival and tumor growth." BMC Cancer 22(1): 312.

Bhattacharya, S., Ray, R. M. & Johnson, L. R. (2005). "STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells." Biochemical Journal 392(Pt 2): 335-344.

Bilim, V., Kasahara, T., Hara, N., Takahashi, K. & Tomita, Y. (2003). "Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of

XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro." The International Journal Cancer 103(1): 29-37.

Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes & Development 16(1): 6-21.

Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nuñez, G. & Thompson, C. B. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell 74(4): 597-608.

Bolden, J. E., Shi, W., Jankowski, K., Kan, C. Y., Cluse, L., Martin, B. P., MacKenzie, K. L., Smyth, G. K. & Johnstone, R. W. (2013). "HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses." Cell Death & Disease 4(2): e519.

Bradner, J. E., Hnisz, D. & Young, R. A. (2017). "Transcriptional Addiction in Cancer." Cell 168(4): 629-643.

Bratton, S. B., Walker, G., Srinivasula, S. M., Sun, X. M., Butterworth, M., Alnemri, E. S. & Cohen, G. M. (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." The EMBO Journal 20(5): 998-1009.

Brueckner, B., Garcia Boy, R., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M. & Lyko, F. (2005). "Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases." Cancer Research 65(14): 6305-6311

Bubeník, J., Baresová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H. & Donner, J. (1973). "Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen." International Journal of Cancer 11(3): 765-773.

Butler, L. M., Agus, D. B., Scher, H. I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H. T., Rifkind, R. A., Marks, P. A. & Richon, V. M. (2000). "Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo." Cancer Research 60(18): 5165-5170.

Buttigliero, C., Tucci, M., Vignani, F., Scagliotti, G. V. & Di Maio, M. (2017). "Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer". Cancer Treatment Reviews 54: 1-9.

Byrd, J. C., Shinn, C., Ravi, R., Willis, C. R., Waselenko, J. K., Flinn, I. W., Dawson, N. A. & Grever, M. R. (1999). "Depsipeptide (FR901228): a novel therapeutic agent with selective, in vitro activity against human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." Blood 94(4): 1401-1408.

Calabrese, C. R., Almassy, R., Barton, S., Batey, M. A., Calvert, A. H., Canan-Koch, S., Durkacz, B. W., Hostomsky, Z., Kumpf, R. A., Kyle, S., Li, J., Maegley, K., Newell, D. R., Notarianni, E., Stratford, I. J., Skalitzky, D., Thomas, H. D., Wang, L. Z., Webber, S. E., Williams, K. J. & Curtin, N. J. (2004). "Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361." Journal of the National Cancer Institute 96(1): 56-67.

Canan Koch, S. S., Thoresen, L. H., Tikhe, J. G., Maegley, K. A., Almassy, R. J., Li, J., Yu, X. H., Zook, S. E., Kumpf, R. A., Zhang, C., Boritzki, T. J., Mansour, R. N., Zhang, K. E., Ekker, A., Calabrese, C. R., Curtin, N. J., Kyle, S., Thomas, H. D., Wang, L. Z., Calvert, A. H., Golding, B. T., Griffin, R. J., Newell, D. R., Webber, S. E. &

Hostomsky, Z. (2002). "Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure." Journal of Medicinal Chemistry 45(23): 4961-4974.

Carrington, P. E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J. M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y. & Werner, M. H. (2006). "The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8." Molecular Cell 22(5): 599-610.

Carullo, N. V. N. & Day, J. J. (2019). "Genomic Enhancers in Brain Health and Disease." Genes 10(1): 43.

Chalasani, V., Chin, J. L. & Izawa, J. I. (2013). "Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer." Canadian Urological Association Journal, 3(6-S4): 193-198.

Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E. & Yang. X. (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." The EMBO Journal 21(14): 3704-3714.

Chapman, E. J., Hurst, C. D., Pitt, E., Chambers, P., Aveyard, J. S. & Knowles, M. A. (2006). "Expression of hTERT immortalises normal human urothelial cells without inactivation of the p16/Rb pathway." Oncogene 25(36): 5037-5045.

Chen, L. Y. & Chen, J. D. (2003). "Daxx Silencing Sensitizes Cells to Multiple Apoptotic Pathways." Molecular and Cellular Biology 23(20): 7108-7121.

Chen, X., Wang, T., Yang, D., Wang, J., Li, X., He, Z., Chen, F., Che, X. & Song, X. (2013). „Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients." Oncology Letters 1278-1284.

Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. & Korsmeyer, S. J. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Molecular Cell 8(3): 705-711.

Cheng, L., Montironi, R., Davidson, D. D. & Lopez-Beltran, A. (2009). "Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder." Modern Pathology 22, 70-95.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell 81(4): 505-512.

Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. & Green, D. R. (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." Science 303(5660): 1010-1014.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. & Lutz, R. J. (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." The EMBO Journal 14(22): 5589-5596.

Cho, H. J., Kim, J. K., Kim, K. D., Yoon, H. K., Cho, M. Y., Park, Y. P., Jeon, J. H., Lee, E. S., Byun, S. S., Lim, H. M., Song, E. Y., Lim, J. S., Yoon, D. Y., Lee, H. G. & Choe, Y. K. (2006). "Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells." Cancer Letters 237(1): 56-66.

Choudhary, S., Rathore, K. & Wang, HC. R. (2011). "Differential induction of reactive oxygen species through Erk1/2 and Nox-1 by FK228 for selective apoptosis of

oncogenic H-Ras-expressing human urinary bladder cancer J82 cells." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 137: 471-480.

Christoph, F., Kempkensteffen, C., Weikert, S., Köllermann, J., Krause, H., Miller, K., Schostak, M. & Schrader, M. (2006). "Methylation of tumour suppressor genes APAF- 1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer." British Journal of Cancer 95(12): 1701-1707.

Condorelli, F., Gnemmi, I., Vallario, A., Genazzani, A. A. & Canonico, P. L. (2008). "Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells." British Journal of Pharmacology 153(4): 657-68.

Cook, M. B., Dawsey, S. M., Freedman, N. D., Inskip, P. D., Wichner, S. M., Quraishi, S. M., Devesa, S. S. & McGlynn, K. A. (2009). "Sex Disparities in Cancer Incidence by Period and Age." Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention 18(4): 1174-1182.

Cortiguera, M. G., García-Gaipo, L., Wagner, S. D., León, J., Batlle-López, A. & Delgado, M. D. (2019). "Suppression of BCL6 function by HDAC inhibitor mediated acetylation and chromatin modification enhances BET inhibitor effects in B-cell lymphoma cells." Scientific Reports 9(1): 16495.

Costello, J. F., Berger, M. S., Huang, H. S. & Cavenee, W. K. (1996). "Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation." Cancer Research 56(10): 2405-2410.

Costello, J. F., Berger, M. S., Huang, H. S. & Cavenee, W. K. (1996). "Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation." Cancer Research 56(10): 2405-2410.

Criscuolo, D., Morra, F., Giannella, R., Visconti, R., Cerrato, A. & Celetti, A. (2019). "New combinatorial strategies to improve the PARP inhibitors efficacy in the urothelial bladder Cancer treatment." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 38(1): 91.

Cumberbatch, M. G. & Noon, A. P. (2019). "Epidemiology, aetiology and screening of bladder cancer". Translational Andrology and Urology 8(1): 5-11.

Cummin, T. E. C., Cox, K. L., Murray, T. D., Turaj, A. H., Dunning, L., English, V. L., Fell, R., Packham, G., Ma, Y., Powell, B., Johnson, P. W. M., Cragg, M. S. & Carter, M. J. (2020). "BET inhibitors synergize with venetoclax to induce apoptosis in MYC-driven lymphomas with high BCL-2 expression." Blood Advances 4(14): 3316-3328.

Cunin, P., Beauvillain, C., Miot, C., Augusto, J. F., Preisser, L., Blanchard, S., Pignon, P., Scotet, M., Garo, E., Fremaux, I., Chevailler, A., Subra, J. F., Blanco, P., Wilson, M. R., Jeannin, P. & Delneste, Y. (2016). "Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses." Cell Death & Disease 7(5): e2215.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G. G. (1999). "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions." Biochemical Journal 342 (Pt 2): 2492-2468.

Dasari, S. & Tchounwou, P. B. (2014). "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action." European Journal of Pharmacology 740: 364-378.

De Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N. & Hussain, M. (2020). "Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." The New England Journal of Medicine 382(22): 2091-2102.

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." Biochemical Journal 370(Pt 3): 737-749.

Deeks, E. D. (2016). "Venetoclax: First Global Approval." Drugs 76: 979-987.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K. & Zhou, M. M. (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." Nature 399(6735): 491-6.

Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J. C., Fröse, K., Heitmann, J., Hoppe, C., Iggena, D., Jazmati, D., Karschnia, P., Linsenmeier, M., Maulhardt, T., Möhrmann, L., Morstein, J., Paffenholz, S. V., Röpenack, P., Rückert, T., Sandig, L., Schell, M., Steinmann, A., Voss, G., Wasmuth, J., Weinberger, M. E. & Wullenkord, R. (2016). "The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations." EMBO Molecular Medicine 8(5): 442-457.

Doi, S., Soda, H., Oka, M., Tsurutani, J., Kitazaki, T., Nakamura, Y., Fukuda, M., Yamada, Y., Kamihira, S. & Kohno, S. (2004). "The histone deacetylase inhibitor FR901228 induces caspase-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway in small cell lung cancer cells." Molecular Cancer Therapeutics 3(11): 1397-1402.

Donadelli, M., Costanzo, C., Beghelli, S., Scupoli, M. T., Dandrea, M., Bonora, A., Piacentini, P., Budillon, A., Caraglia, M., Scarpa, A. & Palmieri, M. (2007). "Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine." Biochimica et Biophysica Acta 1773(7): 1095-1106.

Dong, Y., Zhang, T., Li, X., Yu, F., Yu, H. & Shao, S. (2021). "Urine Biomarkers for the Diagnosis of Bladder Cancer: a Network Meta-Analysis." The Journal of Urology 18(6): 623-632.

Drumond-Bock, A. L., Wang, L., Wang, L., Cybula, M., Rostworowska, M., Kinter, M. & Bieniasz, M. (2023). "Increased expression of BRD4 isoforms long (BRD4-L) and short (BRD4-S) promotes chemotherapy resistance in high-grade serous ovarian carcinoma." Genes Cancer 14: 56-76.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotescytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell 102(1): 33-42.

Duan, H., Heckman, C. A. & Boxer, L. M. (2005). "Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas." Molecular and Cellular Biology 25(5): 1608-1619.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. (1999). "Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis." Annual Review of Biochemistry 68: 383-424.

Ecke, T. H., Benderska-Söder, N., Bismarck, E., van Rhijn, B. W. G., Todenhöfer, T. & Schmitz-Dräger, B. J. (2023). "Considering the Effects of Modern Point-of-Care Urine Biomarker Assays in Follow-Up of Patients with High-Risk Non-muscle-Invasive Bladder Cancer." Methods in Molecular Biology 2684: 199-212.

Ecke, T. H., Kiani, A., Schlomm, T., Friedersdorff, F., Rabien, A., Jung, K., Kilic, E., Boström, P., Tervahartiala, M., Taimen, P., Gleichenhagen, J., Johnen, G., Brüning, T., Koch, S., Roggisch, J. & Wirtz, R. M. (2020). "Prognostic Role of Survivin and Macrophage Infiltration Quantified on Protein and mRNA Level in Molecular Subtypes Determined by RT-qPCR of KRT5, KRT20, and ERBB2 in Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy." International Journal of Molecular Sciences 21(19): 7420.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature 411(6836): 494-498.

Ellinger, J., Schneider, A. C., Bachmann, A., Kristiansen, G., Müller, S. C. & Rogenhofer, S. (2016). "Evaluation of Global Histone Acetylation Levels in Bladder Cancer Patients." Anticancer Research 36(8): 3961-3964.

Elliott, A. Y., Bronson, D. L., Stein, N. & Fraley, E. E. (1976). "In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract." Cancer Research 36: 365-369.

Elliott, A. Y., Cleveland, P., Cervenka, J., Castro, A. E., Stein, N., Hakala, T. R. & Fraley, E. E. (1974). "Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract." Journal of the National Cancer Institute 53(5): 1341-1349.

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.2 Pigment Cell Melanoma Research 32(5): 687-696.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J. C. (2000). "Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane." Molecular and Cellular Biology 20(3): 929-935.

Falkenhorst, J., Grunewald, S., Mühlenberg, T., Marino-Enriquez, A., Reis, A. C., Corless, C., Heinrich, M., Treckmann, J., Podleska, L. E., Schuler, M., Fletcher, J. A. & Bauer, S. (2016). "Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) are commonly dysregulated in GIST and can be pharmacologically targeted to enhance the pro-apoptotic activity of imatinib." Oncotarget 7(27): 41390-41403.

Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." Nature 301(5895): 89-92.

Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J. P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Müller, S., Pawson, T., Gingras, A. C., Arrowsmith, C. H. & Knapp, S. (2012). "Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family." Cell 149(1):214-231.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S. & Bradner, J. E. (2010). "Selective inhibition of BET bromodomains." Nature 468(7327): 1067-1073.

Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. & Pavletich, N. P. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." Nature 401(6749): 188-193.

Flohr, C., Bürkle, A., Radicella, J. P. & Epe, B. (2003). “Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein.” Nucleic Acids Research 31(18): 5332-5337.

Florea, A.-M. & Büsselberg, D. (2011). „Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects.” Cancers 3(1): 1351-1371.

Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A. & Abnet, C. C. (2011). “Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women.” Journal of the American Medical Association 306(7): 737-745.

French, C. A., Miyoshi, I., Aster, J. C., Kubonishi, I., Kroll, T. G., Dal Cin, P., Vargas, S. O., Perez-Atayde, A. R. & Fletcher, J. A. (2011). “BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19).” The American Journal of Pathology 159(6): 1987-1992.

Frye, R., Myers, M., Axelrod, K. C., Ness, E. A., Piekarz, R. L., Bates, S. E. & Booher, S. (2012). Romidepsin: a new drug for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Clinical Journal of Oncological Nursing 16(2): 195-204.

Furthmayr, H. & Timpl, R. (1976). Immunochemistry of collagens and procollagens. International Review of Connective Tissue Research 7: 61-99.

Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (2002). “FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases.” Cancer Research 62(17): 4916-4921.

Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (2002). “FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases.” Cancer Research 62(17): 4916-4921.

Gajewski, S. & Hartwig, A. (2020). “PARP1 Is Required for ATM-Mediated p53 Activation and p53-Mediated Gene Expression after Ionizing Radiation.” Chemical Research in Toxicology 33(7): 1933-1940.

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 & Disease 5(5): e1257.

Gazzaniga, P., Gradilone, A., Giuliani, L., Gandini, O., Silvestri, I., Nofroni, I., Saccani, G., Frati, L. & Aglianò, A. M. (2003). “Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer.” Annals of Oncology (1): 85-90.

Glaser, K. B., Li, J., Staver, M. J., Wie, R. Q., Albert, D. H. & Davidsen, S. K. (2003). “Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA.” Biochemical and Biophysical Research Communications 310(2): 529-536.

Glorieux, C. & Buc Calderon, P. (2024). “Targeting catalase in cancer.” Redox Biology 77: 103404.

Glozak, M. & Seto, E. (2007). “Histone deacetylases and cancer.” Oncogene 26: 5420-5432.

González-Martín, A., Pothuri, B., Vergote, I., DePont Christensen, R., Graybill, W., Mirza, M. R., McCormick, C., Lorusso, D., Hoskins, P., Freyer, G., Baumann, K., Jardon, K., Redondo, A., Moore, R. G., Vulsteke, C., O'Cearbhaill, R. E., Lund, B., Backes,

F., Barretina-Ginesta, P., Haggerty, A. F., Rubio-Pérez, M. J., Shahin, M. S., Mangili, G., Bradley, W. H., Bruchim, I., Sun, K., Malinowska, I. A., Li, Y., Gupta, D. & Monk, B. J. (2019). "Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer." The New England Journal of Medicine 381(25): 2391-2402.

Greco, E. A., Lenzi, A., Migliaccio, S. & Gessani, S. (2019). "Epigenetic Modifications Induced by Nutrients in Early Life Phases: Gender Differences in Metabolic Alteration in Adulthood." Frontiers in Genetics 10: 795.

Grossman, H. B., Wedemeyer, G., Ren, L., Wilson, G. N. & Cox, B. (1986). "Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures." The Journal of Urology 136(4): 953-959.

Grunewald, C. M., Haist, C., König, C., Petzsch, P., Bister, A., Nößner, E., Wiek, C., Scheckenbach, K., Köhrer, K., Niegisch, G., Hanenberg, H. & Hoffmann, M. J. (2021). Epigenetic Priming of Bladder Cancer Cells With Decitabine Increases Cytotoxicity of Human EGFR and CD44v6 CAR Engineered T-Cells. Frontiers in Immunology 12: 782448.

Gulve, N., Su, C., Deng, Z., Soldan, S. S., Vladimirova, O., Wickramasinghe, J., Zheng, H., Kossenkov, A. V. & Lieberman, P. M. (2022). "DAXX-ATRX regulation of p53 chromatin binding and DNA damage response." Nature Communications 13(1): 5033.

Hall, M. C., Chang, S. S., Dalbagni, G., Pruthi, R. S., Seigne, J. D., Skinner, E. C., Wolf, J. S. Jr. & Schellhammer, P. F. (2007). "Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis)." The Journal of Urology 178(6): 2314-2330.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.

Hassa, P. O. & Hottiger, M. O. (1999). "A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation." Biological Chemistry 380(7-8): 953-959.

Hassan, F. U., Rehman, M. S., Khan, M. S., Ali, M. A., Javed, A., Nawaz, A. & Yang. C. (2019). "Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator: Mechanism of Action and Potential Effects." Frontiers in Genetics 10: 514.

He, B., Dai, L., Zhang, X., Chen, D., Wu, J., Feng, X., Zhang, Y., Xie, H., Zhou, L., Wu, J. & Zheng, S. (2018). "The HDAC Inhibitor Quisinostat (JNJ-26481585) Supresses Hepatocellular Carcinoma alone and Synergistically in Combination with Sorafenib by G0/G1 phase arrest and Apoptosis induction." International Journal of Biological Sciences 14(13): 1845-1858.

Heider, U., Kaiser, M., Sterz, J., Zavrski, I., Jakob, C., Fleissner, C., Eucker, J., Possinger, K. & Sezer, O. (2006). "Histone deacetylase inhibitors reduce VEGF production and induce growth suppression and apoptosis in human mantle cell lymphoma." European Journal of Haematology 76(1): 42-50.

Heinicke, U., Kupka, J. & Fulda, S. (2015). "JNJ-26481585 primes rhabdomyosarcoma cells for chemotherapeutics by engaging the mitochondrial pathway of apoptosis." Oncotarget 6(35): 37836-37851.

Herceg, Z. & Wang, Z. Q. (2001). "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death." Mutation Research 477(1-2): 97-110.

Hernandez, J. M., Farma, J. M., Coppola, D., Hakam, A., Fulp, W. J., Chen, D. T., Siegel, E. M., Yeatman, T. J. & Shibata, D. (2011). "Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer." Clinical Colorectal Cancer 10(3): 188-193.

Hoffmann, M. J., Koutsogiannouli, E., Skowron, M. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., Brandt, A., Stepanow, S., Rieder, H. & Schulz, W. A. (2016). "The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors." Bladder Cancer 2(4): 449-463.

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 12(2): 260.

Hoffmann, M., Hommel, A., Hommel, K., Sophia, T., Schulz, W. A. & Niegisch, G. (2020). "Cytotoxic and genotoxic effects of epigenetic inhibitors on bladder cancer cells." Urologic Oncology 38(12): 909.

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

Hontecillas-Prieto, L., Flores-Campos, R., Silver, A., de Álava, E., Hajji, N. & García-Domínguez, D. J. (2020). "Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials." Frontiers in Genetics 11: 578011.

Horikawa, Y., Sugano, K., Shigyo, M., Yamamoto, H., Nakazono, M., Fujimoto, H., Kanai, Y., Hirohashi, S., Kakizoe, T., Habuchi, T. & Kato, T. (2003). "Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ." The Journal of Urology 169(4): 1541-1545.

Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-κB activation". Cell 81(4): 495-504.

Hua, P., Liu, L., Liu, J., Wang, M., Jiang, H.-q., Zeng, K., Yang, Y.-q. & Yang, S.-r. (2013). "Inhibition of apoptosis by knockdown of caspase-3 with siRNA in rat bone marrow mesenchymal stem cells." Experimental Biology and Medicine 238(9): 991-998.

Huang, T., Li, J. & Wang, S. M. (2022). "Core promoter mutation contributes to abnormal gene expression in bladder cancer." BMC Cancer 22(1): 68.

Hussain, S., Ganesan, R., Hiller, L., Murray, P. G., El-Magraby, M. M. & Young, L. (2003). "Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder." British Journal of Cancer 88: 586–592.

Jamshidi-Adegani, F., Ghaemi, S., Al-Hashmi, S., Vakilian, S., Al-Kindi, J., Rehman, N. U., Alam, K., Al-Riyami, K., Csuk, R., Arefian, E. & Al-Harrasi, A. (2022). "Comparative study of the cytotoxicity, apoptotic, and epigenetic effects of Boswellic acid derivatives on breast cancer." Scientific Reports 12(1): 19979.

Jen, E. Y., Wang, X., Li, M., Li, H., Lee, S. L., Ni, N., Przepiorka, D., Vallejo, J., Leong, R., Ma, L., Gehrke, B. J., McLamore, S., Theoret, M. R. & de Claro, R. A. (2022). "FDA Approval Summary: Oral Azacitidine for Continued Treatment of Adults with Acute Myeloid Leukemia Unable to Complete Intensive Curative Therapy." Clinical Cancer Research 28(14): 2989-2993.

Jiang, N., Dai, Q., Su, X., Fu, J., Feng, X. & Peng, J. (2020). "Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior." Molecular Biology Reports 47(6): 4587-4629.

Jiang, S., Postovit, L., Cattaneo, A., Binder, E. B. & Aitchison, K. J. (2019). "Epigenetic Modifications in Stress Response Genes Associated With Childhood Trauma." Frontiers in Psychiatry 10: 808.

Kale, J., Osterlund, E. & Andrews, D. (2018). "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death." Cell Death & Differentiation 25: 65-80.

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." Clinical Epigenetics 10(1): 100.

Kaminskas, E., Farrell, A., Abraham, S., Baird, A., Hsieh, L. S., Lee, S. L., Leighton, J. K., Patel, H., Rahman, A., Sridhara, R., Wang, Y. C. & Pazdur, R. (2005). "Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes." Clinical Cancer Research 11(10): 3604-3608.

Kang, M., Kim H. S., Jeong, C. W., Kwak, C., Kim, H. H. & Ku, J. H. (2015). "Prognostic factors for conditional survival in patients with muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy". Scientific Report 5:1217, 1-8.

Karakashev, S., Zhu, H., Yokoyama, Y., Zhao, B., Fatkhutdinov, N., Kossenkov, A. V., Wilson, A. J., Simpkins, F., Speicher, D., Khabele, D., Bitler, B. G. & Zhang, R. (2017). "BET Bromodomain Inhibition Synergizes with PARP Inhibitor in Epithelial Ovarian Cancer." Cell Reports 21(12): 3398-3405.

Karam, J. A., Fan, J., Stanfield, J., Richer, E., Benaim, E. A., Frenkel, E., Antich, P., Sagalowsky, A. I., Mason, R. P. & Hsieh, J. T. (2007). "The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy." International Journal of Cancer 120(8): 1795-1802.

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 Research 53(17): 3976-3985.

Ke, Y., Zhang, J., Lv, X., Zeng, X & Ba, X. (2019). "Novel insights into PARPs in gene expression: regulation of RNA metabolism." Cell and Molecular Life Sciences 76(17): 3283-3299.

Kehr, S., Haydn, T., Bierbrauer, A., Irmer, B., Vogler, M. & Fulda, S. (2020). "Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis." Cancer Letters 482: 19-32.

Kelly, R. D. & Cowley, S. M. (2013). "The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts." Biochemical Society Transactions 41(3): 741-749.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics." British Journal of Cancer 26: 239-257.

Khandelwal, M., Anand, V., Appunni, S., Seth, A., Singh, P., Mathur, S. & Sharma, A. (2018). "Decitabine augments cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin to bladder

cancer cells by activating hippo pathway through RASSF1A." Molecular and Cellular Biochemistry 446: 105-114.

Kim, J. H. & Chang, I. H. (2022). "A novel strategy for treatment of bladder cancer: Antibody drug conjugates." Investigative and Clinical Urology 63(4): 373-384.

Kim, N., Norsworthy, K. J., Subramaniam, S., Chen, H., Manning, M. L., Kitabi, E., Earp, J., Ehrlich, L. A., Okusanya, O. O., Vallejo, J., Gehrke, B. J., de Claro, R. A. & Pazdur, R. (2022) "FDA Approval Summary: Decitabine and Cedazuridine Tablets for Myelodysplastic Syndromes." Clinical Cancer Research 28(16): 3411-3416.

King, E. D., Matteson, J., Jacobs, S. C. & Kyprianou, N. (1996). "Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression." The Journal of Urology 155(1): 316-320.

Kirsh, E. J., Baunoch, D. A. & Stadler, W. M. (1998). Expression Of Bcl-2 And Bcl-X In Bladder Cancer. The Journal of Urology 159(4):1348-1353.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." The EMBO Journal 14(22): 5579-5588.

Kommalapati, V. K., Kumar, D. & Tangutur, A.D. (2021). "Quisinostat mediated autophagy is associated with differentiation in neuroblastoma SK-N-SH cells." Molecular Biology Reports 48, 4973-4979.

Konwar, C., Maini, J., Kohli, S., Brahmachari, V. & Saluja, D. (2022). "SIN-3 functions through multi-protein interaction to regulate apoptosis, autophagy, and longevity in Caenorhabditis elegans." Scientific Reports 12: 10560.

Korkolopoulou, P., Lazaris, A. Ch., Konstantinidou, A.-E., Kavantzas, N., Patsouris, E., Christodoulou, P., Thomas-Tsagli, E. & Davaris, P. (2002). "Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival." European Urology 41(3): 274-283.

Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P. & Craig, R. W. (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2." Proc. National Academy of Sciences U.S.A. 90 (8): 3516-3520.

Krafft, U., Tschirdewahn, S., Hess, J., Harke, N. N., Hadaschik, B., Olah, C., Krege, S., Nyirády, P., Szendröi, A., Szücs, M., Módos, O., Székely, E., Reis, H. & Szarvas, T. (2019). "Validation of survivin and HMGA2 as biomarkers for cisplatin resistance in bladder cancer." Urologic Oncology 37(11): 810.e7-810.e15.

Krishnakumar, R. & Kraus, W. L. (2010). "The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets." Molecular Cell 39(1): 8-24.

Kunze, D., Erdmann, K., Froehner, M., Wirth, M. P. & Fuessel, S. (2012). "siRNA-mediated inhibition of antiapoptotic genes enhances chemotherapy efficacy in bladder cancer cells." Anticancer Research 32(10): 4313-4318.

Kunze, D., Erdmann, K., Froehner, M., Wirth, M. P. & Fuessel, S. (2013). "Enhanced inhibition of bladder cancer cell growth by simultaneous knockdown of antiapoptotic Bcl-xL and survivin in combination with chemotherapy." International Journal of Molecular Sciences 14(6): 12297-12312.

Kuroki, H., Anraku, T., Kazama, A., Shirono, Y., Bilim, V., & Tomita, Y. (2021). “Histone deacetylase 6 inhibition in urothelial cancer as a potential new strategy for cancer treatment.” Oncology Letters 21: 64.

Kutuzov, M. M., Belousova, E. A., Ilina, E. S. & Lavrik, O. I. (2020). “Impact of PARP1, PARP2 & PARP3 on the Base Excision Repair of Nucleosomal DNA.” Advances in Experimental Medicine and Biology 1241: 47-57.

Kyriazis, A. A., Kyriazis, A. P., McCombs, W. B. 3rd. & Peterson, W. D. Jr. (1984). “Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice.” Cancer Research 44(9): 3997-4005.

Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T. & Seiser, C. (2002). “Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression.” The EMBO Journal 21(11): 2672-2681.

Lee, H. Z., Kwitkowski, V. E., Del Valle, P. L., Ricci, M. S., Saber, H., Habtemariam, B. A., Bullock, J., Bloomquist, E., Li, Shen, Y., Chen, X. H., Brown, J., Mehrotra, N., Dorff, S., Charlab, R., Kane, R. C., Kaminskas, E., Justice, R., Farrell, A. T. & Pazdur, R. (2015). “FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma.” Clinical Cancer Research 21(12): 2666-2670.

Lee, K.-H. & Song, C. G., “Epigenetic regulation in bladder cancer: development of new prognostic targets and therapeutic implications.” Translational Cancer Research 6(4): S677-S688.

Lee, T. L., Yeh, J., Friedman, J., Yan, B., Yang, X., Yeh, N. T., Van Waes, C. & Chen, Z. (2008). “A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas.” International Journal of Cancer 122(9): 1987-1998.

Lehmann, M., Hoffmann, M. J., Koch, A., Ulrich, S. M., Schulz, W. A. & Niegisch, G. (2014). “Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment.” Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 33(1): 59.

Li, B., Kanamaru, H., Noriki, S., Yamaguchi, T., Fukuda, M. & Okada, K. (1998). “Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder.” Urological Research 26, 235-241.

Li, F., Wang, T., Wang, Z., Chen, X., & Liu, R. (2017). “Histone deacetylase inhibitor quisinostat activates caspase signaling and upregulates p53 acetylation to inhibit the proliferation of HepG2 cells.” Molecular Medicine Reports 16: 6094-6101.

Li, H., Zhu, H., Xu C.-J. & Yuan, J. (1998). “Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis.” Cell 94(4): 491-501.

Li, P., Liu, L., Dang, X. & Tian, X. (2020). “Romidepsin Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Cholangiocarcinoma Cells.” Technology in Cancer Research & Treatment 19: 1533033820960754.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. (1997). “Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.” Cell 91(4): 479-489.

Li, Q. Q., Hao, J., Zhang, Z., Hsu, I., Liu, Y., Tao, Z., Lewi, K., Metwalli, A. R. & Agarwal, P. K. (2016). "Histone deacetylase inhibitor-induced cell death in bladder cancer is associated with chromatin modification and modifying protein expression: A proteomic approach." International Journal of Oncology 48(6): 2591-2607.

Li, Q., Wang, X., Wu, X., Rui, Y., Liu, W., Wang, J., Wang, X., Liou, Y. C., Ye, Z. & Lin, S. C. (2007). "Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death." Cancer Research 67(1): 66-74.

Lin, C. L., Tsai, M. L., Lin, C. Y., Hsu, K. W., Hsieh, W. S., Chi, W. M., Huang, L. C. & Lee, C. H. (2019). "HDAC1 and HDAC2 Double Knockout Triggers Cell Apoptosis in Advanced Thyroid Cancer." International Journal of Molecular Sciences 20(2): 454.

Lin, W., Sun, J., Sadahira, T., Xu, N., Wada, K., Liu, C., Araki, M., Xu, A., Watanabe, M., Nasu, Y. & Huang, P. (2021). "Discovery and Validation of Nitroxoline as a Novel STAT3 Inhibitor in Drug-resistant Urothelial Bladder Cancer." International Journal of Biological Sciences 17(12): 3255-3267.

Lipponen, P. K., Aaltomaa, S. & Eskelinen, M. (1996). "Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours." Histopathology 28(2): 135-140.

Liu, H., Yang, J., Yuan, Y., Xia, Z., Chen, M., Xie, L., Ma, X., Wang, J., Ouyang, S., Wu, Q., Yu, F., Zhou, X., Yang, Y., Cao, Y., Hu, J. & Yin, B. (2014). "Regulation of Mcl-1 by constitutive activation of NF-κB contributes to cell viability in human esophageal squamous cell carcinoma cells." BMC Cancer 14: 98.

Lui, G. Y. L., Shaw, R., Schaub, F. X., Stork, I. N., Gurley, K. E., Bridgwater, C., Diaz, R. L., Rosati, R., Swan, H. A., Ince, T. A., Harding, T, C., Gadi, V. K., Goff, B. A., Kemp, C. J., Swisher, E. M. & Grandori, C. (2020). "BET, SRC, and BCL2 family inhibitors are synergistic drug combinations with PARP inhibitors in ovarian cancer." EBioMedicine 60: 102988.

Malekzadeh, K., Sobti, R. C., Nikbakht, M., Shekari, M., Hosseini, S. A., Tamandani, D. K., Singh, S. K. (2009). "Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer." Cancer Investigation 27(1): 70-80.

Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R. & Pazdur, R. (2007). "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." The Oncologist. 12(10): 1247-52.

Masamsetti, V. P., Low, R. R. J., Mak, K. S., O'Connor, A., Riffkin, C. D., Lamm, N., Crabbe, L., Karlseder, J., Huang, D. C. S., Hayashi, M. T. & Cesare, A. J. (2019). "Replication stress induces mitotic death through parallel pathways regulated by WAPL and telomere deprotection." Nature Communications 10(1): 4224.

Mason, K., Khaw, S., Rayeroux, K., Chew, E., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Grigg, A. P., Seymour, J. F., Szer, J., Huang, D. C. S. & Roberts, A. W. (2009). "The BH3 mimetic compound, ABT-737, synergizes with a range of cytotoxic chemotherapy agents in chronic lymphocytic leukemia." Leukemia 23, 2034–2041.

Masters, J. R., Hepburn, P. J., Walker, L., Highman, W. J., Trejdosiewicz, L. K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B. T., Riddle, P. R. & Franks, L. M. (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. Cancer Research 46(7): 3630-3636.

MedChemExpress, abrufbar unter https://www.medchemexpress.com/Quisinostat.html?locale=de-DE&srsltid=AfmBOornJmtO7hbrZ1lk2DJKdC7LUhgc0nushR6WY3qIsqyXWniz3qTX

Mehdipour, P., Chen, R. & De Carvalho, D. D. (2021). "The next generation of DNMT inhibitors." Nature Cancer 2(10): 1000-1001.

Menear, K. A., Adcock, C., Boulter, R., Cockcroft, X. L., Copsey, L., Cranston, A., Dillon, K. J., Drzewiecki, J., Garman, S., Gomez, S., Javaid, H., Kerrigan, F., Knights, C., Lau, A., Loh, V. M. Jr., Matthews, I. T., Moore, S., O'Connor, M. J., Smith, G. C. & Martin, NM. (2008). "4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1." Journal of Medicinal Chemical 51(20): 6581-6591.

Meng, J., Zhang, H., Zhou, C., Li, C., Zhang, F., & Mei, Q. (2012). "The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53-dependent and -independent pathways." Oncology Reports 28: 384-388.

Ménissier-de Murcia, J., Molinete, M., Gradwohl, G., Simonin, F. & de Murcia, G. (1989). "Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA." Journal of Molecular Biology 210(1): 229-233.

Merino, D., Kelly, G. L., Lessene, G., Wei, A. H., Roberts, A. W. & Strasser, A. (2018). "BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines." Cancer Cell 34(6): 879-891.

Miller, A. L., Fehling, S. C., Garcia, P. L., Gamblin, T. L., Council, L. N., van Waardenburg, R. C. A. M., 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.

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." International Journal of Cancer 144(4): 755-766.

Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C. & El-Deiry, W. S. (2000). "Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis." Cancer Research 60(22): 6318-6325.

Miyamoto, H., Shuin, T., Torigoe, S., Iwasaki, Y. & Kubota, Y. (1995). "Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer." British Journal of Cancer 71(4): 831-835.

Miyashita, T. & Reed, J. C. (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell 80(2): 293-299.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Reed, J. C. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." Oncogene 9(6): 1799-1805.

Mizutani, H., Hiraku, Y., Tada-Oikawa, S., Murata, M., Ikemura, K., Iwamoto, T., Kagawa, Y., Okuda, M. & Kawanishi, S. (2010). "Romidepsin (FK228), a potent histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis through the generation of hydrogen peroxide." Cancer Sciences 101(10): 2214-2219.

Momparler, R. L. (2005). “Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine).” Seminars in Hematology 42(2): S9-S16.

Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. (2013). “DNA methylation and its basic function.” Neuropsychopharmacology 38(1): 23-38.

Morales Torres, C., Wu, M. Y., Hobor, S., Wainwright, E. N., Martin, M. J., Patel, H., Grey, W., Grönroos, E., Howell, S., Carvalho, J., Snijders, A. P., Bustin, M., Bonnet, D., Smith, P. D., Swanton, C., Howell, M. & Scaffidi, P. (2020). “Selective inhibition of cancer cell self-renewal through a Quisinostat-histone H1.0 axis.” Nature Communications 11, 1792.

Moshynska, O., Sankaran, K. & Saxena, A. (2003). „Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia.” Molecular Pathology 56(4): 205-209.

Mossanen, M. & Gore, J. L. (2014). “The burden of bladder cancer care: direct and indirect costs.” Current Opinion in Urology 24(5): 487-491.

Mouw, K. W. (2017). “DNA Repair Pathway Alterations in Bladder Cancer.” Cancers 9(4): 28.

Muller, S., Filippakopoulos, P. & Knapp, S. (2011). “Bromodomains as therapeutic targets.” Expert Reviews in Molecular Medicine13: e29.

Munshi, A., Kurland, J. F., Nishikawa, T., Tanaka, T., Hobbs, M. L., Tucker, S. L., Ismail, S., Stevens, C. & Meyn, R. E. (2005). “Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity.” Clinical Cancer Research 11(13): 4912-4922.

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 Research 72(21): 5588-5599.

Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E. M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A. R., Gronemeyer, H. & Altucci, L. (2005). “Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells.” Nature Medicine 11(1): 77-84.

Ng, K., Stenzl, A., Sharma, A. & Vasdev, N. (2021). “Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions.” Urologic Oncology 39(1): 41-51.

Niegisch, G., von Amsberg, G., Rehlinghaus, M., Grunewald, C. M. & Retz, M. (2022). „Das metastasierte Urothelkarzinom – leitlinienorientierte Therapie und neue Optionen.“ Urologe 61: 265–272

Nieto, M., Demolis, P., Béhanzin, E., Moreau, A., Hudson, I., Flores, B., Stemplewski, H., Salmonson, T., Gisselbrecht, C., Bowen, D. & Pignatti, F. (2016). “The European Medicines Agency Review of Decitabine (Dacogen) for the Treatment of Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use.” The Oncologist 21(6): 692-700.

O'Toole, C., Nayak, S., Price, Z., Gilbert, W. H. & Waisman, J. (1976). “A cell line (SCABER) derived from squamous cell carcinoma of the human urinary bladder.” International Journal of Cancer 17(6): 707-714.

O'Toole, C., Price, Z., Ohnuki, Y. & Unsgaard, B. (1978). "Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma." British Journal of Cancer 38: 64-76.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science 288(5468): 1053-1058.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and "Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell 99(3): 247-257.

Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W. & Rosenberg, S. H. (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." Nature 435(7042): 677-81.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell 74(4): 609-619.

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., Sampath, D., Lehman, A. M., Yu, L., Zhang, J., Ma, Y., Zhang, Y., Spevak, W., Shi, S., Severson, P., Shellooe, R., Carias, H., Tsang, G., Dong, K., Ewing, T., Marimuthu, A., Tantoy, C., Walters, J., Sanftner, L., Rezaei, H., Nespi, M., Matusow, B., Habets, G., Ibrahim, P., Zhang, C., Mathé, E. A., Bollag, G., Byrd, J. C. & Lapalombella, R. (2018). "BRD4 Profiling Identifies Critical Chronic Lymphocytic Leukemia Oncogenic Circuits and Reveals Sensitivity to PLX51107, a Novel Structurally Distinct BET Inhibitor." Cancer Discovery 8(4): 458-477.

Paillas, S., Then, C. K., Kilgas, S., Ruan, J. L., Thompson, J., Elliott, A., Smart, S. & Kiltie, A. E. (2020). "The Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Spares Normal Tissues While Acting as an Effective Radiosensitizer in Bladder Tumors in Vivo." International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics 107(1): 212-221.

Paoluzzi, L., Scotto, L., Marchi, E., Zain, J., Seshan, V. E., O'Connor, O. A. (2010). "Romidepsin and belinostat synergize the antineoplastic effect of bortezomib in mantle cell lymphoma." Clinical Cancer Research 16(2): 554-565.

Pattarawat, P., Hong, T., Wallace, S., Hu, Y., Donnell, R., Wang, T. H., Tsai, C. L., Wang, J. & Wang, H. R. (2020). "Compensatory combination of romidepsin with gemcitabine and cisplatin to effectively and safely control urothelial carcinoma." British Journal of Cancer 123(2): 226-239.

Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. (2004). "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins." Biochimica et Biophysica Acta 1644(2-3): 83-94.

Pfeffer, C. M. & Singh, A. T. K. (2018), „Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy." International Journal of Molecular Sciences 19(2): 448.

Philip Jones, Sergio Altamura, Julia Boueres, Federica Ferrigno, Massimiliano Fonsi, Claudia Giomini, Stefania Lamartina, Edith Monteagudo, Jesus M. Ontoria, Maria Vittoria Orsale, Palumbi, M. C., Pesci, S., Roscilli, G., Scarpelli, R., Schultz-Fademrecht, C., Toniatti, C. & Rowley, M. (2009). "Discovery of 2-{4-[(3S)-Piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): A Novel Oral Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) Inhibitor Efficacious in BRCA-1 and -2 Mutant Tumors." Journal of Medicinal Chemistry 52 (22): 7170-7185.

Piekarz, R. L., Frye, R., Prince, H. M., Kirschbaum, M. H., Zain, J., Allen, S. L., Jaffe, E. S., Ling, A., Turner, M., Peer, C. J., Figg, W. D., Steinberg, S. M., Smith, S., Joske, D., Lewis, I., Hutchins, L., Craig, M., Fojo, A. T., Wright, J. J. & Bates, S. E. (2011). "Phase 2 trial of romidepsin in patients with peripheral T-cell lymphoma." Blood 117(22): 5827-5834.

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." Molecular Cancer Therapeutics 15(2): 299-312.

Porter, N. J. & Christianson, D. W. (2019). "Structure, mechanism, and inhibition of the zinc-dependent histone deacetylases." Current Opinion in Structural Biology 59: 9-18.

Potluri, J., Harb, J., Masud, A. A. & Hutti, J. E. (2020). "A Phase 3, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study Evaluating Navitoclax in Combination with Ruxolitinib in Patients with Myelofibrosis (TRANSFORM-1)." Blood 136(1): 4.

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. & Gillessen, S. (2022). "Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of Oncology 33(3): 244-258.

Ramakrishnan, V. G., Miller, K. C., Macon, E. P., Kimlinger, T. K., Haug, J., Kumar, S., Gonsalves, W. I., Rajkumar, S. V. & Kumar, S. K. (2019). "Histone deacetylase inhibition in combination with MEK or BCL-2 inhibition in multiple myeloma." Haematologica 104(10): 2061-2074.

Rasheed, S., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Nelson-Rees, W. A. & Arnstein, P. (1977). "Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses." Journal of the National Cancer Institute 58(4): 881-890.

Ray Chaudhuri, A. & Nussenzweig, A. (2017). "The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling." Nature Reviews Molecular Cell Biology 18(10): 610-621.

Rehemtulla, A., Hamilton, C. A., Chinnaiyan, A. M. & Dixit, V. M. (1997). "Ultraviolet Radiation-induced Apoptosis Is Mediated by Activation of CD-95 (Fas/APO-1)." The Journal of Biological Chemistry 272(41): 25783-25786.

Reik, W., Dean, W. & Walter, J. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." Science 293(5532): 1089-1093.

Rigby, C. C. & Franks, L. M. (1970). "A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosone pattern and ultrastructure." British Journal of Cancer 24(4): 746-754.

Robert Koch-Institut (Hrsg.), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), „Krebs in Deutschland für 2019/2020", 14. Ausgabe,

Berlin 2023, abrufbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile.

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., Su, X., de Sa Carvalho, B., Chagas, V. S., Mungall, K. L., Sadeghi, S., Pedamallu, C. S., Lu, Y., Klimczak, L. J., Zhang, J., Choo, C., Ojesina, A. I., Bullman, S., Leraas, K. M., Lichtenberg, T. M., Wu, C. J., Schultz, N., Getz, G., Meyerson, M., Mills, G. B., McConkey, D. J.; TCGA Research Network; Weinstein, J. N., Kwiatkowski, D. J. & Lerner, S. P. (2018). "Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer." Cell 174(4): 1033.

Robey, R. W., Chakraborty, A. R., Basseville, A., Luchenko, V., Bahr, J., Zhan, Z. & Bates, S. E. (2011). "Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance." Molecular Pharmaceutics 8(6): 2021-2031.

Rooswinkel, R., van de Kooij, B., Verheij, M. & Borst, J. (2012). "Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B." Cell Death & Disease 3: e366.

Rosato, R. R., Kolla, S. S., Hock, S. K., Almenara, J. A., Patel, A., Amin, S., Atadja, P., Fisher, P. B., Dent, P. & Grant, S. (2010). "Histone deacetylase inhibitors activate NF-kappaB in human leukemia cells through an ATM/NEMO-related pathway." Journal of Biological Chemistry 285(13): 10064-10077.

Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J. & Bolderson, E. (2020). "PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance." Frontiers in Cell and Developmental Biology 8: 564601.

Rosik, L., Niegisch, G., Fischer, U., Jung, M., Schulz, W. A. & Hoffmann, M. J. (2014). "Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells." Cancer Biology & Therapy 15(6): 742-757.

Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. (2010). "PARP inhibition: PARP1 and beyond." Nature Reviews Cancer 10(4): 293-301.

Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." The EMBO Journal 16: 6914-6925.

Rudin, C. M., Hann, C. L., Garon, E. B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P. D., Camidge, D. R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S. S., Ranson, M. R., Dive, C., McKeegan, E. M., Chyla, B. J., Dowell, B. L., Chakravartty, A., Nolan, C. E., Rudersdorf, N., Busman, T. A., Mabry, M. H., Krivoshik, A. P., Humerickhouse, R. A., Shapiro, G. I. & Gandhi, L. (2012). "Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer." Clinical Cancer Research 18(11): 3163-3169.

Ruefli, A. A., Ausserlechner, M. J., Bernhard, D., Sutton, V. R., Tainton, K. M., Kofler, R., Smyth, M. J. & Johnstone, R. W. (2001). "The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen

species." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(19): 10833-10838.

Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Padala, S. A. & Barsouk, A. (2020). "Epidemiology of Bladder Cancer." Medical Sciences 8(1): 15.

Sakai, T., Toguchida, J., Ohtani, N., Yandell, D. W., Rapaport, J. M. & Dryja, T. P. (1991). "Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene." The American Journal of Human Genetics 48(5): 880-888.

Satoh, M. & Lindahl, T. (1992). "Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair." Nature 356: 356-358.

Satyanarayana, A., Hilton, M. B., Kaldis, P. (2008). "p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint." Molecular Biology of the Cell 19(1): 65-77.

Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J. & El-Deiry, W. S. (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nature Cell Biology 4(11): 842-849.

Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D. L. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006 103(5): 1412-1417.

Scott, F. L., Denault, J. B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M. & Salvesen, G. S. (2005). "XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs." The EMBO Journal 24(3): 645-655.

Senapati, J., Fiskus, W. C., Daver, N., Wilson, N. R., Ravandi, F., Garcia-Manero, G., Kadia, T., DiNardo, C. D., Jabbour, E., Burger, J., Short, N. J., Alvarado, Y., Jain, N., Masarova, L., Issa, G. C., Qiao, W., Khoury, J. D., Pierce, S., Miller, D., Sasaki, K., Konopleva, M., Bhalla, K. N., Borthakur, G. & Pemmaraju, N. (2023). "Phase I Results of Bromodomain and Extra-Terminal Inhibitor PLX51107 in Combination with Azacitidine in Patients with Relapsed/Refractory Myeloid Malignancies." Clinical Cancer Research 29(21): 4352-4360.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. (2015). "Old, new and emerging functions of caspases." Cell Death & Differentiation (4): 526-539.

Shang, E., Salazar, G., Crowley, T. E., Wang, X., Lopez, R. A., Wang, X. & Wolgemuth, D. J. (2004). "Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis."Gene Expression Patterns 4(5): 513-519.

Shariat, S. F., Ashfaq, R., Karakiewicz, P. I., Saeedi, O., Sagalowsky, A. I. & Lotan, Y. (2007). "Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality." Cancer 109(6): 1106-1113.

Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. (2010). "Epigenetics in cancer." Carcinogenesis 31(1): 27-36.

Shen, Y., Rehman, F. L., Feng, Y., Boshuizen, J., Bajrami, I., Elliott, R., Wang, B., Lord, C. J., Post, L. E. & Ashworth, A. (2013). "BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency." Clinical Cancer Research 19(18): 5003-5015.

Shephard, E. A., Stapley, S., Neal, R. D., Rose, P., Walter, F. M. & Hamilton, W. T. (2012). "Clinical features of bladder cancer in primary care". British Journal of General Practice 62(602): 598-604.

Shi, T., van Soest, D. M. K., Polderman, P. E., Burgering, B. M. T. & Dansen, T. B. (2021). "DNA damage and oxidant stress activate p53 through differential upstream signaling pathways." Free Radical Biology and Medicine 172: 298-311.

Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y. C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S. R., Frost, P. & Vogelstein, B. (1991). "Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples." Science 252(5006): 706-709.

Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2018). "Cancer statistics, 2018." A Cancer Journal for Clinicians 68(1): 7-30.

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." International Journal of Molecular Sciences 19(2): 590.

Smeenk, G., Wiegant, W. W., Vrolijk, H., Solari, A. P., Pastink, A., van Attikum, H. (2010). "The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage." Journal of Cell Biology 190(5): 741-749.

Souers, A. J., Leverson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., Mason, K. D., Mitten, M. J., Nimmer, P. M., Oleksijew, A., Park, C. H., Park, C. M., Phillips, D. C., Roberts, A. W., Sampath, D., Seymour, J. F., Smith, M. L., Sullivan, G. M., Tahir, S. K., Tse, C., Wendt, M. D., Xiao, Y., Xue, J. C., Zhang, H., Humerickhouse, R. A., Rosenberg, S. H. & Elmore, S. W. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." Nature Medicine 19(2): 202-208.

Steele, N., Finn, P., Brown, R. & Plumb, J. A. (2009). "Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo." British Journal of Cancer 100(5): 758-763.

Steele, T. M., Talbott, G. C., Sam, A., Tepper, C. G., Ghosh, P. M. & Vinall, R. L. (2019). "Obatoclax, a BH3 Mimetic, Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis and Decreases the Clonogenicity of Muscle Invasive Bladder Cancer Cells via Mechanisms That Involve the Inhibition of Pro-Survival Molecules as Well as Cell Cycle Regulators." International Journal of Molecular Sciences 20(6): 1285.

Stennicke, H. & Salvesen, G. (1999). "Catalytic properties of the caspases." Cell Death & Differentiation 6: 1054-1059.

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." A Cancer Journal for Clinicians 71: 209-249.

Suzuki, M. & Bird, A. (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." Nature Reviews Genetics 9: 465-476.

Swana, H. S., Grossman, D., Anthony, J. N., Weiss, R. M. & Altieri, D. C. (1999). "Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer." The New England Journal of Medicine 341(6): 452-453.

Tessoulin, B., Papin, A., Gomez-Bougie, P., Bellanger, C., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C. & Chiron, D. (2019). "BCL2-Family Dysregulation in B-Cell Malignancies: From Gene Expression Regulation to a Targeted Therapy Biomarker." Frontiers in Oncology 8: 645.

The Human Protein Atlas, abrufbar unter https://www.proteinatlas.org.

Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease." Science 267(5203): 1456-1462.

Thy, S., Hommel, A., Meneceur, S., Bartkowiak, A. L., Schulz, W. A., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. (2021). "Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment." Cancers 13(6): 1376.

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.

Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K. J., Gangl, E., Gibbons, F. D., Gregory, G. P., Hargreaves, D., Hendricks, J. A., Johannes, J. W., Johnstone, R. W., Kazmirski, S. L., Kettle, J. G., Lamb, M. L., Matulis, S. M., Nooka, A. K., Packer. M. J., Peng, B., Rawlins, P. B., Robbins, D. W., Schuller, A. G., Su, N., Yang, W., Ye, Q., Zheng, X., Secrist, J. P., Clark, E. A., Wilson, D. M., Fawell, S. E. & Hird, A. W. (2018). "Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia." Nature Communications 9(1): 5341.

Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H. & Elmore, S. W. (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." Cancer Research 68(9): 3421-3428.

Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. & Croce, C. M. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." Science 226(4678): 1097-1099.

Tzeng, C. C., Liu, H. S., Li, C., Jin, Y. T., Chen, R. M., Yang, W. H. & Lin, J. S. (1996). "Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan." Anticancer Research 16(4A): 1797-1804.

Ueda, H., Manda, T., Matsumoto, S., Mukumoto, S., Nishigaki, F., Kawamura, I. & Shimomura, K. (1994). "FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice." The Journal of Antibiotics 47(3): 315-323.

Ueda, H., Nakajima, H., Hori, Y., Fujita, T., Nishimura, M., Goto, T. & Okuhara, M. (1994). "FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity." The Journal of Antibiotics 47(3): 301-310.

Van Oosterwijk, J. G., Herpers, B., Meijer, D., Briaire-de, Bruijn, I. H., Cleton-Jansen, A. M., Gelderblom, H., van de Water, B. & Bovée, J. V. (2012). "Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance." Annals of Oncology 23(6): 1617-1626.

Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M. H., Mattei, M. G., Ganser, A., Chambon, P., Losson, R. & de Thé, H. (1999). "TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family." Oncogene 18(5): 1209-1217.

Venugopal, B., Baird, R., Kristeleit, R. S., Plummer, R., Cowan, R., Stewart, A., Fourneau, N., Hellemans, P., Elsayed, Y., McClue, S., Smit, J. W., Forslund, A., Phelps, C., Camm, J., Evans, T. R., de Bono, J. S. & Banerji, U. (2013). "A phase I study of quisinostat (JNJ-26481585), an oral hydroxamate histone deacetylase inhibitor with evidence of target modulation and antitumor activity, in patients with advanced solid tumors." Clinical Cancer Research 19(15): 4262-4272.

Von Ahsen, O., Waterhouse, N. J., Kuwana, T., Newmeyer, D. D. & Green, D. R. (2000). "The 'harmless' release of cytochrome c." Cell Death & Differentiation 7(12): 1192-1199.

Waddington, C. (1942). "Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters." Nature 150: 563-565.

Wang, J. (2001). "DNA damage and apoptosis." Cell Death & Differentiation 8, 1047-1048.

Wang, L., Doherty, G. A., Judd, A. S., Tao, Z. F., Hansen, T. M., Frey, R. R., Song, X., Bruncko, M., Kunzer, A. R., Wang, X., Wendt, M. D., Flygare, J. A., Catron, N. D., Judge, R. A., Park, C. H., Shekhar, S., Phillips, D. C., Nimmer, P., Smith, M. L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Xue, J., Zhang, H., Le, P. N., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Gao, W., Kovar, P., Choo, E. F., Diaz, D., Fairbrother, W. J., Elmore, S. W., Sampath, D., Leverson, J. D. & Souers, A. J. (2020). "Discovery of A-1331852, a First-in-Class, Potent, and Orally-Bioavailable BCL-XL Inhibitor." ACS Medicinal Chemistry Letters 11(10): 1829-1836.

Wang, S. C., Yu, C. Y., Wu, Y. C., Chang, Y. C., Chen, S. L. & Sung, W. W. (2022). "Chidamide and mitomycin C exert synergistic cytotoxic effects against bladder cancer cells in vitro and suppress tumor growth in a rat bladder cancer model." Cancer Letters 530: 8-15.

Weeden, C. E., Ah-Cann, C., Holik, A. Z., Pasquet, J., Garnier, J. M., Merino, D., Lessene, G. & Asselin-Labat, M. L. (2018). "Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition." Oncogene 37(32): 4475-4488.

Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c". Genes & Development14: 2060-2071.

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B. (2001). "Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science 2001 292(5517): 727-730.

Weinhold B. (2006). "Epigenetics: the science of change." Environ Health Perspect 114(3): A160-7.

Williams, R.D. (1980). “Human urologic cancer cell lines.” Investigative Urology 17(5): 359-363.

Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wie, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M. & Huang, D. C. (2005). “Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins.” Genes & Development 19(11): 1294-1305.

Wolf, P. (2023). “Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in bladder cancer.” Frontiers in Oncology 13: 1124600.

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. & Youle, R. J. (1997). “Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis.” Journal of Cell Biology 139(5): 1281-1292.

Wright, S., Burkholz, S. R., Zelinsky, C., Wittman, C., Carback, R. T., Harris, P. E., Blankenberg, T., Herst, C. V. & Rubsamen, R. M. (2023). “Survivin Expression in Luminal Breast Cancer and Adjacent Normal Tissue for Immuno-Oncology Applications.” International Journal of Molecular Sciences 24(14): 11827.

Wu, M., Sheng, L., Cheng, M., Zhang, H., Jiang, Y., Lin, S., Liang, Y., Zhu, F., Liu, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Gao, Q., Chen, D., Li, J. & Li, Y. (2019). “Low doses of decitabine improve the chemotherapy efficacy against basal-like bladder cancer by targeting cancer stem cells.” Oncogene 38(27): 5425-5439.

Xargay-Torrent, S., López-Guerra, M., Saborit-Villarroya, I., Rosich, L., Campo, E., Roué, G. & Colomer, D. (2011). “Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters.” Clinical Cancer Research 17(12): 3956-3968.

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.” International Journal of Clinical and Experimental Pathology 7(7): 4231-4238.

Yang, J., Song, C. & Zhan, X. (2022). “The role of protein acetylation in carcinogenesis and targeted drug discovery.” Frontiers in Endocrinology 13: 972312.

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.” Science Translational Medicine 9(400): eaal1645.

Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. & Nakatani, Y. (1996). “A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A.” Nature 382(6589): 319-24.

Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. & Baltimore, D. (1997). “Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis.” Cell 89(7): 1067-1076.

Yang, Z., Yik, J. H., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K. & Zhou, Q. (2005). “Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4.” Molecular Cell 19(4): 535-545.

Yin, W., Chen, N., Zhang, Y., Zeng, H., Chen, X., He, Y., Wang, X. & Zhou, Q. (2006). “Survivin nuclear labeling index: a superior biomarker in superficial urothelial carcinoma of human urinary bladder.” Modern Pathology 19: 1487-1497.

Yin, X. M., Oltvai, Z. N. & Korsmeyer, S. J. (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax." Nature 369(6478): 321-323.

Yoshimine, S., Kikuchi, E., Kosaka, T., Mikami, S., Miyajima, A., Okada, Y. & Oya, M. (2013). "Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma." British Journal of Cancer 108(11): 2312-2320.

Yu, J., Qin, B., Moyer, A. M., Nowsheen, S., Liu, T., Qin, S., Zhuang, Y., Liu, D., Lu, S. W., Kalari, K. R., Visscher, D. W., Copland, J. A., McLaughlin, S. A., Moreno-Aspitia, A., Northfelt, D. W., Gray, R. J., Lou, Z., Suman, V. J., Weinshilboum, R., Boughey, J. C., Goetz, M. P. & Wang, L. (2018). "DNA methyltransferase expression in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to decitabine." Journal of Clinical Investigation 128(6): 2376-2388.

Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Ludtke, S. J., Wang, X. & Akey, C. W. (2010). "Structure of an Apoptosome-Procaspase-9 CARD Complex." Cell 18(5): 571-583.

Zaman, S., Wang, R. & Gandhi, V. (2014). "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies." Leuk Lymphoma 55(9): 1980-1992.

Zaware, N. & Zhou, M. M. (2019). "Bromodomain biology and drug discovery." Nature Structural Molecular Biology 26(10): 870-879.

Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R. & Wang, C. Y. (2005). "Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax." Natural Cell Biology 7(9): 909-915.

Zhang, J. & Zhong, Q. (2014). "Histone deacetylase inhibitors and cell death." Cellular and Molecular Life Sciences 71: 3885-3901.

Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K., Pang, X & Luo, X. (2016). "Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53." Cell Death & Disease 7: e2266.

Zhang, L. & Long, X. (2015). "Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies." Scientific Reports 5: 17869.

Zhang, L., Zhang, J., Jiang, Q., Zhang, L. & Song, W. (2018). "Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors." Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 33(1): 714-721.

Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., Liu, Y., Yin, L., Liu, X., Li, X., Yu, X., Yao, J., Zhang, Z. & Kong, C. (2021). "Exploring the five different genes associated with PKCα in bladder cancer based on gene expression microarray." Journal of Cellular and Molecular Medicine 25(3): 1759-1770.

Zhao, L. Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R. & Liao, D. (2004). "Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2." Journal of Biological Chemistry 279(48): 50566-50579.

Zhao, Y., Yang, C. Y. & Wang, S. (2013). "The making of I-BET762, a BET bromodomain inhibitor now in clinical development." Journal of Medicinal Chemistry 56(19): 7498- 7500.

Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., & Liang, X. (2017). "Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis." Viruses 9(11): 316.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). “Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.” Cell 90(3): 405-413.

Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A. R., Herrmann, H., Sison, E. A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., Taylor, M. J., Johns, C., Chicas, A., Mulloy, J. C., Kogan, S. C., Brown, P., Valent, P., Bradner, J. E., Lowe, S. W. & Vakoc, C. R. (2011). “RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia.” Nature 478(7370): 524-528.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um den Personen zu danken, die mich auf meinem akademischen Weg begleitet und den Prozess des Verfassens dieser Dissertationsschrift ermöglicht haben.

Dazu zählt in besonderer Weise meine Erstbetreuerin Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann-Massier, die mich stets mit großem Engagement unterstützt hat. Durch ihre breite Fachexpertise und ihren steten Enthusiasmus hat sie mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt und nachhaltig geprägt. Ihre fröhliche und zugewandte Art trug jederzeit zu einer positiven, gar familiären Arbeitsatmosphäre bei, die ich weiterhin in bester Erinnerung behalte.

Großer Dank gilt außerdem der urologischen Arbeitsgruppe „Harnblasenkarzinom“, darunter Frau Dr. rer. nat. Sarah Meneceur sowie Frau Christiane Hader, die mir sowohl während der praktischen Laborarbeit als auch bei der Ausfertigung der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen und die teils sehr theoretischen Forschungsblöcke mit ihrem Humor und Frohsinn aufgelockert haben.

Meiner Familie, der diese Arbeit gewidmet ist, danke ich für die fortwährende Unterstützung in jeglichen Lebensbereichen, die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses sowie für die regen Diskussionen, die sich daraus ergaben und mich inspiriert haben.

Besonders danken möchte ich auch meinem privaten Freundeskreis, der mich über das Studium hinaus auch während der Promotionsphase unterstützt und in den richtigen Momenten zum Lachen gebracht hat. Meinem Partner danke ich für sein jederzeit offenes Ohr, seine liebevolle Art und den beständigen Rückhalt.

Bern, im Mai 2025 *Leandra Lepping*