

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

**Analyse der tumorspezifischen zytotoxischen Wirkung von
neuen Klasse-I HDAC-Inhibitoren auf Urothelkarzinom-Zellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Fenny Tanjaya

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

Zweitgutacher: Prof. Dr. Thomas Kurz

Zusammenfassung

Chemoresistenz ist nach wie vor eine große klinische Herausforderung bei der Behandlung von Patienten mit Urothelkarzinomen (UC). Daher besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieansätzen oder Kombinationspartnern, die die Wirkung von Cisplatin verbessern. Der Einsatz von epigenetischen Inhibitoren zusammen mit Cisplatin als Kombinationstherapie könnte die Wirkung von Cisplatin synergistisch verstärken. In früheren Studien der Arbeitsgruppe Harnblasenkarzinom wurden kommerzielle Histondeacetylasen-Inhibitoren (HDACi) wie Romidepsin aufgrund ihrer Wirkung auf die DNA-Schadensreaktion als vielversprechende Kandidaten identifiziert. In dieser Arbeit wurden neu entwickelte HDACi aus AG Kurz im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie auf ihre Eignung für die Behandlung von UC-Zelllinien untersucht, wobei insbesondere Substanzen mit einem vergleichbaren Wirkmechanismus wie Romidepsin, aber mit geringerer normaler Toxizität gesucht wurden.

Nach einem Screening von 235 HDACi in fünf verschiedenen Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs) und gutartigen HBLAK-Zellen wurden die zehn besten Kandidaten durch MTT-Tests validiert, wobei die drei wirksamsten Kandidaten eine ausgeprägtere tumorspezifische Wirkung zeigten. Ihre Auswirkungen auf die Zellzyklusprogression und die Apoptose wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie und Caspase-Tests analysiert. Veränderungen der DNA-Schadensreaktion wurden mittels Western Blot, Immunozytochemie und RT-PCR bestimmt. Die synergistischen Effekte in Kombination mit Cisplatin wurden mit der Chou-Talalay-Methode berechnet, und die Enzymspezifität der Inhibitoren wurde durch Western Blot bestimmt.

Die IC₅₀-Werte der neuen HDACi DDK122, KSK43 und YAK40 waren in den UCCs UM-UC-3, J82 und SW-1710 niedriger als in benignen HBLAK-Zellen. Alle HDACi induzierten G2/M-Zellzyklusarrest und Zelltod in einer zelllinienabhängigen Weise, wobei in HBLAK-Zellen kein solcher Effekte beobachtet wurde. Die Behandlung mit DDK122 ergab ähnlich starke Wirkungen wie Romidepsin und beeinflusste auch die Expression von Regulatoren, die an der DNA-Replikation und Zytokinese beteiligt sind. Die Kombination von DDK122 mit Cisplatin führte zu einer synergistischen Reduktion der Zellviabilität in UM-UC-3-Zellen.

Es konnten neu entwickelte HDACi identifiziert werden, insbesondere DDK122, die eine ausgeprägtere tumorspezifische Wirkung und Synergie mit Cisplatin zeigten. Dies macht sie zu vielversprechenden Kandidaten für einen innovativen Kombinationstherapieansatz bei Urothelkarzinomen.

Abstract

Chemoresistance remains a major clinical challenge in the treatment of patients with urothelial carcinoma (UC). Therefore, there is an urgent need for new therapeutic approaches or suitable combination partners to improve cisplatin efficacy. Combination of epigenetic inhibitors and cisplatin was reported to demonstrate a synergistic effect enhancing therapeutic efficiency. In previous studies by the bladder cancer research group, commercial histone deacetylase inhibitors (HDACi) such as romidepsin were identified as promising candidates due to their effect on DNA damage response. In this study, newly developed HDACi from AG Kurz of the Department of Pharmaceutical and Medical Chemistry were evaluated for their potential as novel treatments for UC. The focus was on identifying substances that share a similar mechanism of action with romidepsin but offer reduced toxicity to normal cells.

After screening 235 HDACi in five different urothelial carcinoma cell lines (UCCs) and benign HBLAK cells, the top ten candidates were validated by MTT assays. Three most potent candidates showing a more pronounced tumor-specific effect were identified. Effects on cell cycle progression and apoptosis were analysed by flow cytometry and caspase assays. Changes in the DNA damage response were determined by Western blot, immunocytochemistry and RT-PCR. Synergistic effects in combination with cisplatin were calculated using the Chou-Talalay method, and the enzyme specificity of the inhibitors was determined by Western blot.

The IC_{50} values of the novel HDACi: DDK122, KSK43 and YAK40 were lower in the UCCs UM-UC-3, J82 and SW-1710 than in benign HBLAK cells. All HDACi induced G2/M cell cycle arrest and cell death in a cell-line-dependent manner, whereas no such effect was observed in HBLAK cells. DDK122 treatment resulted in effects similar to those induced by romidepsin and also affected the expression of regulators involved in DNA replication and cytokinesis. The combination of DDK122 with cisplatin resulted in a synergistic reduction of cell viability in UM-UC-3 cells.

Newly developed HDACi, especially DDK122, were identified showing a more pronounced tumor-specific effect and synergy with cisplatin. This makes them promising candidates for an innovative combination therapy approach in UC.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
acH3	acetyliertes Histon H3
AG	Arbeitsgruppe
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Chk1	Checkpoint-Kinase 1
Chk2	Checkpoint-Kinase 2
CI	Kombinationsindex
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol -dihydrochlorid, 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolcarbamidin -dihydrochlorid
DE	Deutschland
DMEM	<i>Dulbeccos' Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa	<i>fraction affected</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	fluoresceinisothiocyanat
xg	Relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

H3	Histon H3
HDAC	Histondeacetylase
HDACs	Histondeacetylasen
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICC	Immunzytochemie
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
ml	Milliliter (10^{-3} l)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µg	Mikrogramm (10^{-3} gr)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µM	Mikromolar (10^{-6} M = 10^{-6} mol/l)
nM	Nanomolar (10^{-9} M 10^{-9} mol/l)
OD	Optische Dichte
p	Statistischer Signifikanzwert
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH3	Phospho-Histon H3
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Romi	Romidepsin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline-Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	<i>Tetramethylrhodaminisothiocyanat</i>
UCCs	Urothelkarzinom-Zelllinien
v/v	Volumenprozent

Abkürzungsverzeichnis

WB	Western Blot
w/v	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1. Das Urothelkarzinom	1
1.2. Genetik und Epigenetik des Urothelkarzinoms	2
1.3. HDAC und HDACi.....	3
1.4. DNA-Schadensantwort und Zellzyklusarrest	4
1.5. Neue HDACi.....	7
1.6. Zielsetzung	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1. Material.....	11
2.2. Methoden	19
2.2.1. Zellkultivierung.....	19
2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	19
2.2.3. Zellviabilitätstest zur Bestimmung von IC ₅₀	20
2.2.3.1. Synergie-Bestimmung von Kombinationsbehandlung.....	21
2.2.4. Durchflusszytometrie	22
2.2.4.1. Zellzyklusanalyse	22
2.2.4.2. Apoptose-Bestimmung.....	23
2.2.4.3. Phospho-Histon H3	24
2.2.5. Apoptose-Bestimmung mittels Caspase-Glo® 3/7 und Celltiter-Glo® Test.....	24
2.2.6. Proteinanalyse	25
2.2.6.1. Immunzytochemie	25
2.2.6.2. Protein-Isolierung.....	26
2.2.6.3. Histon-Isolierung	27
2.2.6.4. Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.2.6.5. SDS-Page und Western Blot	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.6.6. Stripping und Reprobing von Western-Blot-Membrane	29
2.2.7. Genexpressionsanalyse.....	30
2.2.7.1. RNA-Isolierung.....	30
2.2.7.2. RNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
2.2.7.3. cDNA-Synthese.....	30
2.2.7.4. Genexpressionsbestimmung mittels quantitativer Echtzeit-PCR	31
2.2.8. Statistische Datenanalyse	32
3 Ergebnisse	33
3.1. Zytotoxische Wirkung der neuen HDACi auf Urothelkarzinom-Zelllinien	33
3.2. Morphologische Veränderung der Urothelkarzinom-Zelllinien nach 72h Behandlung mit HDACi.....	36
3.3. Enzym-Spezifität der neuen HDACi	41
3.4. Wirkung von HDCAi auf den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose	43
3.4.1. Zellzyklus-Analyse mittels PI-Färbung	43
3.4.2. Nachweis von pH3 als Mitose-Marker	48
3.4.3. Apoptose-Nachweis mittels Annexin V-Färbung.....	50
3.4.4. Nachweis von Caspase-Aktivität mittels Caspase-Glo® 3/7	54
3.5. Induktion der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit HDACi	57
3.5.1. Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche	57
3.5.2. Nachweis von pChk1 und pChk2 als Marker für die DNA-Schadensantwort	61
3.6. Veränderung der Genexpression nach Behandlung mit HDACi	64
3.7. Synergistische Wirkung nach einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und HDACi	66
4 Diskussion.....	68
4.1. Isoenzym-Spezifität der neuen HDACi	69
4.2. HDACi reduzieren die Zellviabilität und verändern die Zellmorphologie	69
4.3. HDACi führen in UCCs zur Apoptose.....	71
4.4. HDACi induzieren Zellzyklusstörungen	71
4.5. HDACi induzieren DNA-Doppelstrangbrüche und reduzieren die Expression von Reparaturproteinen	74
4.6. HDACi führen zu Störungen in Genexpression	77
4.7. Kombination von DDK122 und Cisplatin verstärkt die Apoptose in UM-UC-3 ...	79
4.8. Schlussfolgerung	80

Inhaltsverzeichnis

Literatur- und Quellenverzeichnis	81
Anhang	90
Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellviabilitätskurve von UCCs und HBLAK nach Behandlung mit HDACi im Vorscreening.	8
Abbildung 2: Zellviabilität der UCCs nach 72h Behandlung mit HDACi.....	34
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h IC ₅₀ -Behandlung mit HDACi.	37
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie J82 nach 72h IC ₅₀ -Behandlung mit HDACi.	38
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie SW-1710 nach 72h IC ₅₀ -Behandlung mit HDACi.	39
Abbildung 6: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie HBLAK nach 72h IC ₅₀ -Behandlung mit HDACi.	40
Abbildung 7: Western Blot Analyse der Acetylierung von Histon H3 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	42
Abbildung 8: Western Blot Analyse der Acetylierung von Histon H3 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	42
Abbildung 9: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.	45
Abbildung 10: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie J82 nach 72h Behandlung mit HDACi....	46
Abbildung 11: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie HBLAK nach 72h Behandlung mit HDACi.	47
Abbildung 12: Mitose-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.	49
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.	51
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie J82 nach 72h Behandlung mit HDACi.....	52
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie HBLAK nach 72h Behandlung mit HDACi.	53
Abbildung 16: Caspase induzierter Zelltod von UCCs nach 72h Behandlung mit den HDACi.	55
Abbildung 17: Caspase-abhängiger Zelltod von HBLAK Zellen nach 24h Behandlung mit Etoposid als Positivkontrolle.	56
Abbildung 18: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der UM-UC-3-Zelllinie.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der J82-Zelllinie.	59
Abbildung 20: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der HBLAK-Zelllinie.	60
Abbildung 21: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk1 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	62
Abbildung 22: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk2 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	62
Abbildung 23: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk1 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	63
Abbildung 24: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk2 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.	63
Abbildung 25: relative mRNA-Expression der Zelllinien UM-UC-3 und J82 nach 72h Behandlung mit HDACi.	65
Abbildung 26: Die synergistische Wirkung von Cisplatin und DDK122 auf die UM-UC-3 Zelllinie.	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HDAC-Inhibitoren.....	11
Tabelle 2: Chemikalien.....	12
Tabelle 3: Puffer.....	13
Tabelle 4: Zellkulturmedien, -puffer, und -lösungen.....	13
Tabelle 5: Antikörper für Western Blot.	14
Tabelle 6: Antikörper für Immunzytochemie.	14
Tabelle 7: Antikörper für FACS.....	14
Tabelle 8: Molekularbiologische Kits.	15
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 10: Primer.....	16
Tabelle 11: Primer-Master-Mix für Reverse Transkription.....	16
Tabelle 12: RT-Master-Mix für Reverse Transkription.	16
Tabelle 13: Zusammensetzung des Primermixes für qPCR.	16
Tabelle 14: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für zwei Polyacrylamid-Gele.	17
Tabelle 15: Geräte.....	17
Tabelle 16: Software.	18
Tabelle 17: IC ₅₀ der HDACi auf UCCs nach 72h Behandlung.....	35

1 Einleitung

1.1. Das Urothelkarzinom

Im Jahr 2024 wurden weltweit ungefähr 614.298 neue Fälle von Harnblasenkarzinomen diagnostiziert, damit ist es die neunthäufigste Krebserkrankung weltweit (The Global Cancer Observatory 2024). Die Krankheit verursachte im selben Jahr rund 220.596 Todesfälle. Die Inzidenz- und Mortalitätsraten des Harnblasenkarzinoms sind bei Männern deutlich höher als bei Frauen. Männer sind viermal öfter als Frauen betroffen, mit entsprechenden Inzidenz- und Mortalitätsraten von 9,5 bzw. 3,3 pro 100.000 Männer (Sung et al. 2021). Das mittlere Erkrankungsalter liegt über 70 Jahren. Es wurden verschiedene Risikofaktoren identifiziert. Neben Geographie und Alter wird das Risiko stark durch die Exposition gegenüber Karzinogenen beeinflusst, wobei das Zigarettenrauchen am weitesten verbreitet ist (Bray et al. 2018; Teoh et al. 2020).

Das Urothelkarzinom umfasst Tumore der oberen Harnwege (Nierenbecken und Harnleiter), der Harnblase und der proximalen Harnröhre. Das Harnblasenkarzinom macht etwa 90% der Urothelkarzinome aus und steht daher im Mittelpunkt dieser Arbeit. 75% der Harnblasenkarzinome sind oberflächliche, nicht muskelinvasive Urothelkarzinome (NMIBC – *non-muscle invasive bladder cancer*), die auf die Mukosa oder Submukosa beschränkt sind. Die Mortalität ist gering, aber sie können häufig lokal rezidivieren, ein Teil der Tumoren entwickelt sich progredient zu einem höheren Tumorstadium. Bei 25% der Patienten ist das Blasenkarzinom bereits in tiefere Schichten der Blasenwand eingedrungen oder hat Metastasen (MIBC – *muscle-invasive and metastatic bladder cancer*) gebildet. Die transurethrale Resektion des Blasentumors (TURB) ist die Haupttherapie der Patienten mit NMIBC, während die radikale Entfernung der Blase (Zystektomie) und (neo)adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit MIBC durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2020; Dobruch und Oszczudłowski 2021).

Bei der metastasierten Erkrankungsform ist eine medikamentöse Tumorthherapie indiziert, wobei die Behandlung in Abhängigkeit von Allgemeinzustand, Komorbidität, Therapieziel und Verfügbarkeit wirksamer Arzneimittel erfolgt. Obwohl platinbasierte Chemotherapie seit über vier Jahrzehnten die Standardtherapie beim MIBC ist, zeigte sie keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Hinblick auf Nebenwirkungen und Überlebensrate. Etwa 50% der Patienten mit MIBC kommen aufgrund altersbedingter und/oder krankheitsbedingter Risikokomorbiditäten nicht in Frage (Patel et al. 2020; Kiemeney et al. 1993).

Bei etwa der Hälfte der Fälle, bei denen die platinbasierte Chemotherapie eine Option ist, kann im Verlauf der Therapie eine Resistenz auftreten. Es wurden molekularen Veränderungen in den

Tumorzellen beobachtet, die der Resistenz gegenüber dem Wirkstoff Cisplatin zugrunde liegen können. Diese Veränderungen umfassen reduzierte zelluläre Aufnahmeprozesse, verstärkte Inaktivierung des Cisplatin-Moleküls innerhalb der Zellen, gesteigerter Ausstoß des Wirkstoffs aus den Zellen, sowie eine erhöhte Toleranz der Zellen gegenüber durch Cisplatin verursachten DNA-Schäden und Apoptose (Skowron et al. 2018). Angesichts der Limitationen der Cisplatintherapie besteht ein Bedarf an klinisch relevanten Biomarkern und an Studien zu möglichen Kombinationstherapien (Liu et al. 2017). Zum bisherigen Standard der zytostatischen Behandlung kommen aktuell neue Optionen einer Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren, zielgerichtete Therapie (z.B. FGFR-Inhibitor) und Antikörper-Wirkstoff-Konjugate in der klinischen Anwendung hinzu (Lenis et al. 2020).

1.2. Genetik und Epigenetik des Urothelkarzinoms

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Identität einer Zelle sowohl durch genetische als auch durch epigenetische Muster definiert wird. Epigenetik beschäftigt sich mit der vererbaren, reversiblen Modifikation von DNA oder assoziierten Proteinen, die zu Veränderungen in der Expressionsregulation führen, ohne die DNA-Sequenz zu beeinflussen. Epigenetische Veränderungen treten im Verlauf eines Lebens um ein Vielfaches häufiger auf als genetische Mutationen. In den letzten zehn Jahren konzentrierte sich daher die Krebsforschung zunehmend auf epigenetische Mechanismen und ihre Bedeutung für die Onkobiologie (Akman und Erkek-Ozhan 2022). Die bekanntesten epigenetischen Mechanismen umfassen vier Hauptmechanismen: DNA-Methylierung, posttranslationale Histon-Modifikationen oder Chromatin-Umbau, Histon-Varianten und die Regulierung nichtkodierender RNAs (Kelly und Issa 2017; Kubicek et al. 2012). Diese Modifikationen werden durch mehrere Enzyme reguliert, die nach Funktion gruppiert sind. Zu diesen epigenetischen Enzymen gehören: Histon-Methyltransferasen (HTMs) und -Demethylasen (HDMs), DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und -Demethylasen (TETs), Histon-Acetyltransferasen (HATs) und -Deacetylasen (HDACs) sowie Histon-Ubiquitin-Ligasen (Ubls) und -Deubiquitinasen (dUbs) (Baylin und Jones 2016).

Das Harnblasenkarzinom sticht unter vielen anderen Krebsarten mit häufigen Mutationen von Genen hervor, die an der epigenetischen Regulation beteiligt sind (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Diese hohe Prävalenz von epigenetischer Dysregulation deutet darauf hin, dass epigenetische Veränderungen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Krebsart spielen. Mehrere Studien berichteten über häufige Mutationen in Urothelkarzinomen, darunter sind Gene, für deren Mutation bereits länger eine Assoziation mit dem

Einleitung

Urothelkarzinom bekannt war (*TP53*, *HRAS*, *FGFR3*, *PIK3CA*, *RB1*, *KRAS*, *TSC1*) und eher kürzlich entdeckte häufige Mutation in chromatinmodulierenden Genen (*KDM6A*, *ARID1A*, *ARID4A*, *KMT2A*, *KMT2D*, *EP300*) (Guo et al. 2013). Durch die genomischen Veränderungen sind drei wesentliche Regulationssysteme beeinflusst: Aktivierung von Zellproliferation und Überleben durch MAPK- und PI3K/AKT-Signaltransduktionswege, Störung in Zellzyklus- und Checkpoint-Kontrolle durch p53-Inaktivierung und *RB1*-Mutation und Blockierung der Seneszenz durch die p53-, RB1-, und p16-Funktionsverlust (Hoffmann und Schulz 2021).

Besonders relevant ist, dass mutierte Chromatin-Modifikatoren in Urothelkarzinomen vor allem die Organisation des aktiven Chromatins und die Aktivierung der Genexpression beeinflussen. Dies könnte zu einer kompakten Chromatinkonfiguration führen, die die Expression von Genen für die normale Zelldifferenzierung hemmt und gleichzeitig die Zellproliferation und Tumorentstehung begünstigt. Darüber hinaus sind weitere Chromatin-Modifikatoren wie z.B. HDACs aberrant exprimiert (Buckwalter et al. 2019; Niegisch et al. 2013). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die gestörte epigenetische Regulation eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Harnblasenkrebs spielt und neue therapeutische Ansätze ermöglichen könnte (Akman und Erkek-Ozhan 2022). Die potenzielle Reversibilität epigenetischer Veränderungen stellt ein attraktives Ziel für die Behandlung von Patienten mit Harnblasenkrebs dar, was letztendlich spezifische Behandlungsoptionen für diesen Krebs bieten könnte (Porten 2018).

1.3. HDAC und HDACi

Eine wichtige Gruppe von epigenetischen Enzymen in der Tumorforschung sind Histondeacetylasen (HDACs). Sie umfassen eine Familie von 18 Genen, die nach ihrer Ähnlichkeit mit Hefe-HDACs, ihrer subzellulären Lokalisierung und ihren enzymatischen Aktivitäten klassifiziert sind (West und Johnstone 2014). Die Klassen I, II und IV sind die „klassischen“ HDACs, sie bestehen aus 11 Isoenzymen, während die 7 Mitglieder der Klasse III als Sirtuine bezeichnet werden. Diese zwei Hauptgruppe unterscheiden sich in ihren katalytischen Mechanismen. Klassische HDACs sind Zn^{2+} -abhängige Enzyme, die eine katalytische Tasche mit einem Zn^{2+} -Ion an ihrer Basis enthalten. Im Gegensatz dazu erfordern die Enzyme der Klasse III NAD^+ als essenziellen Cofaktor. Der Begriff „HDAC-Inhibitoren (HDACi)“ bezieht sich auf Substanzen, die auf die Enzymaktivität der klassischen HDACs abzielen (Witt et al. 2009).

HDACs der Klasse I (HDAC1, 2, 3, 8) entfernen schwerpunktmäßig Acetylgruppen an Histonen, regulieren damit den Verpackungszustand des Chromatins. Im Allgemeinen ist daher eine hohe HDAC-Aktivität, insbesondere von Enzymen der Klasse-I mit kondensiertem, transkriptionell

Einleitung

inaktivem Chromatin verbunden. Sie sind daher wesentlich an der Regulation der Genexpression beteiligt. Diverse Studien schilderten, dass Klasse I HDAC-Überexpression besonders häufig bei Krebserkrankungen auftritt und mit Dedifferenzierungen, verstärkter Proliferation, Invasion, fortgeschrittener Erkrankung und schlechter Prognose im Zusammenhang steht (Witt et al. 2009; Pinkerney et al. 2017).

Die HDACs der Klasse II kommen im Zellkern und im Zytoplasma vor und deacetylieren sowohl Histone als auch nicht-histonische Proteine. Dadurch regulieren sie nicht nur die Genexpression, sondern auch das Zellwachstum, die Differenzierung und die zytoplasmatische Signaltransduktion. Diese Enzyme werden in zwei Untergruppen eingeteilt: Klasse IIa (HDAC4, 5, 7, 9) und Klasse IIb (HDAC6, 10). HDACs der Klasse IIa bei Vertebraten besitzen im katalytischen Zentrum ein Histidin anstelle des sonst typischen Tyrosins. Diese strukturelle Besonderheit ist mit einer deutlich geringeren enzymatischen Aktivität dieser Klasse verbunden (Lahm et al. 2007). Insbesondere HDAC6 der Klasse IIb ist wichtig für die Modifikation von Zytoskelettproteinen und die Stressantwort (Dokmanovic et al. 2007).

HDACs sind im Urothelkarzinom vielfach aberrant exprimiert (Buckwalter et al. 2019) und wurden daher als mögliche therapeutische Angriffspunkte diskutiert. Die AG Harnblasenkarzinom hat in langjährigen Vorarbeiten die Enzyme der HDAC Klasse-I als das am besten geeignete therapeutische Ziel beim Urothelkarzinom definiert, speziell die Isoenzyme HDAC1 und 2. HDAC8 scheint weniger geeignet (Lehmann et al. 2014; Pinkerney et al. 2016b). Die Funktion bzw. Relevanz von HDAC3 beim UC ist noch unklar. Offenbar wirken Klasse-I HDACi aber nicht nur kanonisch epigenetisch auf der Ebene der Genexpression auf diverse Signalwege, sondern entfalten zusätzlich einen auffälligen zytotoxischen Effekt, indem sie Störungen bei Replikation, Mitose und DNA-Reparatur bewirken. HDACi können die DNA-Replikation indirekt durch den Verpackungszustand des Chromatins sowie direkt durch Entstehung von Replikationsstress (Stengel und Hiebert 2015) und Akkumulation von DNA-Schäden (Hoffmann et al. 2021) beeinflussen. Hierzu gibt es auch Anhaltspunkte aus anderen Tumorentitäten (Bhaskara et al. 2008; Conti et al. 2010; Roos und Krumm 2016).

1.4. DNA-Schadensantwort und Zellzyklusarrest

Humane Zellen verfügen über eine Vielzahl von DNA-Reparatursystemen, um unterschiedliche Arten von DNA-Schäden zu reparieren. Ein Beispiel für schwerwiegende DNA-Schäden sind DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die bei mangelnder Reparatur zur Induktion von Zelltod führen können. Interessanterweise induzieren einige Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) DNA-DSB

Einleitung

(Lee et al. 2010). Zusätzlich haben einige HDACi die Fähigkeit gezeigt, die DNA-Reparaturwege der Homologen Rekombination (HR) über Herunterregulation von RAD51 oder MRE11 oder des Nicht-homologen Endjoinings (NHEJ) über ihren Einfluss auf acetyliertes Ku70/80 zu beeinträchtigen (Fernandez et al. 2021). Dieser Effekt könnte in der Krebstherapie genutzt werden, um schnell replizierende Tumorzellen gezielt in die Apoptose zu bringen. Folglich zeigen manche HDACi in Kombination mit DSB-induzierenden Chemotherapeutika eine synergistische Wirkung, indem sie die Empfindlichkeit gegenüber den Chemotherapeutika erhöhen (Zhao et al. 2017).

Gamma-H2AX (γ H2AX), auch als phosphoryliertes H2AX genannt, ist eine der ersten zellulären Reaktionen auf DNA-DSB. Es spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus-Checkpoints, der genomischen Instabilität, des Zellwachstums, der Mitose, der Embryogenese und der Apoptose. Die Phosphorylierung des Histons H2AX erfolgt rasch an einer spezifischen Serinposition, nämlich Serin-139, nach dem Auftreten von DNA-Schäden. Dies führt zur Bildung sogenannter "Foci" an der Schadensstelle und ist ein Schlüsselereignis bei der Aktivierung von Zellzyklusarrestmechanismen. Die Foci dienen als Ankerpunkte für die Rekrutierung von Proteinen und Enzymen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie 53BP1, BRCA1, MRE11, RAD50 und NBS1. Dies löst Signalkaskaden aus, die unter anderem an Cdc25 und Cdk5 weitergeleitet werden. ATM und ATR können die Phosphorylierung von H2AX zur Förderung der DNA-Reparatur verstärken oder das Signal an das Tumorsuppressorprotein p53 zur Zellzyklusregulation weiterleiten. In schweren Fällen von DNA-Schäden, die nicht erfolgreich repariert werden können, kann γ H2AX die betroffenen Zellen in die Apoptose führen. In der Forschung wird γ H2AX häufig als Marker für DNA-DSB eingesetzt. Der Nachweis von γ H2AX-Foci in Zellen kann dabei helfen, die Schwere von DNA-Schäden zu quantifizieren und die Wirksamkeit von Behandlungen wie Chemo- oder Strahlentherapie zu untersuchen (Merighi et al. 2021; Kuo und Yang 2008).

Der Zellzyklusarrest ist ein wichtiger Mechanismus in der Zellbiologie, der den normalen Ablauf des Zellzyklus, der die Zellteilung regelt, unterbricht oder verzögert. Er stellt eine entscheidende Antwort der Zellen auf verschiedene Stressfaktoren, DNA-Schäden oder unregelmäßige Umgebungsbedingungen dar, die die Integrität des genetischen Materials gefährdet könnten. Während des Zellzyklusarrests können Zellen diverse Strategien anwenden, um die Zellteilung zu stoppen und damit Zeit für die Reparatur von DNA-Schäden zu gewinnen. Die Proteine Chk1 und Chk2 sind zwei Komponenten der DNA-Schadensantwort. Obwohl sie unterschiedlich aufgebaut sind, haben sie ähnliche Aufgaben. Sie dienen als Vermittler für Signale von anderen Proteinen, insbesondere ATM und ATR, die den Prozess der DNA-Reparatur und -Kontrolle

Einleitung

überwachen. Chk2 ist den ganzen Zellzyklus hindurch aktiv, wird jedoch hauptsächlich durch ATM aktiviert, wenn es zu DSB oder Einzelstrangbrüchen kommt (Zannini et al. 2014). Im Gegensatz dazu ist Chk1 während der S- und G2-Phasen des Zellzyklus aktiv (Zhang und Hunter 2013). Chk1 und Chk2 können bei komplexen zellulären Schäden miteinander interagieren, was die ursprüngliche klare Unterscheidung zwischen ihnen teilweise aufweicht (Bartek und Lukas 2003). Beide Kinasen werden durch Phosphorylierung aktiviert (pChk1 und pChk2).

HDACi können ebenfalls den Zellzyklus beeinflussen und somit die Zellproliferation hemmen, indem sie die Expression einer Reihe von Zellzyklusproteinen hoch- und/oder herunterregulieren, einschließlich der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKi) p21waf1/cip1, p27Kip1 und p57Kip2 sowie der Cycline A und D (Ocker und Schneider-Stock 2007). Anders als in den meisten anderen Malignomen induzieren Klasse I HDACi, wie Romidepsin, Givinostat und Vorinostat, in Urothelkarzinomzellen einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (Kaletsch et al. 2018).

Neben ihren epigenetischen Wirkungen auf die DNA-Replikation, die DNA-Reparatur und den Zellzyklus stören HDACi scheinbar auch die Mitose. Alle diese Effekte sind für die vorliegende Arbeit relevant. Die Hemmung der Deacetylase-Aktivität in der Mitose kann zu einer fehlerhaften Mitose und Zytokinese in Form einer inkorrekten Ausrichtung der Chromosomen, einer fehlenden Verankerung der Mikrotubuli am Kinetochor, sowie einer Dysfunktion des Spindelkontrollpunktes führen (Gabrielli et al. 2011). Bei UCCs wird vermutet, dass die HDACi die Mitose im ersten Zellzyklus stören und in einigen Zellen deren Dauer verlängern. Dies wiederum führt zu einer Zunahme der Mitosen und des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase. Dieser Effekt kann später zu Replikationsstress und Störungen der S-Phase im zweiten Zellzyklus führen (Pinkerneil et al. 2016a).

In Vorarbeiten und in einem aktuellen Projekt dieser Arbeitsgruppe wird daher den oben genannten Mechanismen in UC-Zellen genauer nachgegangen, um diese Erkenntnisse für die Entwicklung von Kombinationstherapien z.B. mit einem Inhibitor der DNA-Reparatur zu nutzen. Dazu wurden unter anderem die Effekte einer siRNA-vermittelten Herunterregulation von Klasse-I HDACs auf Zellviabilität, Zellzyklusstörungen, Zelltodinduktion, DNA-Schadensinduktion und Veränderungen des Transkriptoms (RNA-Sequenzierung) mit der pharmakologischen Inhibition mit Klasse-I-spezifischen Substanzen (HDACi; z.B. Romidepsin) verglichen (Pinkerneil et al. 2016a; Hoffmann et al. 2021). Aufgrund der Vorergebnisse wurden neue Ansätze für Kombinationsbehandlungen mit HDACi und Cisplatin, PARP-Inhibitoren und Bromodomänenprotein-Inhibitoren (BETi) identifiziert und auf synergistische Effekte untersucht (Hölscher et al. 2018; Thy et al. 2021).

Einleitung

Derzeit basiert die neue Entwicklung der epigenetischen Therapie auf drei Strategien: kleine Moleküle, die epigenetische Enzyme hemmen, die Manipulation der miRNA-Expression und CRISPR/Cas9-basierte Ansätze. Der Einsatz von HDACi in der Krebsbehandlung wurde klinisch validiert und bisher wurden Medikamente für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms von der FDA zugelassen: Vorinostat (pan-HDACi), Romidepsin (Klasse I HDACi) und Belinostat (pan-HDACi). Diese zugelassenen Medikamente werden neben neuen experimentellen Medikamentenkandidaten wie Quisinostat und Reminostat, aktuell für die Harnblasenkarzinome in klinischen Studien Phase 1 oder 2 untersucht (Thompson et al. 2023). HDACi können in fünf chemische Verbindungsklassen eingeteilt werden: Hydroxamsäuren, kurzkettige aliphatische Fettsäuren, Benzamide, zyklische Peptide und Sirtuin-Inhibitoren. Vorinostat ist ein HDACi auf Basis einer Hydroxamsäurestruktur (Eckschlager et al. 2017). Quisinostat gehört ebenfalls zur Gruppe der Hydroxamsäuren und wurde als synthetischer, hochpotenter HDACi entwickelt (Ho et al. 2020). Romidepsin, ein Vertreter der zyklischen Tetrapeptide, wurde ursprünglich aus dem gramnegativen Bakterium *Chromobacterium violaceum* isoliert (Luo und Li 2020).

Ergebnisse wiesen auf potenzielle therapeutische Optionen in Kombination mit anderen Medikamenten wie Carboplatin, Paclitaxel und Pembrolizumab hin (Akman und Erkek-Ozhan 2022). Je nach HDACi wird ein mögliches therapeutisches Fenster durch zytotoxische Effekte auf normale Kontrollzellen begrenzt. Obwohl synergistische Effekte der Kombinationsbehandlung bei Urothelkarzinom-Zelllinien eine Dosisreduktion erlauben, wären diese reduzierten Dosen von z.B. Romidepsin immer noch für normale Uroepithelzellen relativ toxisch, so dass neue Kombinationstherapien, wie auch die klassische Chemotherapie, mit einer signifikanten Normaltoxizität vergesellschaftet wären. Daher sollten in dieser Arbeit neue HDACi mit einer möglichst niedrigen Normaltoxizität identifiziert und genauer untersucht werden.

1.5. Neue HDACi

Für diese Arbeit standen 235 neue HDACi Substanzen zur Verfügung, die von der AG Prof. Kurz (Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) synthetisiert wurden. Dabei wurde die Struktur von Hydroxamsäure-basierten HDAC-Inhibitoren, wie beispielsweise Vorinostat, gezielt durch Einführung von Alkoxyamid- (Alves Avelar et al. 2021; Asfaha et al. 2020), Alkoxyharnstoff- (Stenzel et al. 2017), Benzyl- und Peptoid-Gruppe (Diedrich et al. 2016; Porter et al. 2018) modifiziert. Ziel dieser strukturellen

Einleitung

Optimierungen war es, die Wirksamkeit gegenüber therapieresistenten Krebszellen zu steigern und gleichzeitig potenzielle Nebenwirkungen zu reduzieren.

In einem Vorscreen (siehe Abbildung 1) wurden diese mittels Viabilitätstest auf ihre zytotoxische Wirkung auf fünf kommerzielle Urothelkarzinom-Zelllinien (SW-1710, UM-UC-3, VM-CUB-1, J82 und RT-112) und einer kommerziellen normalen Uroepithelzelllinie (HBLAK) geprüft, um die besten 10 Substanzen zu definieren. Diese sind 1) im niedrigen mikromolaren Bereich bei Urothelkarzinom-Zelllinien wirksam und wirken, 2) nur begrenzt toxisch auf normale Uroepithelzellen. Hierfür stellte die Drug Screening Core Facility des Universitätsklinikums Düsseldorf die systematische *in vitro* Testung der neuen Substanzen im Hochdurchsatzformat bereit.

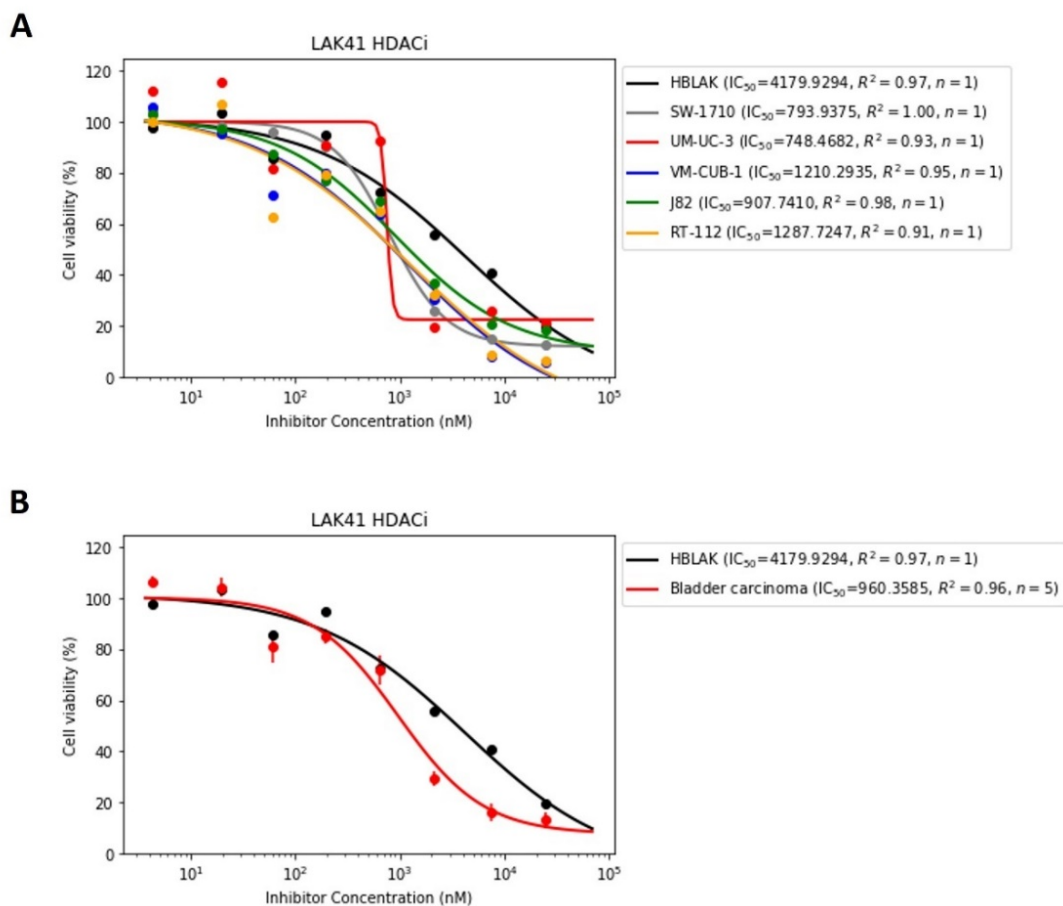


Abbildung 1: Zellviabilitätskurve von UCCs und HBLAK nach Behandlung mit HDACi im Vorscreening.

(A) Repräsentative Darstellung der Zellviabilität nach 72h Behandlung mit LAK41 in fünf UCCs (SW-1710, UM-UC-3, VM-CUB-1, J82 und RT-112) sowie in der Uroepithelzelllinie HBLAK. (B) Vergleich der Zellviabilität zwischen HBLAK und dem Mittelwert der untersuchten UCCs.

Einleitung

In der Vorarbeit erfolgte die Datenauswertung zur Selektion der TOP10 Substanzen. Als Auswahlkriterien wurden die Parameter AUC (Fläche unter der Kurve), IC_{50} (halbmaximale Hemmkonzentration) und R^2 (Determinationskoeffizient) berücksichtigt. Die ausgewählten TOP10 Substanzen sollten möglichst hohe AUC-Werte, niedrige IC_{50} -Werte und hohe R^2 -Werte aufweisen.

1.6. Zielsetzung

Die gegenwärtige Herausforderung in diesem Forschungsbereich liegt darin, enzymspezifische Inhibitoren zu entwickeln, die gezielt HDAC der Enzymklasse I inhibieren (HDAC1, 2, 3, 8) und spezifisch auf Krebszellen wirken, jedoch normale Zellen verschonen. Durch die Entwicklung von selektiven Inhibitoren, die die Aktivität der krebsrelevanten HDACs gezielt blockieren, können wir hoffen, die Progression des Urothelkarzinoms zu kontrollieren und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen auf normale Zellen zu minimieren.

In diesem Forschungsprojekt war das Hauptziel die Identifizierung neuer HDACi, die eine möglichst vergleichbare molekulare Wirkung wie Romidepsin entfalten, jedoch eine stärkere Spezifität für Tumorzellen aufweisen und eine geringere Beeinträchtigung normaler Zellen verursachen. Dies wurde durch eine umfassende Charakterisierung der neuen HDACi erreicht, bei der ihre Wirkung auf Zellproliferation von Urothelkarzinom-Zelllinien, Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose sowie die Auslösung von DNA-Schäden im Vergleich zu Romidepsin untersucht wurde.

Die Toxizität der neuen HDACi auf Urothelkarzinom-Zelllinien wurde quantitativ analysiert, um ihre Wirksamkeit bei der Unterdrückung des Tumorwachstums zu bestimmen. Anschließend wurde die Fähigkeit der neuen HDACi zur Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose untersucht, um zu verstehen, wie sie das Tumorwachstum durch Zellzyklusregulierung und Zelltod beeinflussen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Projekts war die Bewertung der DNA-Schädigung durch die neuen HDACi in den Urothelkarzinom-Zelllinien. Dies ermöglicht die Beurteilung ihres Potenzials, DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren, deren Reparaturmechanismen zu beeinflussen und somit das Überleben der Krebszellen zu beeinträchtigen. Zudem können über solche Effekte Kandidaten identifiziert werden, die für eine Kombination mit DNA-schädigenden Substanzen wie Cisplatin geeignet sein könnten.

Schließlich sollte die kombinierte Wirkung der neuen Klasse I HDACi mit Cisplatin, einem weit verbreiteten Medikament in der klinischen Behandlung von Urothelkarzinomen, untersucht

Einleitung

werden. Durch diese Kombination wurde angestrebt, eine synergistische Wirkung zu erzielen, bei der die beiden Therapieansätze sich gegenseitig verstärken und dadurch eine potenziell geringere Dosierung von Cisplatin ermöglichen, um Nebenwirkungen zu reduzieren.

Die gezielte Hemmung von HDACi ist eine vielversprechende Strategie sein, um spezifische und effektive Behandlungen für Urothelkarzinome zu entwickeln, die die Lebensqualität der Patienten verbessern und die Toxizität auf normale Zellen minimieren können. Das Projekt liefert somit wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Therapieoptionen in der Krebsbehandlung.

2 Material und Methoden

2.1. Material

Zelllinien

Als Zellmodelle wurden verschiedene kommerzielle Urothelkarzinom-Zelllinien für die Analysen in der vorliegenden Arbeit ausgewählt: SW-1710 Zellen, die im Hochdurchsatzscreen empfindlich gegenüber zahlreichen HDACi reagiert hatten; UM-UC-3 Zellen, die gegenüber zahlreichen Substanzen weniger responsiv waren und deshalb seit vielen Jahren von der Arbeitsgruppe detailliert auf ihr Ansprechen gegenüber HDACi untersucht werden. J82 Zellen wurden verwendet, da mit dieser Zelllinie ein Tiermodell in der Maus etabliert ist. Die benigne uroepitheliale HBLAK Zelllinie diente als Normalkontrolle.

Testsubstanzen

Die in dieser Arbeit untersuchten HDAC-Inhibitoren wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Kurz am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die chemischen Eigenschaften der getesteten Substanzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: HDAC-Inhibitoren.

Substanzen	Molekulargewicht (g/mol)	Enzymspezifität
DDK122	460,53	HDACi Klasse I und IIb
DDK137	460,53	HDACi Klasse I und IIb
KP6Hy	324,38	HDACi Klasse I und IIb
KSK43	331,37	HDACi Klasse I und IIb
LAK19	309,37	HDACi Klasse I und IIb
LAK39	316,35	HDACi Klasse I und IIb
LAK41	317,34	HDACi Klasse I und IIb
LAK74	330,38	HDACi Klasse I und IIb
LAK126	377,86	HDAC3-Inhibitor
YAK40	378,51	HDACi Klasse I und IIb
Romidepsin	540,70	HDACi Klasse I

Material und Methoden

Tabelle 2: Chemikalien.

Produkt	Hersteller
2-Propanol	VWR, Darmstadt, DE
Aceton	VWR, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Annexin V FITC-Konjugat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
BSA	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Cisplatin	Hexal, Holzkirchen, DE
DAPI	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt, DE
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Glycerin	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Luna® universal qPCR Master Mix	New England BioLabs, Frankfurt, DE
MACSQuant® Laufpuffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	VWR, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Mounting Medium	Dako Agilent, Hamburg, DE
MTT	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Polyacrylamid (PAA)	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Propidium iodide (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Roti®-Load 1 (4x)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Material und Methoden

Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt, DE
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, DE
Stripping Puffer Restore Plus	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Tris)	VWR, Darmstadt, DE
Tris-Glycin Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Tris-Glycin-SDS Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tween-20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
RNA-freies Wasser Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Ziegen Serum 2,5%	Vector Laboratories, CA, USA

Das verwendete Wasser zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde mit der Milli-Q® IQ 700 Anlage von Merck aufbereitet.

Tabelle 3: Puffer.

Puffer	Komposition
Annexin-Bindungspuffer	10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 1,6 mM CaCl ₂
Hypotonischer Lysispuffer	10 mM Tris pH 8,0, 1 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM 20x Reducing Agent, 1 mM PMSF
Nicoletti-Puffer	0,1% (w/v) Tris, 0,1% (v/v) Triton X-100, 50 µg/mL Propidiumiodid
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) IGEPAL® CA-630, 0,5% (w/v) DOC, 0,1% (w/v) SDS, 1 mM EDTA
TBS-Puffer (10x)	0,5 M Tris pH 7,6, 1,5 M NaCl
TBS-T-Puffer (1x)	10% (v/v) 10x TBS-Puffer, 0,1% (v/v) Tween-20
Tris-Glycin Puffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8,3
Tris-Glycin-SDS Puffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8.3

Tabelle 4: Zellkulturmedien, -puffer, und -lösungen.

Produkt	Hersteller
Accutase® -Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
CnT Prime	CELLnTEC, Bern, Schweiz
DMEM 4,5 g/L D-Glucose, mit Pyruvat	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Dulbecco's PBS ohne CaCl ₂ & MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Fetal calf serum (FCS)	Bio&SELL GmbH, Nürnberg, DE

Material und Methoden

Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Tabelle 5: Antikörper für Western Blot.

Produkt	Wirt	Verdünnung	Kat. -Nr.	Hersteller
Acetyl-Histon H3	Kaninchen	1:2000 ^a	39139	Active motif GmbH, Regensburg, DE
Chk1	Maus	1:1000 ^b	2360S	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE
Chk2	Maus	1:1000 ^b	3440S	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE
Histon H3	Maus	1:2000 ^a	39763	Active motif GmbH, Regensburg, DE
Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege	1:2000 ^c	P0448	Dako Agilent, Hamburg, DE
Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	Kaninchen	1:1000 ^c	P0260	Dako Agilent, Hamburg, DE
Phospho-Chk1 (Ser345)	Kaninchen	1:1000 ^b	2348S	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE
Phospho-Chk2 (Thr68)	Kaninchen	1:1000 ^b	2197S	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE
Vinculin	Maus	1:2000 ^a	05-386	Merck, Darmstadt, DE

^a in PBS mit 5% (w/v) Milch

^b in PBS mit 5% (w/v) BSA

^c in PBS mit 1% (w/v) Milch

Tabelle 6: Antikörper für Immunzytochemie.

Produkt	Wirt	Verdünnung	Kat. -Nr.	Hersteller
53-BP1	Kaninchen	1:250 ^d	ab175933	Abcam, Berlin, DE
Kaninchen-IgG (Alexa594-gekoppelt)	Ziege	1:500 ^d	A11012	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Maus-IgG (Alexa488-gekoppelt)	Ziege	1:250 ^d	A11029	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Phospho-Histone H2A.X (Ser139)	Maus	1:100 ^d	80312S	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE

^d in PBS mit 1% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) Triton X-100

Tabelle 7: Antikörper für FACS.

Produkt	Wirt	Verdünnung	Kat. -Nr.	Hersteller
Kaninchen-IgG (Alexa488-gekoppelt)	Ziege	1:500 ^e	A11034	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Phospho-Histone H3 (Ser10)	Kaninchen	1:1600 ^e	53348	Cell Signaling Technology, Frankfurt, DE

^e in PBS mit 0,5% (w/v) BSA

Tabelle 8: Molekularbiologische Kits.

Produkt	Hersteller
Caspase-Glo 3/7	Promega, Fitchburg, USA
CellTiter-Glo® Luminescent	Promega, Fitchburg, USA
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
QIAshredder	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Super Signal West Femto Pierce	Thermo Scientific, Darmstadt, DE

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Advanced TC Zellkulturplastik für HBLAK	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Deckgläser	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Dispenser Tips	Starlab, Hamburg, DE
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf SE, Hamburg, DE
FACS-Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Glaspasteurpipetten 225 mm	Brand, Wertheim, DE
Mehrfachdispenser-Pipetten Combitips advanced®	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, DE
PCR Multiwellplatte	Brand, Wertheim, DE
PCR Multiwellplatte-Folie	Brand, Wertheim, DE
Pipettenspitzen CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
PVDF-Membran Immobilon® -P Transfer Membranes	Merck, Darmstadt, DE
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Whatman-Papier	GE Healthcare Life Science, Freiburg, DE
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellzählkammer	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Zentrifuge-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Tabelle 10: Primer.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Hersteller
<i>BCCIP</i>	TGTGGGCCTTCTCCTAAGTG	GCACTTCCCACATGGCTTAT	Sigma-Aldrich
<i>ESPL1</i>	ACAGGACTGTGGCTGGAAAT	TGAATGTCCTGAGGGGTGA	Sigma-Aldrich
<i>MCM2</i>	AGATGGACCAGGACAAGGTG	ACATAGTCCCGCAGATGGAT	Sigma-Aldrich
<i>MCM3</i>	AGCTGTGGAGTTGGTCCAGT	GGTCCTCTTGGCTTTTCTCC	Sigma-Aldrich
<i>NCAPG</i>	TTTATGCTTGGGATGCTGTG	CGAACGTCATCAGTTGGTCA	Sigma-Aldrich
<i>PLK4</i>	ACCCAACGAGAGAGAGAGCA	GAGATGTCTGTTCCAGAAGCTG	Sigma-Aldrich
<i>TBP</i>	ACAACAGCCTGCCACCTTA	GAATAGGCTGTGGGGTCAGT	Sigma-Aldrich
<i>SDHA</i>	GCCAGGACCTAGAGTTTGTCA	CTTCGCCTTGACTGTTAATGA	Sigma-Aldrich

Tabelle 11: Primer-Master-Mix für Reverse Transkription.

Produkt	Vol/Ansatz	Hersteller
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Oligo(dT)18 Primer 100 µM=100 pmol/µl	0,5 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Random Hexamer Primer 100 µM=100 pmol/µl	0,5 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE

Tabelle 12: RT-Master-Mix für Reverse Transkription.

Produkt	Vol/Ansatz	Hersteller
SuperScript IV RT-Buffer (5x)	4,0 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Maxima H Minus Reverse Transcriptase	1,0 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	Thermo Scientific, Darmstadt, DE

Tabelle 13: Zusammensetzung des Primermixes für qPCR.

Primer	Vol/Ansatz
Primer forward 100 pmol/µl	0,05 µl
Primer reverse 100 pmol/µl	0,05 µl
H ₂ O	7,9 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für zwei Polyacrylamid-Gele.

Chemikalien	Trenngel 10%	Trenngel 15 %	Sammelgel
H ₂ O	4 ml	2,3 ml	3,4 ml
PAA 30%	3,3 ml	5,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
1,0 M Tris 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

Tabelle 15: Geräte.

Produkt	Hersteller
Absaugsystem Aspir8 basic	CellMedia, Zeitz, DE
Analysewaage	Sartorius, Göttingen, DE
Blotting Apparatur Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Brutschrank 37°C, 5% CO ₂	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Durchflusszytometer MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Elektrophorese-Stromversorgung PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Fluoreszenzmikroskop Leica Thunder Imager	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Heizblock Thermomixer 5439	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Kolbenhubpipetten	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Kühlzentrifuge Allegra™ 21R	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Lichtmikroskop Nikon eclipse Ts2	Nikon, Düsseldorf, DE
Lichtmikroskop Nikon eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf, DE
LightCycler® 96	Roche, Penzberg, DE
Lumineszenz-Detektionsgerät ChemiDoc™ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Lumineszenz-Detektionsgerät Wallac VICTOR2 1420 MULTILABEL COUNTER	Perkin Elmer Life Sciences, Hamburg, DE
Multipipette	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Microplate Absorbance Reader iMark	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
NanoDrop	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
pH-Meter pH537	WTW, Weilheim, DE

Material und Methoden

Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Rollschüttler RS-TR05	PHOENIX Instrument, Garbsen, DE
Rotationsmischer	LABINCO BV, Breda, Niederlande
Thermomixer 5436	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Tischzentrifuge Centrifuge 5418	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Wippschüttler Cole-Parmer™ Stuart™ SSL3	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
Zentrifuge 5810	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Zellzähler TC20	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE

Tabelle 16: Software.

Software	Hersteller
CompuSyn	ComboSyn, Paramus, USA
GraphPad Prism Version 9.4.1	GraphPad Software, San Diego, USA
Image Lab™ Version 6.0.1	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
Leica LAS X Version 3.7.5.24914	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
LightCycler® 96	Roche, Penzberg, DE
MACSQuantify™ Version 2.13.3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Microsoft office 2016	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microplate Manager (MPM 6) Version 6.3	Bio-Rad Laboratories, Düsseldorf, DE
NanoDrop Version 1.6.198	Thermo Scientific, Darmstadt, DE
NIS-Elements Version 4.20.01	Nikon, Düsseldorf, DE
Wallac 1420 Manager Version 3.00.0.53	Perkin Elmer Life Sciences

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultivierung

Die humanen kommerziellen Urothelkarzinom-Zelllinien (UCCs) UM-UC-3, J82 und SW-1710 wurden von Dr. B. Grossmann (Houston, TX, USA) bzw. von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, DE) zur Verfügung gestellt. Die gutartige Urothelzelllinie HBLAK wurde von der Firma CELLnTEC (Bern, Schweiz) bezogen. Unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C, Wasserdampf-gesättigt) wurden alle Zelllinien als *Monolayer* kultiviert.

Zur Kultivierung der UM-UC-3, J82 und SW-1710 wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) ergänztes *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glukose und Pyruvat verwendet. Die Zellen wurden zweimal pro Woche mit einem Splittfaktor von 1:6 bis 1:20 passagiert. Sobald die Zellen etwa 80% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit einer Lösung aus 0,5% (w/v) Trypsin und 0,2% (w/v) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in DMEM + 10% FCS suspendiert. Ein Teil dieser Suspension wurde danach in eine neue, mit DMEM + 10% FCS aufgefüllte Zellkulturflasche, gegeben.

Für die HBLAK-Zellen wurden Zellkulturflaschen mit modifizierter Polymer-Oberfläche und *Epithelial Cell Culture-Medium* (CnT Prime) ohne FCS verwendet. Die Zellen wurden zweimal pro Woche mit einem Splittfaktor von 1:5 passagiert. Die Zellen wurden mit Accutase von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst, gefolgt von einer vierminütigen Inkubation bei 37°C. Die Zellsuspension wurde dann 5 Minuten bei 100 xg zentrifugiert. Medium und Accutase-Lösung wurden entfernt, das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und ein Teil dieser Suspension wurde danach in eine neue Zellkulturflasche mit CnT Prime gegeben.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Sobald die Tumorzelllinien etwa 80% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie aus der Kulturflasche mit 0,5% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in DMEM + 10% FCS suspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde in einem 15 mL-Röhrchen gesammelt und resuspendiert. 10 µL Zellsuspension wurde mit 10 µL Trypanblau (0,25%) versetzt. Trypanblau dringt durch die geschädigte Plasmamembran toter Zellen ein und färbt die Zellen blau an. Ein Objektträger mit Zählkammer (Bio-Rad) wurde dann mit 10 µL dieser Mischung beschickt. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (TC20 Bio-Rad).

Zur Vorbereitung der HBLAK-Zelllinie wurde zuerst das Medium abgenommen. Zum Ablösen der Zellen aus der Kulturf Flasche wurde Accutase gegeben, gefolgt von einer vierminütigen Inkubation bei 37°C. Wie bei der Subkultivierung wurden die Zellen in Medium suspendiert, in einem 15 mL-Röhrchen gesammelt und für 5 Minuten bei 100 xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Zellsuspension wurde mit Trypanblau (0,25%) im Verhältnis von 1:1 versetzt. Die Zellzahl wurde wie oben beschrieben bestimmt.

2.2.3. Zellviabilitätstest zur Bestimmung von IC₅₀

Der MTT-Test ist ein weit verbreiteter Ansatz zur Messung der Zellviabilität von Arzneimitteln (Stepanenko und Dmitrenko 2015). Das Testprinzip beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen gelben Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) in ein unlösliches blau-violett gefärbtes Formazan durch mitochondriale Reduktase. Durch Zelllyse wird das Formazan solubilisiert und die Konzentration durch optische Dichte photometrisch quantifiziert (Lindl 2000).

Für den MTT-Test wurden vier Zelllinien verwendet: SW-1710, UM-UC-3, J82 und HBLAK als Kontrolle. Die Zellkonzentrationen der jeweiligen Zelllinien in 96-Well-Platten wurden experimentell je nach Wachstumsgeschwindigkeit ausgewählt. Für SW-1710 und UM-UC-3 wurden 50 µl Zellsuspension mit einer Zelldichte von 2.000 Zellen/Well in jede Vertiefung pipettiert. Für J82 und HBLAK wurden in jede Vertiefung 50 µl Zellsuspension mit einer Zelldichte von 4.000 Zellen/Well gegeben. Wie bei der Zellkultivierung wurden für HBLAK Zellen eine 96-Well-Platte mit modifizierter Polymer-Oberfläche verwendet. Um die Verdunstung zu minimieren, blieben die erste und letzte Reihe der Platte unbehandelt. Die letzte Spalte der Platte enthielt keine Zellen, sondern nur Medium und diente als Leerwert (Blank) bei der Auswertung. Anschließend wurden die Zellen in 96-Well-Platten unter Standardbedingungen 24 Stunden inkubiert.

Die Testsubstanzen wurden in DMSO als 20 mM Stocklösung gelöst. 50 µL Lösung in verschiedenen Konzentrationen wurde auf die Zellen gegeben, sodass jede Platte mit Substanzen in folgenden Endkonzentrationen behandelt wurde: 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 µM. Als Lösungsmittel-Kontrolle diente eine entsprechende DMSO-Lösung. Zur Behandlung wurden die Zellen für 72 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert.

Nach der Behandlung erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Zellviabilität. Um die Zellviabilität zu quantifizieren, wurde 10 µL der MTT-Lösung (5 mg/mL in PBS) in jede Vertiefung hinzupipettiert. Danach bedurfte es eines Inkubationsschrittes von einer Stunde (für UM-UC-3,

Material und Methoden

J82 und SW-1710) bzw. 2,5 Stunden (für HBLAK) im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 50 µl DMSO zur Zelllyse und Freisetzung des blauen Formazan hinzugegeben. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit Hilfe eines Plattenlesegeräts (iMark, Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 750 nm.

Für die Auswertung wurden die OD-Werte beider Wellenlängen und der Blank-Wert substrahiert. Die Zellviabilität (%) der behandelten Zellen wurde aus den OD-Werten wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität (\%)} \text{ des behandelten Well} = \frac{\text{OD des behandelten Well}}{\text{OD des DMSO}} \times 100$$

Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung erfolgte mit der Software Microsoft Excel. Die oben genannte Messung wurde als 4-fach-Bestimmung pro Konzentration durchgeführt.

Die Konzentration, bei der die Zellviabilität bei 50% liegt, entspricht dem IC₅₀-Wert. Mithilfe von GraphPad Prism (Version 9.4.1) wurde eine Konzentrations-Inhibitionskurve jeder Substanz erstellt und deren IC₅₀-Wert berechnet.

2.2.3.1. Synergie-Bestimmung von Kombinationsbehandlung

Durch eine Kombinationsbehandlung wurde untersucht, ob DDK122 und Cisplatin zusammen eine synergistische Wirkung auf UM-UC-3-Zelllinie resultieren. Dazu wurden einen MTT-Viabilitätstest wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Für den MTT-Test wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 2.000 Zellen/Well in 96-Well-Platte ausgesät. Die Behandlung erfolgte einzeln oder in Kombination, mit Konzentration von 0,25x; 0,5x; 0,75x; 1x; 1,5x; 2x IC₅₀ für 72 Stunden. Die IC₅₀ von DDK122 wurde experimentell durch MTT-Test bestimmt und die IC₅₀ von Cisplatin wurde aus einer Vorarbeit von der Arbeitsgruppe übernommen. Als Lösungsmittel-Kontrolle diente eine entsprechende DMSO-Lösung.

Für die Auswertung wurde die Zellviabilität (%) von der Einzel- und Kombinationsbehandlung ausgerechnet (Formel siehe Kapitel 2.2.3). Anhand der Werte wurde Fa (*fraction affected*) wie folgt berechnet:

$$Fa = 1 - (\text{Zellviabilität})$$

Unter Verwendung von Software CompuSyn wurde der Effekt von Kombinationsbehandlung (CI *combination index*) im Vergleich zur einzelnen Behandlung analysiert. Das resultierende Kombinationsindex (CI) bietet eine quantitative Definition für additive Wirkung (CI = 1),

Synergismus ($CI < 1$) und Antagonismus ($CI > 1$) in Arzneimittelkombinationen (Chou 2010). Mithilfe von GraphPad Prism (Version 9.4.1) wurde eine Konzentrations-Inhibitionskurve erstellt.

2.2.4. Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen in 6-Well-Platten unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellkonzentrationen der jeweiligen Zelllinien in 6-Well-Platten wurden experimentell je nach Wachstumsgeschwindigkeit ausgewählt. Für SW-1710 und UM-UC-3 wurden 2 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 50.000-75.000 Zellen in jede Vertiefung pipettiert. Für J82 und HBLAK wurden in jede Vertiefung 2 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 150.000 - 200.000 Zellen/Well gegeben. Die Testsubstanzen wurden in ihrer zelllinienspezifischen IC_{50} -Konzentration appliziert. Die Behandlung mit den HDACi und DMSO als Kontrolle wurde für 72 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisiert. Hierfür wurden das Medium und PBS in FACS-Reaktionsgefäße angesammelt, um tote Zellen aufzunehmen. Jede Probe wurde hierbei auf zwei Röhrchen aufgeteilt, um eine parallele Messung von Zellzyklus und Apoptose zu ermöglichen. Die adhärenenten Zellen wurden nach ihrer enzymatischen Ablösung zusammen mit dem Überstand für 5 Minuten bei 300 xg abzentrifugiert. Danach erfolgt ein Waschschriff mit PBS.

2.2.4.1. Zellzyklusanalyse

Zur Effektbestimmung der epigenetischen Inhibitoren auf den Zellzyklus wurden die Zellpopulation durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid (PI) untersucht. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich quantitativ an die DNA und RNA anlagert. Der RNA-Anteil wird mittels RNase eliminiert. Dadurch lässt sich DNA-Gehalt proportional zur Stärke des PI-Signal bestimmen. Anschließend wird der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalt ermittelt. In der G1-Phase beginnt die Zelle zu wachsen und die Zellen haben einen vollständigen Chromosomensatz. Die Replikation der DNA passiert in der S-Phase und am Ende der Phase liegt der zweifache Chromosomensatz vor. In der G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die mitotische Teilung vor, an dessen Ende wieder der einfache Chromosomensatz vorhanden ist. Zusätzlich zu diesen Phasen kann eine sog. sub-G1-Phase vorliegen, die durch degradierte DNA charakterisiert ist. Diese geht z.B. auf apoptotische, nekrotische Zellen oder Zellen mit Mikronuklei bzw. Chromosomenklumpen zurück (Riccardi und Nicoletti 2006).

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in FACS-Reaktionsgefäße wie oben beschrieben vorbereitet. Zu jeder Probe wurde 500 µl Farblösung (50 µg/ml PI, 200 µg/ml RNase A in Nicoletti-Puffer) pipettiert. Die Zellen wurden im Dunkeln für 30 Minuten bei RT inkubiert, bevor sie mit einem MACSQuant® Analyser analysiert wurden. Die Messung und Auswertung wurde mittels der MACSQuantify™ Software durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einem Histogramm (Y: Häufigkeit, X: Fluoreszenzintensität) dargestellt. Die Darstellung der Häufigkeit von Zellen (%) in den jeweiligen Phasen in einem Säulendiagramm erfolgte mit der Software Microsoft Excel.

2.2.4.2. Apoptose-Bestimmung

Die durchflusszytometrische Analyse der apoptotischen Zellen basiert auf einer Zellmarkierung mittels Annexin V (FITC-gekoppelt) und PI. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das unter physiologischen Bedingungen auf der Innenseite der Zellmembran vorliegt. In früh-apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert, so dass die Zellen als Annexin V-positiv markiert werden. Nekrotische Zellen können nach Membranzerfall auch Annexin V-positiv und PI positiv sein. Daher ermöglicht eine Kombination mit PI eine Unterscheidung von früh apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Fähigkeit von PI, in eine Zelle einzudringen, hängt von der Permeabilität der Membran ab. Aufgrund des intakten Plasmamembran färbt PI keine lebenden (Annexin V-/PI-) oder früh apoptotischen Zellen (Annexin V+/PI-). In spät apoptotischen und nekrotischen Zellen nimmt die Integrität der Plasmamembran ab, wodurch PI die Membran passieren und in Nukleinsäuren interkalieren kann (Annexin V+/PI+) (Vermes et al. 1995; Crowley et al. 2016).

Für die Apoptose-Analyse wurden die Zellen in FACS-Reaktionsgefäße wie oben beschrieben vorbereitet. Zu jeder Probe wurde 80 µl Farblösung (70 µl Annexin-Bindungspuffer, 2,5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 7,5 µl PI-Lösung (0,2% (w/v) PI in PBS)) pipettiert. Die Zellen wurden im Dunkeln für 15 Minuten bei RT inkubiert. Vor der Messung wurden 500 µl Annexin-Bindungspuffer zugegeben. Die Fluoreszenz wurde dann mit einem MACSQuant® Analyser und dem Programm MACSQuantify™ analysiert und ausgewertet. Die Darstellung der Häufigkeit der Zellen (%) im jeweiligen Zellzustand in einem Säulendiagramm erfolgte mit der Software Microsoft Excel.

2.2.4.3. Phospho-Histon H3

Die Phosphorylierung von H3, insbesondere bei Ser10, ist entscheidend für das Fortschreiten der Mitose. Sie reguliert die Chromatinkondensation, wenn die Zellen in die M-Phasen eintreten, und koordiniert die mit der M-Phase assoziierte Chromatin-Dekondensation. Daher kann phosphoryliertes Histon H3 als Mitosemarker dienen (Hendzel et al. 1997; Hans und Dimitrov 2001).

Um die Phospho-Histon H3 (pH3)-positiven Zellen zu bestimmen wurden UM-UC-3-Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben behandelt und kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsinisiert und durch Zentrifugation gesammelt. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS resuspendiert. Es wurde 500 µl 8% Formaldehyd (v/v) in PBS tropfenweise zugegeben, um eine homogene Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Fixation der Zellen wurde für 15 Minuten bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem Überschuss an PBS durch Zentrifugation gewaschen und der Überstand wurde entfernt. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 Minuten inkubiert und zweimal mit einem Überschuss an PBS gewaschen. Der Antikörper gegen Phospho-Histon H3 wurde in einer Verdünnung von 1:1.600 in Inkubationspuffer (0,5% (w/v) BSA in PBS) eingesetzt. Die Zellen wurden in 200 µl Antikörperlösung für eine Stunde bei RT inkubiert und zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen. Danach bedurfte es eines Inkubationsschrittes in sekundären Antikörperlösung (1:500 in Inkubationspuffer) von 30 Minuten im Dunkeln bei RT, gefolgt von zweimal Waschschritten mit Inkubationspuffer. Weitergehend wurden die Zellen in 500 µL PBS und 12,5 µL PI-Lösung (Stocklösung 0,2% (w/v) PI in PBS) resuspendiert. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels MACSQuant® Analyser gemessen.

2.2.5. Apoptose-Bestimmung mittels Caspase-Glo® 3/7 und Celltiter-Glo® Test

Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität in vitalen Zellen wurden die Caspase-Glo® 3/7 und CellTiter-Glo® Tests (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Der Caspase-Glo® 3/7 Test enthält ein prolumineszierendes Substrat. Durch die Spaltung mittels Caspase-3/7 wird Aminoluciferin freigesetzt, welches in einer Folgereaktion von der Luciferase umgesetzt wird. Das dabei entstehende luminometrische Lichtsignal ist proportional zur Caspase 3/7-Aktivität (Promega Corporation 2023b). Der CellTiter-Glo® Test basiert auf der Quantifizierung des vorhandenen ATP, welches ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Das erzeugte Lumineszenzsignal ist proportional zur Menge des vorhandenen ATP und somit

proportional zur Zahl vitaler Zellen (Promega Corporation 2023a). Die beiden Reagenzien wurden nach Protokoll des Herstellers vorbereitet.

Wie unter 2.2.4 beschrieben wurden die Zellen mit HDACi behandelt und kultiviert. Nach 72h Behandlung in 6-Well-Platten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Nach dem Abzentrifugieren (5 Minuten, 300 g) wurde das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Jeweils 50 µl Zellsuspension wurde in zwei 96-Well-Platten identisch übertragen, pro Bedingung vier Replikate. Als Leerwert (Blank) wurden 4 Wells mit 50 µl Medium befüllt. Bei einer der Platten wurde 50 µl CellTiter-Glo®-Reagenz hinzugefügt, danach für 10 Minuten bei RT inkubiert. In die andere Platte wurde 50 µl Caspase-Glo® 3/7 Assay- Reagenz einpipettiert, danach wurde die Zellen für eine Stunde bei RT inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde mittels Plattenlesegerät Wallac VICTOR2 1420 gemessen.

Für die Auswertung wurden die Messwerte und der Blank-Werte substrahiert. Die Caspase-Aktivität der behandelten Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Caspase – Aktivität} = \frac{\text{Caspase – Glo} - 3 / 7}{\text{CellTiter – Glo}}$$

Die Caspase-Aktivität der behandelten Zellen wurde im Vergleich zu der Caspase-Aktivität der DMSO-Kontrolle ausgewertet und dann eine Grafik davon erstellt. Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 9.4.1).

2.2.6. Proteinanalyse

2.2.6.1. Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen ermöglichen den Nachweis von Abundanz und intrazellulärer Lokalisation von Antigenen in verschiedenen Gewebe- bzw. Zellpräparationen. Hierbei bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein Epitop des gesuchten Proteins. Sekundärantikörper binden wiederum an den Primärantikörper und durch den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff wird dies unter dem Mikroskop sichtbar. Der Nachweis von phosphoryliertem γH2AX und 53BP1 wurden als Doppelfärbung durchgeführt.

Vor dem Aussäen von Zellen wurden die 6-Well-Platten mit 5 runden Deckgläsern (Ø 12 mm) pro Well vorbereitet, sodass die Zellen auf Deckgläsern wachsen. Die Behandlung und Kultivierung der Zellen wurden wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Die behandelten Zellen in 6-Well-Platten wurden für 72 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Immunzytochemie-Färbung wurde mit der Fixation der Zellen in 3% Formaldehyd (v/v in PBS) für 10 Minuten bei RT angefangen,

Material und Methoden

gefolgt von 2-mal Waschen mit PBS. Die Zellen auf den Deckgläsern wurden dann mit 0,3% Triton X-100 in PBS für 10 Minuten permeabilisiert und 2-mal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in 2,5% Ziegen Serum für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Primärantikörper für γ H2AX und 53BP1 wurden in Antikörperpuffer (1% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) Triton X-100 in PBS) verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer aufgebracht. Pro Deckglas wurden 50 μ L Antikörperlösung verwendet. Anschließend wurden die Zellen 4-mal mit PBS je 10 Minuten gewaschen. Die Sekundärantikörper (fluoreszenz-gekoppelte Kaninchen-IgG und Maus-IgG) wurden als Doppelfärbung in Antikörperpuffer (1% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) Triton X-100 in PBS) eingesetzt. Pro Deckglas wurden 50 μ L Antikörperlösung verwendet. Kombinationen und Verdünnungen von primären und sekundären Antikörpern, die zur Immunfärbung jedes Zielantigens verwendet werden, sind in Tabelle 6 angegeben.

Nach einer Inkubation mit Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT im Dunkeln wurden die Zellen 3-mal mit PBS je 10 Minuten gewaschen. Da die Zellen nun mit Fluoreszenz-Farbstoffen gefärbt waren, wurden die nächsten Schritten im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden in 0,5 mL DAPI-Lösung (Stammlösung: 0,5 mg/mL, Verdünnung 1:4000 in PBS) für 2 Minuten bei RT inkubiert und dann 2-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Deckgläser mit Mounting Medium (Dako) auf Objektträgern fixieren und dunkel bei 4 °C bis zur Bildaufnahme gelagert.

Die Mikroskopie wurde auf einem Leica Mikroskop durchgeführt, das mit einer Leica K5 Digitalkamera ausgestattet war und freundlicherweise vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie zur Verfügung gestellt wurde. γ H2AX wurde durch Aufnahme des Fluoreszenzsignals im FITC-Kanal (475 nm) bewertet und 53BP1 im TRITC-Kanal (560 nm). Durch blau fluoreszierende Gegenfärbung DAPI (390 nm) wurde die Kernmorphologie betrachtet. Sowohl bei einer Vergrößerung von 40-fach als auch von 63-fach wurde die Bildaufnahme und -Bearbeitung mit der Software Leica Las X durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Bilder bearbeitet. Dazu wurden die schwarz-weiß FITC- und TexRed-Bilder in Grün- und Rottöne konvertiert und ein Komposit davon erstellt. DAPI-Bilder wurden in schwarz-weiß dargestellt.

2.2.6.2. Protein-Isolierung

Für die Proteinisolierung wurden die Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben behandelt und kultiviert. Die Behandlung mit HDACi und DMSO als Kontrolle wurde für 72 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. 50 μ L Lysis-Puffer (1 % (v/v) Protease-Inhibitor und 1 % (v/v) Phosphatase-Inhibitor

in RIPA-Puffer) wurden in jedes Well gegeben, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Mittels Zellscriper wurden die Zellen abgelöst und das Lysat gesammelt. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, gut gevortext und dann zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 12.000 xg). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.6.3. Histon-Isolierung

Die Histonisolierung wurde mittels Säure- und Hochsalzextraktionsmethode (Shechter et al. 2007) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.2.4 beschrieben behandelt und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und bei 1.800 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Zellpellet konnte weiter aufgearbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Um die Histone weiter zu isolieren, wurde die Zellen in 1 mL hypotonischem Lysispuffer resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die Zellen durch mechanische Scherkraft zu lysieren, wurde die Probe für eine Stunde bei 4°C rotiert. Hiernach wurden die intakten Nuklei bei 4°C und 10.000 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Nuklei wurden in 400 µl 0,2 M H₂SO₄ gut resuspendiert. Die Probe wurde bei 4°C über Nacht rotiert. Dieser Schritt ermöglicht die Trennung der Histone von anderen Kernproteinen und Nukleinsäuren. Während sich die Histone in Säuren lösen, präzipitieren die meisten Kernproteine und Nukleinsäuren im sauren Milieu. Weitergehend wurde die Probe bei 4°C und 16.000 xg für 10 Minuten zentrifugiert, gefolgt von der Überführung des Überstands in ein frisches Eppendorfgefäß. Um die Histone von der Lösung zu trennen wurden 132 µl TCA tropfenweise gegeben und das Gefäß mehrmals invertiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Um die Säure aus der Lösung zu eliminieren, wurden die Probe bei 4°C und 16.000 xg für 10 Minuten pelletiert und dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, ohne das Proteinpellet aufzulösen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Histon-Pellet bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde je nach Pelletgröße in 50 µl bis 100 µl H₂O aufgenommen. Die Histonproben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinproben wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce™) verwendet. Der Test basiert auf die Reduktion der Kupferionen (Cu²⁺ → Cu¹⁺) in einer alkalischen Umgebung durch Peptidbindung. BCA (Bicinchoninsäure) ist ein stabiles und

hochspezifisches Reagens für Cu^{1+} , dabei entsteht ein violetter Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann (Smith et al. 1985).

Zunächst wurden die Proteinproben 1:5 in RIPA-Puffer verdünnt und 10 μl davon auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Als Standard wurden 10 μl BSA (Rinderserumalbumin) in einer Verdünnungsreihe von 2.000 $\mu\text{g/ml}$ bis 32 $\mu\text{g/ml}$ in RIPA-Puffer in Zweifach-Verdünnungsschritten mitgeführt, wie auch 10 μl RIPA-Puffer als Leerprobe. Anschließend wurden jeweils 200 μl BCA-Mix (Reagenzien B und A im Verhältnis 1:50) in jedes befüllte Well hinzugefügt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Absorption bei 562 nm wurde mit Hilfe eines Plattenlesegeräts (iMark, Bio-Rad) gemessen. Mittels des Programms Microplate Manager (MPM 6) wurde die Proteinkonzentration nach Abzug des Hintergrundwertes anhand der Standardkurve berechnet.

Die Konzentrationsbestimmung der Histonproben wurde mittels BCA-Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Messung wurden die Histonproben 1:2 in dest. H_2O verdünnt. Als Standard wurden BSA mit dest. H_2O in der Verdünnungsreihe von 2.000 $\mu\text{g/ml}$ bis 32 $\mu\text{g/ml}$ in Zweifach-Schritten verdünnt. Als Leerprobe wurden 10 μl dest. H_2O verwendet.

2.2.6.5. SDS-Page und Western Blot

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht eine Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens und wird verwendet, um die Proteine zu denaturieren und deren Ladungen zu überdecken. Der durch SDS negativ geladene Protein-Komplex wandert durch Gelporen zum Pluspol. Hierdurch werden die Proteine allein nach Größe und unabhängig von ihrer Ladung aufgetrennt. Zur Visualisierung und semiquantitativen Beurteilung erfolgen Transfer auf eine Membran und Antikörperfärbungen des gesuchten Proteins.

Zur Vorbereitung wurden Polyacrylamidgele hergestellt, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehen. Die Pipettierschema der Gele ist in Tabelle 14 dargestellt, wobei die Konzentration des Trenngels sich nach der Größe des gesuchten Proteins richtete. Außerdem wurden SDS-Laufpuffer (Bio-Rad) und Western Blotting Puffer (Bio-Rad) vorbereitet und bei 4°C gekühlt. Die Gele wurden mit gleichen Volumen der Protein- bzw. Histonproben beladen. Hierfür wurden Proteinproben mit RIPA-Puffer (Cell Signaling) bzw. Histonproben mit H_2O verdünnt und mit 4x konzentrierten Gelladepuffer (Roti®-Load 1) gemischt um auf eine Beladungsmenge von 20 μg /Geltasche für Proteine bzw. 1 μg /Geltasche für Histone einzustellen. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Denaturierung erfolgte die Beladung der Gele.

Material und Methoden

Zusätzlich wurden 7 µl Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder bzw. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) in eine leere Geltasche gegeben. Die SDS-PAGE wurde mit einer Spannung von 100 V für 15 Minuten und anschließend mit einer Spannung von 180 V für 60-90 Minuten auf Eis durchgeführt.

Die getrennten Proteine wurden mittels *semi-dry* Transfer in einem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuvor wurde die PVDF-Membran aktiviert, indem sie in 100% Methanol für eine Minute, in dest. H₂O für 2 Minuten und anschließend in Blotting-Puffer für 5 Minuten getränkt wurde. Das Gel mit getrennten Proteinen und die aktivierte PVDF-Membran wurden zwischen vier Whatmanpapieren gestapelt. Das Blotten erfolgte bei 2,5 A und 25 V für 20 bis 30 Minuten.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und in 5% (w/v) Milchlösung bzw. BSA in TBS-T (je nach Protokoll des Antikörperherstellers) auf dem Schüttler bei RT für eine Stunde inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Der primäre Antikörper wurde in die Blockierlösung (5 % (w/v) Milchlösung bzw. BSA in TBS-T) zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Primäre und sekundäre Antikörper und Verdünnungen für das Western-Blotting sind in Tabelle 5 aufgeführt. Zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern folgte ein viermaliges Waschen in 0,1% (v/v) TBS-T für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem viermaligen Waschen mit TBS-T für 10 Minuten, wurde die Membran mit HRP-Substrat (Clarity™ Western ECL Substrat für Histone bzw. Super Signal West Femto Pierce für Proteine) für 2 bis 5 Minuten bei RT bedeckt, gefolgt von Chemilumineszenz-Bildgebung unter Verwendung von Bio-Rad ChemiDoc™ Imaging System. Die Intensität der Bänder wurde mit der Software Image Lab™ (Bio-Rad) quantitativ berechnet. Als Ladekontrolle zur Quantifizierung der Proteinmenge wird Vinculin eingesetzt. Es ist ein Zytoskelettprotein, ein wesentlicher Bestandteil von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen. Die Expression von Vinculin in Zellen bleibt in etwa konstant. Aufgrund seiner großen Molekülgröße wird Vinculin oft verwendet, um die Menge an Proteinen mit hohem Molekulargewicht zu kontrollieren und zu vergleichen (Delpont und Hewer 2022).

2.2.6.6. Stripping und Reprobing von Western-Blot-Membrane

Um andere Proteine mit ähnlicher Größe auf derselben Membran darstellen zu können, wurde die Membran von den zuvor gebundenen Antikörpern gereinigt. Hierfür wurde die Membran in 15 mL Stripping Puffer (Thermo Scientific) auf dem Rollschüttler bei RT für 20 Minuten inkubiert,

wobei der Stripping Puffer vorher bei 37°C aufgewärmt wurde. Anschließend wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen und erneut mit 5 % (w/v) Milchlösung für eine Stunde blockiert. Ein neuer Primärantikörper konnte nun zugegeben werden.

2.2.7. Genexpressionsanalyse

2.2.7.1. RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen wie unter 2.2.4. beschrieben behandelt und kultiviert. Die Behandlung mit HDACi und DMSO als Kontrolle wurde für 72 Stunden durchgeführt. Nach 72-stündiger Behandlung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit und QIAshredder gemäß den Anweisungen des Herstellers (Protokoll: RNeasy Mini Handbook (QIAGEN 2023)). Das RNeasy® Mini Kit basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften der RNA an einer Silica-basierten Membran und der *Microspin*-Technologie. Die Probe wird auf eine RNeasy Mini-Zentrifugationssäule aufgetragen, wo die gesamte RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen weggespült werden.

2.2.7.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) bestimmt. Auf den Messsockel wurde 1,5 µl RNA-Probe pipettiert. Basierend auf der Extinktion bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration berechnet. Eine Absorption bei 280 nm, wo das Absorption-Maximum der Proteine liegt, wurde zusätzlich gemessen, um die Reinheit der Probe zu bestimmen. Ein Verhältnis der Extinktion (260/280) von ~2,0 ist als rein akzeptiert. Die RNA-Probe wurde bei -80°C gelagert.

2.2.7.3. cDNA-Synthese

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurden Einzelkomponenten für die Reverse Transkription der Firma Thermo Scientific verwendet. 1 µg RNA-Probe wurde in 12,5 µl RNase-freien Wasser verdünnt und dann 2 µl Primer-Master-Mix (siehe Tabelle 11) dazugegeben. Die Mischung wurde zur Primer-Anlagerung bei 65°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit RT-Master-Mix gemischt. Um die reverse Transkriptionsreaktion zu starten, wurden 2 µl RT-Master-Mix (siehe Tabelle 12) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation für 10 Minuten bei 25°C, 30 Minuten

bei 50°C und 5 Minuten bei 85°C. Die cDNA wurden mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.7.4. Genexpressionsbestimmung mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Für den Nachweis von potenziell HDACi-beeinflussten Genen (*BCCIP*, *MCM2*, *MCM3*, *PLK4*, *ESPL1*, *NCAPG*) wurden neuen Primerpaare designt und bestellt. Als Referenz dienten das *TBP*-Gen (TATA-Box-bindende Protein) und *SDHA* (Succinat-Dehydrogenase-Komplex Flavoprotein Subunit A). Referenzgene sind Gene, die in nahezu allen Zellen eines Organismus relativ konstant exprimiert werden. Als *Housekeeping*-Gene spielen sie eine entscheidende Rolle bei grundlegenden zellulären Prozessen. Zwei solcher Gene sind *TBP* und *SDHA* (Sharan et al. 2015). *TBP* ist ein essenzielles Protein in der Regulation der Genexpression. Es gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren und bindet spezifisch an die DNA-Sequenz TATA-Box, die sich in den Promotoren vieler Gene befindet. *SDHA* ist ein Bestandteil des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes. Der Komplex spielt eine Schlüsselrolle in der Zellatmung in Mitochondrien, indem er die Oxidation von Succinat zu Fumarat im Citratzyklus katalysiert. In dieser Arbeit dienen *TBP* und *SDHA* als Kontrollgene, um sicherzustellen, dass unterschiedliche Transkriptmengen tatsächlich auf die spezifische Wirkung der HDACi zurückzuführen sind und nicht auf Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA oder cDNA in den Proben durch Variationen während Herstellung und Verdünnung. Die Genexpression wurde als relative Genexpression quantifiziert, wobei die Messwerte anhand des geometrischen Mittel der Referenzgene *TBP* und *SDHA* normalisiert wurde.

Die Primersequenzen sind in Tabelle 10 dargestellt. Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit einem kommerziellen Enzym/ Farbstoff-Mastermix (LUNA® Universal qPCR Master Mix) durchgeführt. Dieser Mastermix enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der proportional in neu gebildete PCR-Produkte interkaliert und somit nach jedem Zyklus per Fluoreszenzmessung durch die Plattforminterne Optik (LightCycler 96, Roche) eine Quantifizierung des neu gebildeten Produktes ermöglicht. Der LUNA® Reaktionsmix ist für eine Zweitschritt PCR optimiert, hierfür können die Hybridisierung und Elongation zusammen bei 60°C eingestellt werden. Jede Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Verwendung von 96-Well-Platten durchgeführt, wobei jede Vertiefung 10 µl Luna Master Mix, 8 µl Primermix (Tabelle 13) und 2 µl cDNA enthielt.

Die Bestimmung der relativen cDNA-Konzentration erfolgte über eine Regressionsgerade. Dafür wurde die cDNA von der KYSE270-Zelllinie verwendet, welche mit H₂O im Verhältnis 1:10, 1:100

bzw. 1:1000 verdünnt wurde. Die Proben wurden in einem wie folgt programmierten LightCycler® 96 (Roche) amplifiziert: 60 Sekunden bei 95°C → 15 Sekunden bei 95°C → 30 Sekunden bei 60°C; die letzten beiden Schritte wurden 40-mal wiederholt. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve zur Spezifitätsprüfung der Ausbeute programmiert: in Schritten von einem Grad von 55°C auf 95°C. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung der LightCycler® 96 Plattform verarbeitet. Anhand der gemessenen Ct-Werte (*Cycle Threshold*) und des Vergleichs zum Standard konnte so eine relative Konzentration berechnet werden.

Die Auswertung erfolgte mit der Software Microsoft Excel, es wurde *fold change* wie folgt berechnet:

$$\text{relative Genexpression} = \log_2 \left(\frac{\text{relative Konzentration des Gens X}}{\text{Geomittel (TBP, SDHA)}} \right)$$

Die Berechnung wurden jeweils mit Dreifachwerten durchgeführt. Die relative Genexpression der mit HDACi behandelten Proben wurden auf DMSO-Kontrolle bezogen.

2.2.8. Statistische Datenanalyse

Alle ermittelten Daten wurden als Mittelwert ± der Standardabweichung (SD) der dreifachen Wiederholung jeder Probe angegeben. Die Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichung erfolgte mit der Software Microsoft Excel. Die statistische Signifikanz (p) wurde durch einen einseitigen ANOVA (*Analyse of variance*)-Test mittels GraphPad Prism bestimmt. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Hierbei gilt * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001 und n.s.: nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1. Zytotoxische Wirkung der neuen HDACi auf Urothelkarzinom-Zelllinien

Dieser Arbeit war eine Screening Analyse einer Substanz-Bibliothek mit neu entwickelten HDACi vorangegangen. Die daraus ausgewählten Top 10 Kandidaten sollten zunächst mittels MTT-Tests validiert werden. Es wurde also zunächst die zytotoxische Wirkung von Romidepsin sowie 10 neuer HDACi auf Urothelkarzinom-Zelllinien mittels MTT-Tests untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien UM-UC-3, J82, SW-1710 und HBLAK über einen Zeitraum von 72h mit unterschiedlicher Konzentration der HDACi oder DMSO behandelt. Die Ziele des ersten Tests waren 1) die Zellviabilität nach Behandlung mit neuen HDACi zu bestimmen, 2) den IC_{50} -Wert jedes HDACi zu berechnen und 3) darauf basierend die besten drei Substanzen für weiterführende Analysen zu definieren. Als beste drei Substanzen wurden die ausgewählt, die im niedrigen mikromolaren Bereich bei Urothelkarzinom-Zelllinien wirksam und nur begrenzt toxisch auf normale Uroepithelzellen der Zelllinie HBLAK waren. Basierend auf den Ergebnissen wurden DDK122, KSK43 und YAK40 als Top3 ausgewählt, um ihre (epigenetische) Wirkung auf die Zellen genauer zu untersuchen. In Anhang B sind die Konzentrations-Inhibitionskurven für die verbleibenden sieben Substanzen verfügbar gemacht.

In Abbildung 2 sind die Konzentrations-Inhibitionskurven für Romidepsin und die Top3-Substanzen dargestellt. Die Zellviabilität nach der Kontrollbehandlung mit DMSO wurde hierbei als 100% festgelegt. Die Zellviabilität der mit den neuen HDACi behandelten Proben wurde im Verhältnis zur Kontrolle angegeben. Zu beobachten war, dass bei niedrigen Konzentrationen von HDACi (bis zu 0,1 μ M) die Zellviabilität anstieg. Dies war besonders deutlich bei den mit DDK122 behandelten SW-1710 bzw. mit LAK126 behandelten HBLAK zu sehen, bei denen eine Zellviabilität bis zu 120% bzw. 213% festgestellt wurde. Diese Beobachtung belegt, dass das DMSO in Verdünnung von 1:400, was der DMSO-Konzentration in 50 μ M HDACi entspricht, toxischer für die Zellen ist als die DMSO-Menge der 0,01 μ M und 0,1 μ M HDACi-Dosierungen. Im Vergleich war Romidepsin deutlich potenter mit IC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich im Vergleich zu den neuen HDACi im micromolaren Bereich.

Insgesamt konnte ein regredierter Verlauf der Zellviabilität mit zunehmender HDACi-Konzentration beobachtet werden. Eine Ausnahme stellte LAK126 dar, bei dem dieser Effekt nicht nachgewiesen werden konnte. In dieser Studie diente LAK126, ein HDAC3-Inhibitor, als Vergleichssubstanz zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der einzelnen HDAC-Isoenzyme. Da Vorarbeiten der AG mit einem käuflichen HDAC3-Inhibitor andeuteten, dass dieser keine Wirkung auf die Viabilität von UC-Zelllinien hatte, wurde der neue HDAC3-Inhibitor

Ergebnisse

LAK126 erneut auf diese Wirkung hin zusätzlich zu den Top 3 untersucht. Nach der Behandlung mit LAK126 zeigte sich eine minimale Veränderung der Zellviabilität der UCCs bis zu einer Konzentration von 50 μM . Es war bemerkenswert, dass die HBLAK-Zellen empfindlicher auf LAK126 reagierten als die Tumorzelllinien.

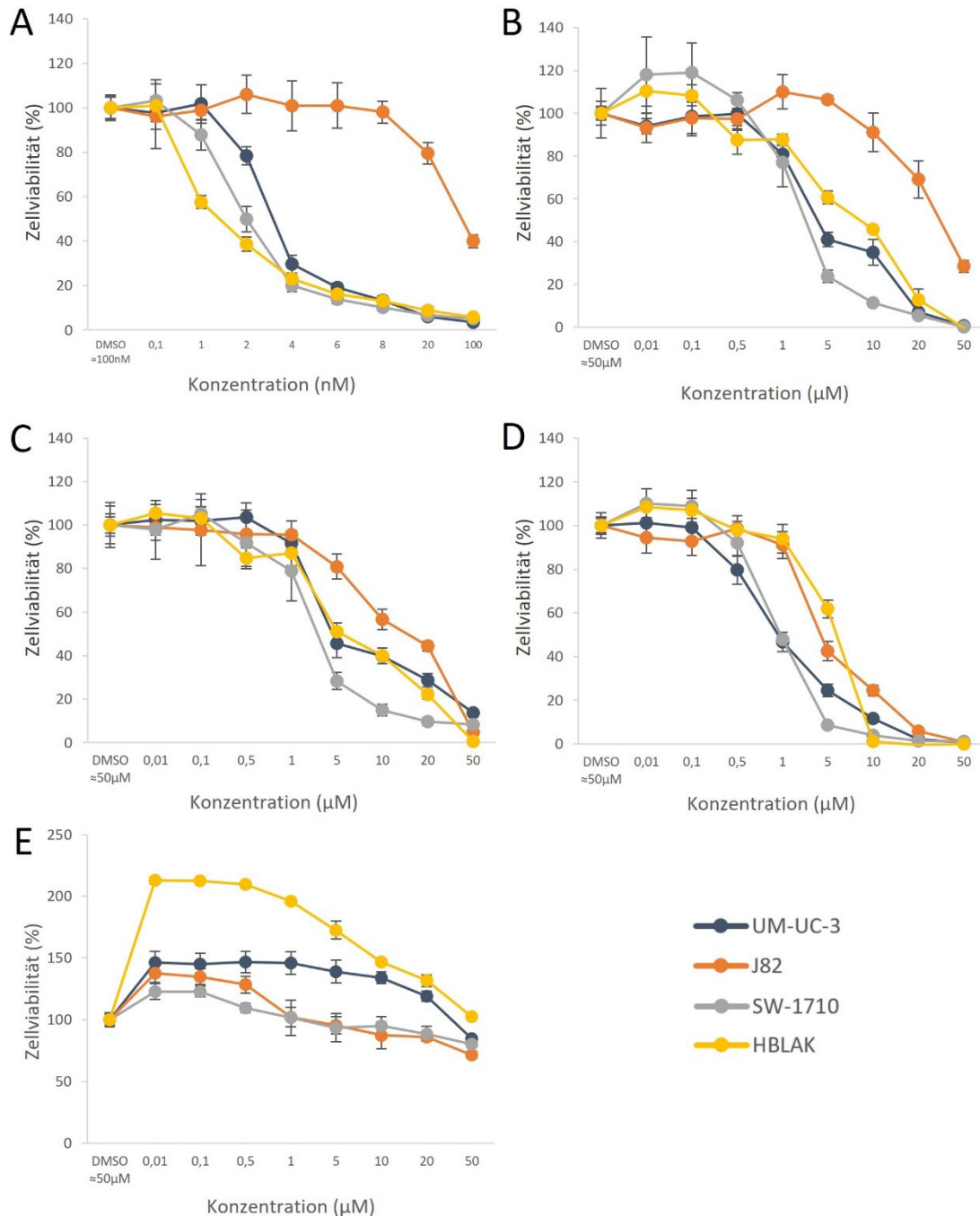


Abbildung 2: Zellviabilität der UCCs nach 72h Behandlung mit HDACi.

Dargestellt sind die Ergebnisse für Romidepsin (A), DDK122 (B), KSK43 (C), YAK40 (D) und LAK126 (E). Die Zellviabilität wurde in 4-facher Messung bestimmt und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Auf der Y-Achse ist die Zellviabilität dargestellt, die zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (100%, als negative Kontrolle) normalisiert wurde. Die X-Achse zeigt die Konzentration der eingesetzten Substanzen. In (A) ist sie in [nM], in (B)–(E) in [μM] angegeben.

Ergebnisse

Die Zelllinie J82 zeigte eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Romidepsin und anderen HDACi. Die Zellviabilität blieb nahezu unverändert bei Behandlung mit Romidepsin bis zur Konzentration von 8 nM. Erst bei einer Konzentration von 20 nM zeigte die Zelllinie eine reduzierte Zellviabilität von 79,5%. In Vergleich dazu lagen die Vitalitätswerte der Zelllinien UM-UC-3, SW-1710 und HBLAK bei 5,9%, 6,7% und 8,9%. Bei Verwendung der maximalen Konzentration von 100 nM sank die Zellviabilität auf 40%. Diese Resistenzeigenschaft von J82 zeigte sich auch gegenüber DDK122.

Tabelle 17 fasst die IC_{50} -Werte jeder Substanz in Bezug auf die UCCs zusammen. Der Wert spiegelt die zytotoxische Potenz einer Substanz wider. YAK40 offenbarte eine vielversprechende Eigenschaft, da es niedrige IC_{50} -Werte für die drei UCCs im Vergleich zu den anderen Substanzen aufwies. Beim Vergleich zwischen den Zelllinien zeigte YAK40 eine geringere Toxizität gegenüber benignen HBLAK Uroepithelzellen. In Gegensatz dazu bewirkte Romidepsin als Referenzsubstanz erwartungsgemäß die stärkste zytotoxische Wirkung auf HBLAK als auf andere UCCs. Die zelllinienabhängigen IC_{50} -Werte von Romidepsin waren mit 1,2 nM bis 23,3 nM deutlich geringer als die IC_{50} -Werte von neuen HDACi (1,2 μ M bis 18,3 μ M). Wie zuvor erwähnt, zeigt die Zelllinie J82 eine Resistenz gegenüber Romidepsin und DDK122, was sich in vergleichsweise hohen IC_{50} widerspiegelt. Im Vergleich der Zelllinien reagierte die Zelllinie SW-1710 empfindlicher gegenüber den neuen HDACi als die übrigen Zelllinien.

Generell lässt sich sagen, dass auch nach der Validierung die IC_{50} -Werte der neu entwickelten HDACi in UCCs niedriger lagen als in HBLAK. Dies war Auswahlkriterium gewesen und konnte mittels MTT bestätigt werden. Romidepsin wies hingegen den niedrigsten IC_{50} -Wert in HBLAK-Zellen auf. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie J82, die auch in anderen Projekten höhere Dosen an HDACi tolerierte.

Tabelle 17: IC_{50} der HDACi auf UCCs nach 72h Behandlung.

	UM-UC-3	J82	SW-1710	HBLAK
KSK43 [μ M]	4,0	12,4	1,9	4,5
YAK40 [μ M]	1,2	4,2	0,9	5,2
DDK122 [μ M]	4,1	18,3	1,7	4,7
Romidepsin [nM]	3,0	23,3	1,9	1,2

3.2. Morphologische Veränderung der Urothelkarzinom-Zelllinien nach 72h Behandlung mit HDACi

Parallel zur Untersuchung der Zellviabilität wurden die morphologischen Veränderungen der betrachteten Zelllinien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die vier Zelllinien mit jeweiligen Romidepsin, DDK122, KSK43 bzw. YAK40 für 72h behandelt, wobei die Konzentrationen den individuellen IC_{50} -Werten entsprachen. Die Bildaufnahme erfolgte mittels Nikon Mikroskop und Nikon Digital Sight DS-Fi1c. Unter Behandlung mit HDACi änderte sich die Morphologie von allen Zelllinien.

Bei den Kontrollen war ein normales epitheloides Wachstumsmuster zu erkennen. Infolge der Behandlung wurden die UM-UC-3 Zellen größer, flacher und stäbchenförmig mit deutlich erkennbaren Nukleoli. Besonders deutlich waren diese Veränderungen bei den mit Romidepsin behandelten Zellen zu beobachten, die dünne, irreguläre zytoplasmatische Fortsätze entwickelten, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die vergleichbare fibroblastenartige Morphologie behandelter Zellen zeigte sich ebenfalls in der Zelllinie J82 (siehe Abbildung 4). Bei der Zelllinie SW-1710 wurde eine große, flache, spiegeleiähnliche Morphologie festgestellt, wie in Abbildung 5 gezeigt. Solche beobachteten Veränderungen könnten auf die Induktion eines Seneszenz-assoziierten Phänotyps hinweisen. In Abbildung 6 konnten bei der Zelllinie HBLAK einzelne Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie beobachtet werden, die Mehrheit der Zellen ähnelte noch deutlicher einem Seneszenz-Phänotyp. Eine optische Unterscheidung der morphologischen Veränderungen zwischen den neuen HDACi erwies sich als schwierig.

Ergebnisse

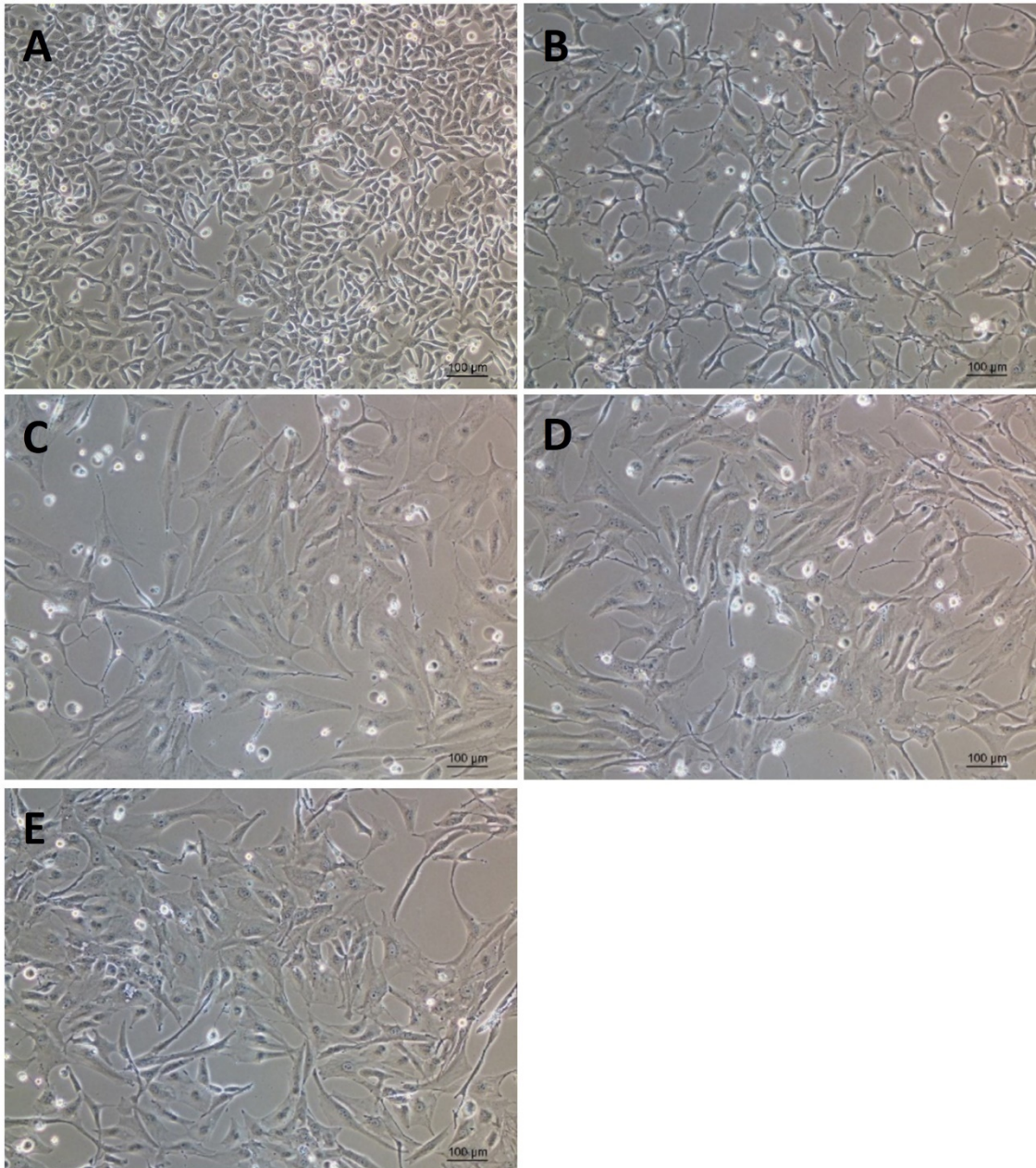


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h IC₅₀-Behandlung mit HDACi.

(A) DMSO als Lösungsmittelkontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40. Vergrößerung: 10x Objektiv. Der Größenbalken entspricht 100 µm.

Ergebnisse

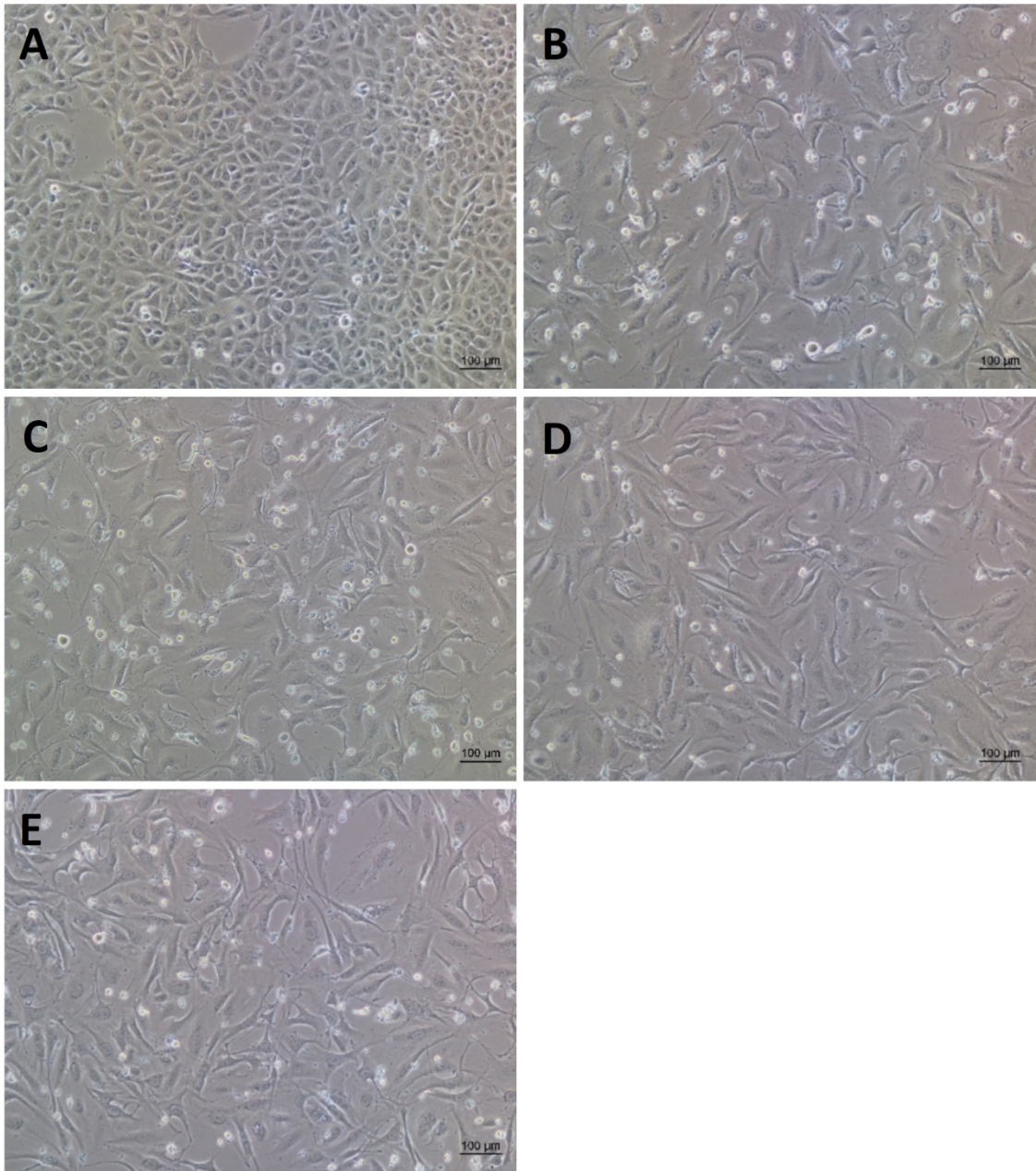


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie J82 nach 72h IC₅₀-Behandlung mit HDACi. (A) DMSO als Lösungsmittelkontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40. Vergrößerung: 10x Objektiv. Der Größenbalken entspricht 100 µm.

Ergebnisse

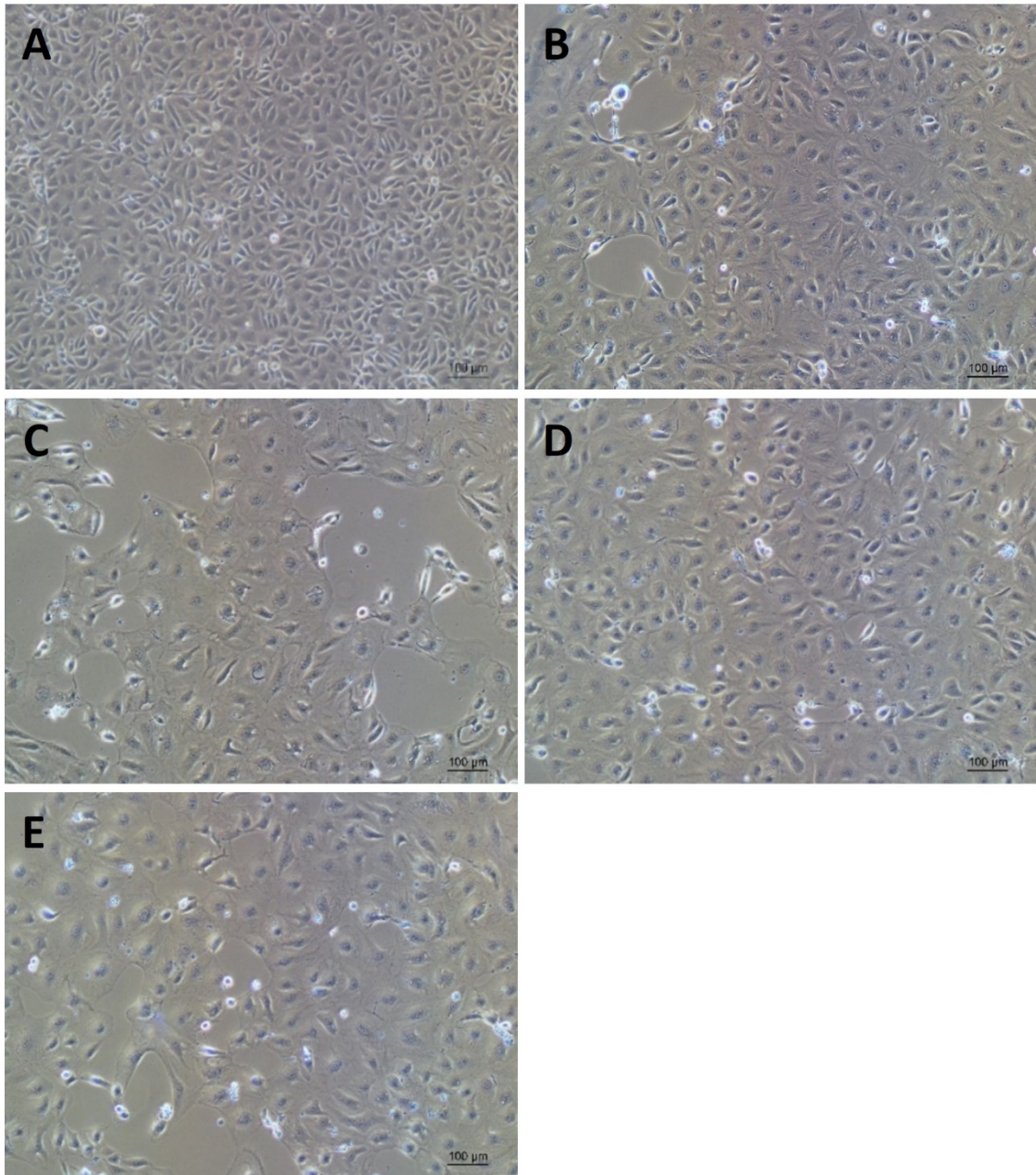


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie SW-1710 nach 72h IC₅₀-Behandlung mit HDACi.

(A) DMSO als Lösungsmittelkontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40. Vergrößerung: 10x Objektiv. Der Größenbalken entspricht 100 µm.

Ergebnisse

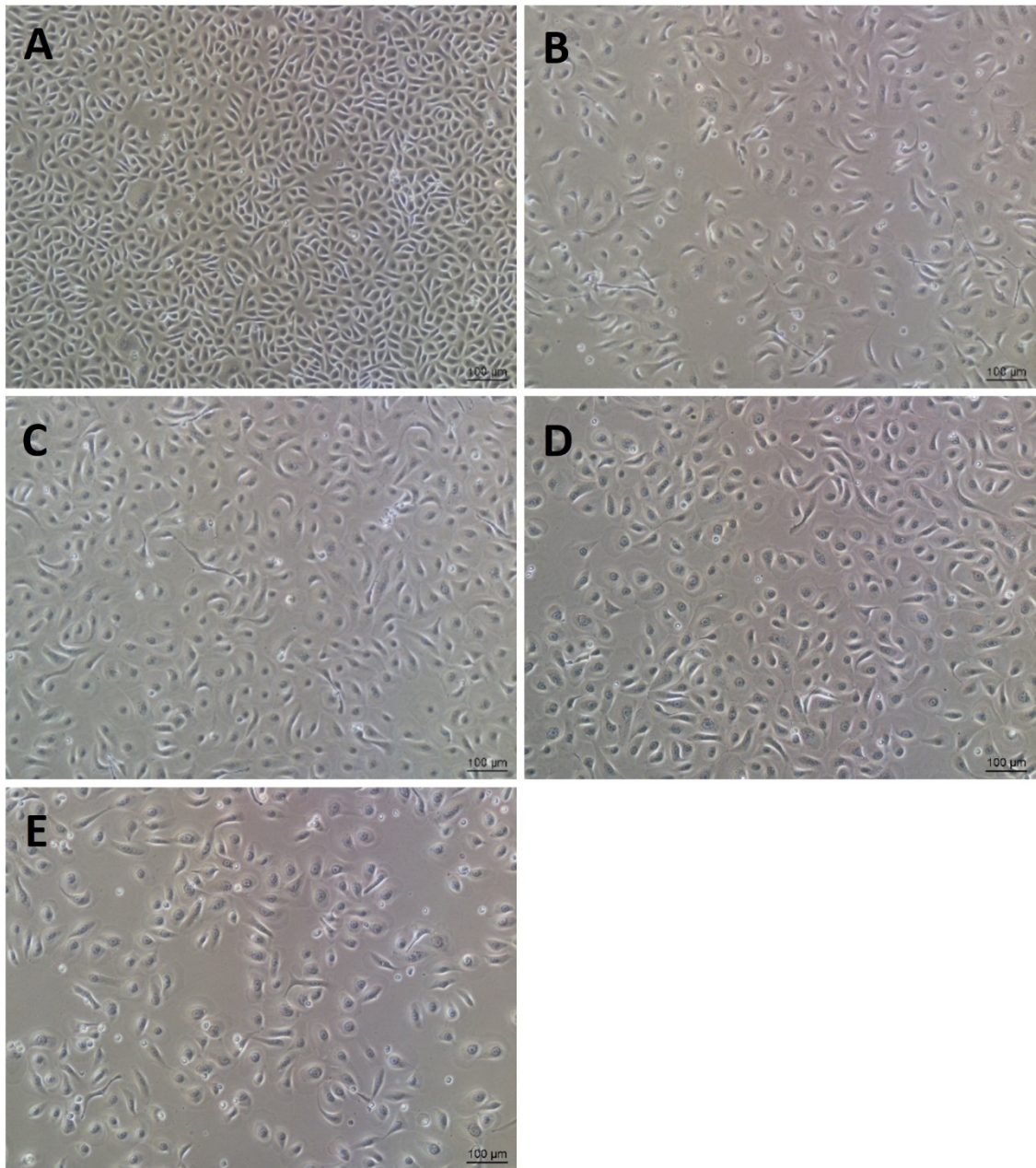


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie HBLAK nach 72h IC₅₀-Behandlung mit HDACi. (A) DMSO als Lösungsmittelkontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40. Vergrößerung: 10x Objektiv. Der Größenbalken entspricht 100 µm.

3.3. Enzym-Spezifität der neuen HDACi

Die Analyse der neuartigen HDACi umfasst die Untersuchung ihrer Wirkung gegenüber HDAC-Isoenzymen. Da die Klasse I HDACs (HDAC1, 2, 3, 8) vorwiegend die Deacetylierung von Histonschwänzen bewirken, erlaubt deren Untersuchung Schlussfolgerungen zur Isoenzym-spezifität der neuen HDACi. Dies kann durch die Bestimmung des acetylierten Histon H3-Gehalts in UCCs nach der Behandlung mit neuen HDACi erfolgen. Das Ziel des Versuches war festzustellen, ob die Anwendung der neuen HDACi auf UCCs zu einer Erhöhung des acetylierten Histon H3-Gehalts führt. Hierfür wurden die Zellen für einen Zeitraum von 72h mit der entsprechenden IC_{50} -Konzentration der jeweiligen Substanzen bzw. DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Nach der Behandlung wurden die Histone aus den Zellen extrahiert. Mittels Western Blot wurde die Menge des acetylierten Histon H3 (acH3) semi-quantitativ gemessen. Die Bandenintensität der acH3 wurde im Verhältnis zum Gesamthiston H3 berechnet. Daraus wurde eine relative Intensität abgeleitet, die als quantitatives Maß für die Bandenintensität nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle diente. Nach Behandlung von UM-UC-3 und J82 mit allen HDACi wurde eine Zunahme der Menge an acetyliertem Histon H3 beobachtet (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Gleichzeitig wurde eine geringere Intensität von Gesamthiston H3 festgestellt. Die neuen HDACi übten unterschiedliche Effekte auf die Histonacetylierung in den ausgewählten Zelllinien aus. Nach 72-stündigen Behandlung mit KSK43 bzw. YAK40 war nur eine geringe Wirkung auf die Histonacetylierung zu erkennen. Bei der Behandlung mit Romidepsin hingegen stieg die Histonacetylierung deutlich an. DKK122 hatte offenbar eine ähnliche Isoenzym-Spezifität wie Romidepsin und zeigte die höchste Steigerung der Histonacetylierung im Vergleich zu anderen neuartigen HDACi. Die Ergebnisse belegen, dass die drei neuen HDACi auf Klasse I HDACs wirken, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung was auf Unterschiede in der Enzymspezifität zwischen den neuen HDACi hindeuten könnte.

Ergebnisse

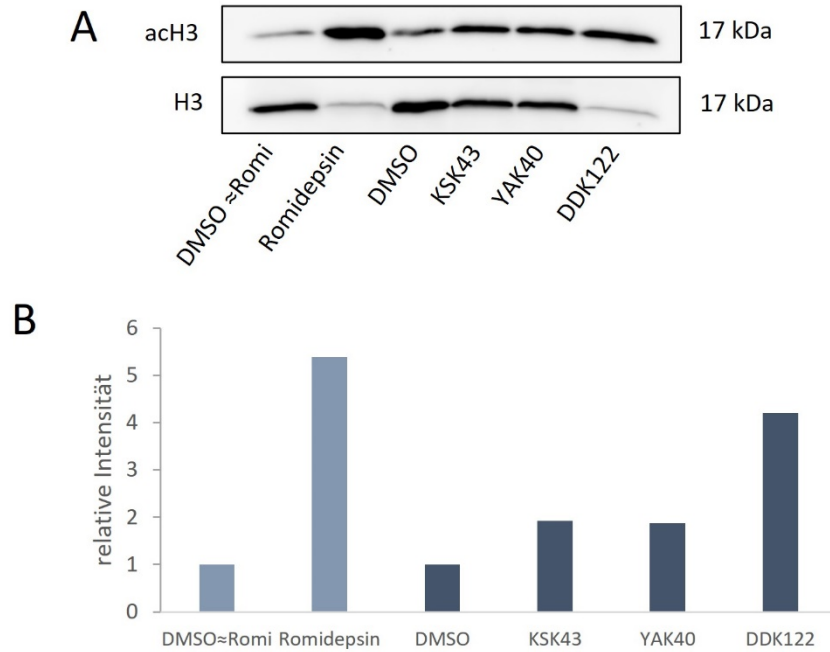


Abbildung 7: Western Blot Analyse der Acetylierung von Histon H3 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 und Gesamthiston H3. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der acH3 zum Gesamthiston H3 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

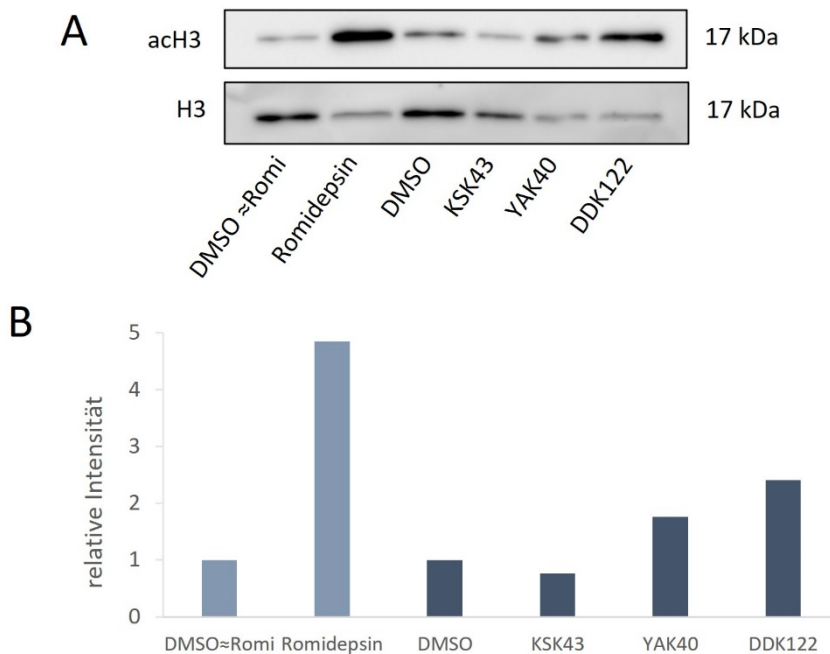


Abbildung 8: Western Blot Analyse der Acetylierung von Histon H3 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 und Gesamthiston H3. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der acH3 zum Gesamthiston H3 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

3.4. Wirkung von HDCAi auf den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose

Die vorherigen Ergebnisse offenbarten, dass die Auswirkung der neuen HDACi auf die Zellviabilität von den verwendeten Zelllinien und der verabreichten Konzentration abhängen. Ferner wurde beobachtet, dass sie den Deacetylierungsprozess des Histon H3 in den Zellen beeinflussten. Daraus ergab sich die anschließende Frage, ob die Verminderung der Zellviabilität auf die Induktion des Zelltods oder eines Zellzyklusarrests zurückzuführen ist und welche zellulären Mechanismen diesen Effekten zugrunde liegen. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde untersucht, inwiefern die Behandlung mit den neuen HDACi den Zellzyklusarrest und die Apoptoseinduktion beeinflusst. Parallel zur durchflusszytometrischen Analyse wurde die Aktivität von Caspase 3/7 als Effektormoleküle der Apoptose-Signaltransduktion gemessen.

3.4.1. Zellzyklus-Analyse mittels PI-Färbung

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse für die Zelllinie UM-UC-3. In Relation zur Kontrollgruppe verlagerten sich die Zellenanteile nach der Behandlung der Zellen mit HDACi von der G1-Phase in die G2/M- und S-Phase. Die Behandlung von UM-UC-3 Zellen mit Romidepsin und DDK122 führte zu einer deutlichen Anreicherung von Zellen in der G2/M-Phase, mit einer nachgewiesenen Zunahme von etwa 39% bis 42% im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase von 1% auf 7%. In dieser Phase sind sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen anzutreffen, zusammen mit nuklearen Fragmenten, Ansammlungen von Chromosomen und Mikronuklei. Des Weiteren wurde nach der Behandlung von UM-UC-3 mit allen HDACi eine Zunahme des Anteils von Aneuploidie beobachtet. Diese Anomalität geht mit Störungen während der Mitose einher. Die stärkste Wirkung auf die Aneuploidie zeigte YAK40 mit einem Anteil von 7,17%, gefolgt von DDK122 mit 6,3%. Romidepsin und KSK43 wiesen ungefähr vergleichbare Effekte auf, mit Anteilen von 4,45% bzw. 4,85%. In der DMSO-Kontrollgruppe wurden Aneuploidie-Anteile von 0,43% bis 0,73% festgestellt.

Nach der Behandlung von UM-UC-3 mit KSK43 und YAK40 beobachtet man eine schwächer ausgeprägte Verschiebung der Zellpopulationen von der G1-Phase zu den anderen Zellzyklus-Phasen. Dies führte zu einem Anstieg der Zellpopulation in der G2/M-Phase (von 11% auf 19% bzw. 15%) und S-Phase (von 9% auf 17% bzw. 20%). Hierbei wurde auch eine Zunahme der Zellen in der sub-G1-Phase (auf 3% bis 7%) und der Aneuploidie beobachtet.

Insgesamt wurde nachgewiesen, dass die Behandlung von UM-UC-3 mit Romidepsin und DDK122 zu einem starken Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase führt. Die Behandlung mit KSK43

Ergebnisse

und YAK40 resultierte in einer Zunahme sowohl in der G2/M- als auch in der S-Phase. Die Anwendung aller HDACi führte zu einem Anstieg in der sub-G1-Phase und Aneuploidie.

In Abbildung 10 wurden die Ergebnisse der Analyse mittels Durchflusszytometrie für die Zelllinie J82 zusammengefasst. Ähnlich wie bei der Zelllinie UM-UC-3 wurde auch bei der J82 eine Zunahme der Zellanteile in der G2/M-Phase beobachtet. Allerdings war die Wirkung von Romidepsin und DDK122 hier geringer im Vergleich zu KSK43 und YAK40. Während die Zunahme in der G2/M-Phase durch Romidepsin und DDK122 im Bereich von 5% bis 8% lag, stieg dieser Anteil durch KSK43 und YAK40 um 22% bis 26%. Beobachtet wurde, dass nach der Behandlung mit Romidepsin der Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase um etwa 10% anstieg. Die Behandlung mit DDK122 führt zur Zunahme von ungefähr 3% in diesem Bereich. KSK43 und YAK40 bewirkten nur eine geringfügige Erhöhung in der sub-G1-Phase.

Im Gegensatz zur Zelllinie UM-UC-3 führte die Behandlung mit HDACi in der J82-Zelllinie kaum zu Veränderungen in den Aneuploidie-Anteilen. Dies deutet darauf hin, dass die HDACi keinen Einfluss auf den Mitoseprozess der J82-Zellen hatten. Darüber hinaus bewirkt die Behandlung mit allen HDACi in der J82-Zelllinie eine Abnahme des Zellenanteils in der S-Phase.

Bei den HBLAK-Zellen zeigte sich weder nach der Behandlung mit Romidepsin noch nach der Behandlung mit neuen HDACi eine signifikante Wirkung auf den Zellzyklus (siehe Abbildung 11). Ebenso blieb der Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase und Aneuploidie weitgehend unverändert.

Insgesamt konnte zusammengefasst werden, dass die Behandlung von Tumorzelllinien mit Romidepsin oder den neuen HDACi zelllinienabhängig zu G2/M-Arrest führt. Dieser Effekt war jedoch bei den HBLAK-Zellen als benignen Epithelzellen nicht beobachtbar.

Ergebnisse

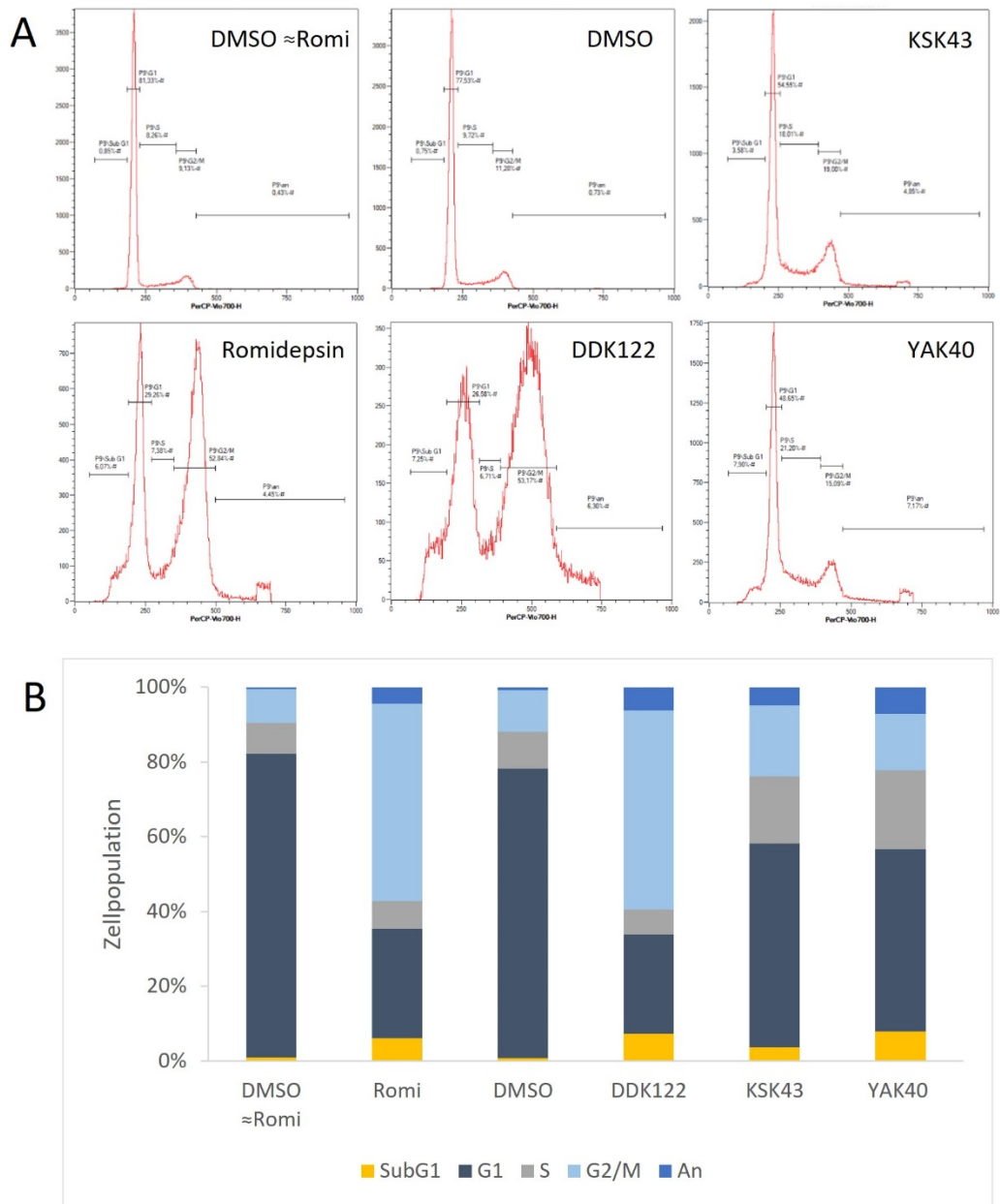


Abbildung 9: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zellzyklusverteilung wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. (A) Eine repräsentative Messung der Zellzyklusverteilung und (B) der prozentuale Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen in einem geschichteten Säulendiagramm sind dargestellt.

Ergebnisse

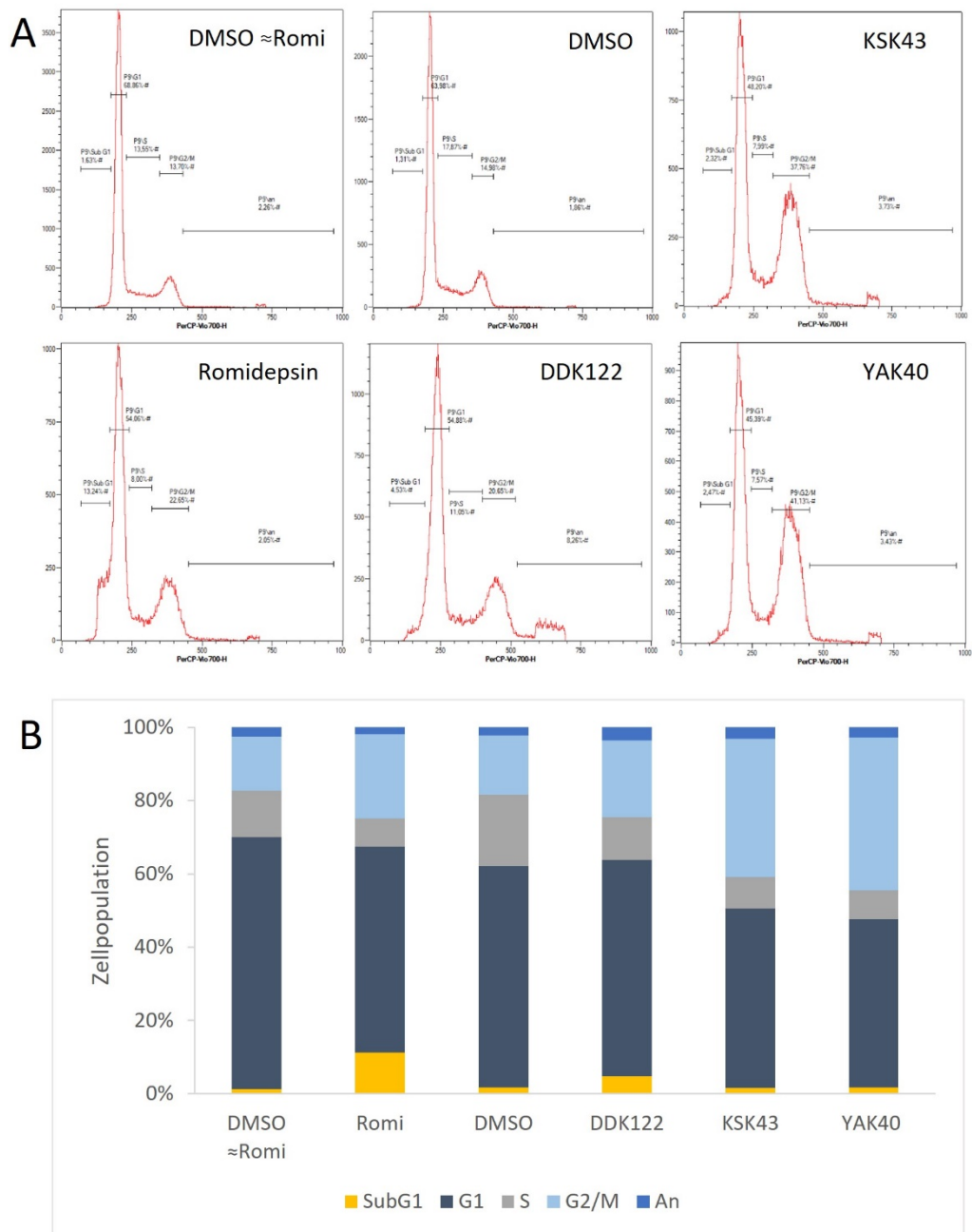


Abbildung 10: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie J82 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zellzyklusverteilung wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. (A) Eine repräsentative Messung der Zellzyklusverteilung und (B) der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in einem geschichteten Säulendiagramm sind dargestellt.

Ergebnisse

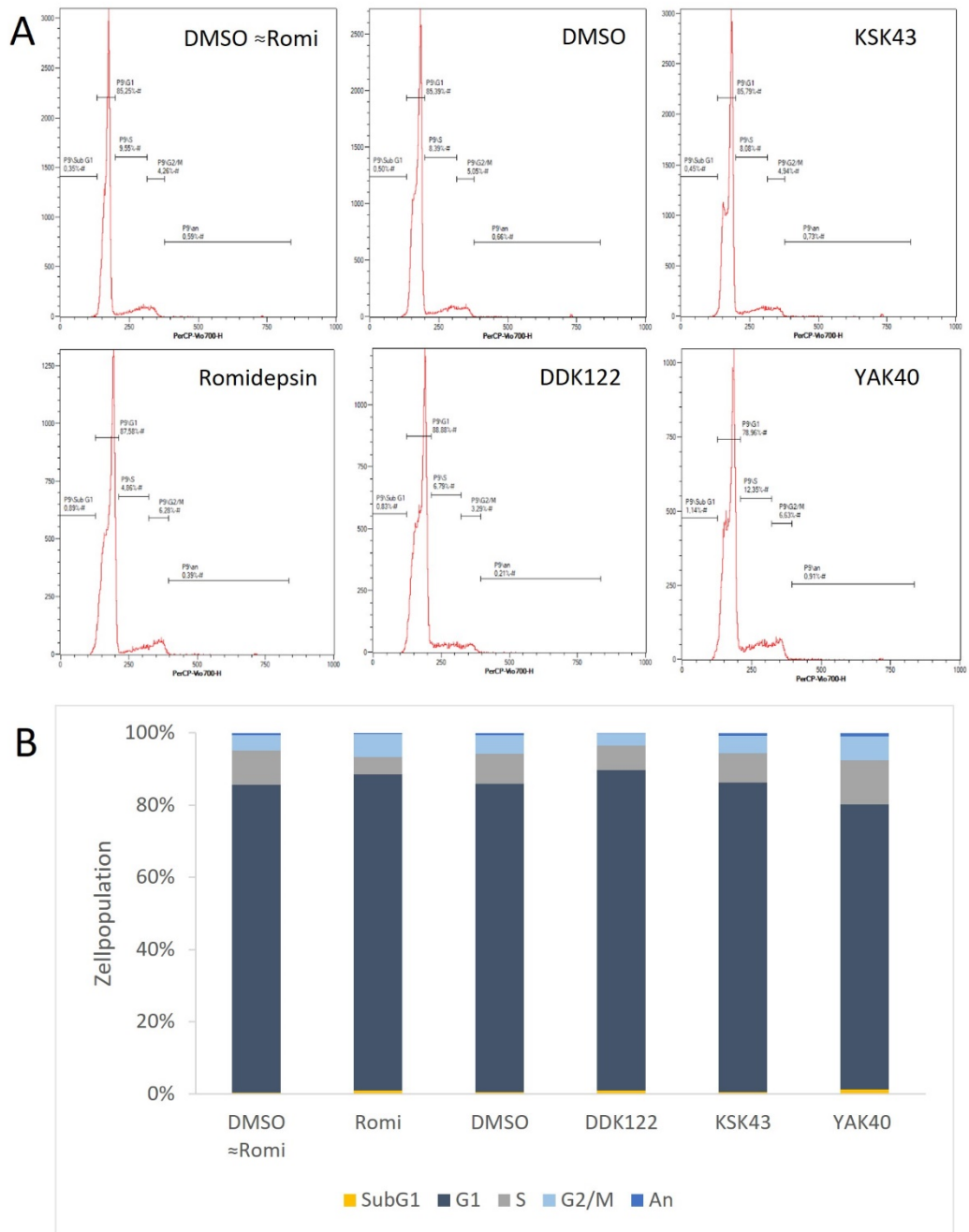


Abbildung 11: Zellzyklus-Analyse der Zelllinie HBLAK nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zellzyklusverteilung wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. (A) Eine repräsentative Messung der Zellzyklusverteilung und (B) der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in einem geschichteten Säulendiagramm sind dargestellt.

3.4.2. Nachweis von pH3 als Mitose-Marker

Durch den Einsatz der Durchflusszytometrie kann der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen anhand ihres DNA-Gehalt ermittelt werden. Der Verfahren ermöglicht die Unterscheidung der Zellen in die G1-Phase, S-Phase, sowie G2/M-Phase. Es ist jedoch anzumerken, dass die Messung des DNA-Gehalts keine Unterscheidung zwischen der G2-Phase und der Mitose erlaubt. Daher wurde eine zusätzliche Bestimmung des phosphorylierten Histon H3 als Marker für die Mitosephase durchgeführt. Für diese Zwecke wurde die Zelllinie UM-UC-3 ausgewählt, bei der eine bemerkenswerte Zunahme der Zellanteile in der G2/M-Phase festgestellt wurde. Der Anteil an pH3-positiven und pH3-negativen Zellen wurde mithilfe einer pH3/PI-Doppelfärbung in der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden alle Zellen mit PI rot und die in der Mitose befindlichen Zellen zusätzlich grün markiert.

Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 12 präsentiert. Die Behandlung von UM-UC-3 mit Romidepsin führte zu einer Abnahme des Anteils an mitotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (von 1,74% auf 0,05%). Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Behandlung mit DDK122 (von 0,70% auf 0,08%) beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mit Romidepsin und DDK122 behandelten Zellen nicht in die M-Phase gelangt sind. Die zunehmende Zellanteile in der G2/M-Phase, wie in vorherigem Test beobachtet, befanden sich demnach vorwiegend in der G2-Phase. Nach Behandlung mit KSK43 und YAK40 konnte hingegen keine signifikante Änderung im Vergleich zu der Kontrolle nachgewiesen werden.

Ergebnisse

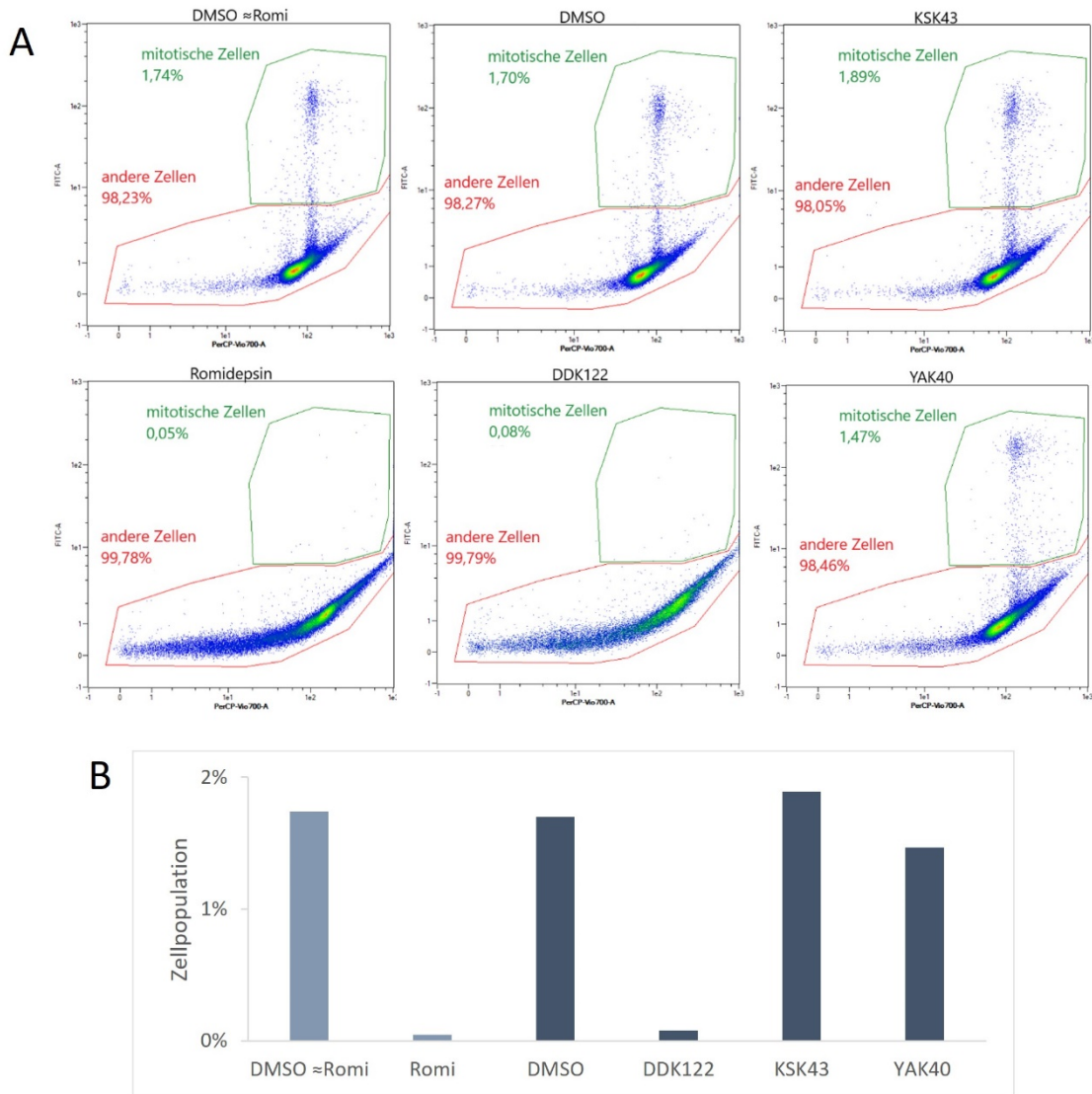


Abbildung 12: Mitose-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Punktdiagramme der durchflusszytometrischen Analyse (A), die mitotischen Zellen in grün repräsentieren den Anteil an pH3-positiven Zellen. Die anderen Zellen in rot repräsentieren den Anteil an pH3-negativen Zellen. Der prozentuale Anteil der Zellen in der Mitosephase ist in einem Säulendiagramm (B) veranschaulicht.

3.4.3. Apoptose-Nachweis mittels Annexin V-Färbung

Parallel zur durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analyse wurde eine Zelltod-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien UM-UC-3, J82 und HBLAK mit Romidepsin und den neuen HDACi über einen Zeitraum von 72h behandelt. Durch die Anwendung einer Doppelfärbung mit FITC-gekoppeltem Annexin V und PI konnten die Zellen in früh-apoptotische und spät-apoptotische/nekrotische Populationen unterteilt werden.

Die Ergebnisse von der Apoptose-Analyse für die Zelllinie UM-UC-3 sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Behandlung von UM-UC-3 mit Romidepsin führte zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils an früh-apoptotischen Zellen (von 0,20% auf 5,75%) sowie spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen (von 0,91% auf 24,79%). Dieser Effekt war bei Behandlung mit DDK122 noch ausgeprägter, insbesondere im Hinblick auf den Anteil früh-apoptotischer Zellen. Die Behandlung mit KSK43 und YAK40 zeigten hingegen nur wenig Veränderungen. Die Ergebnisse legen nahe, dass sowohl Romidepsin als auch DDK122 Apoptose in UM-UC-3-Zellen induzieren.

Apoptose-Induktion kann in der Zelllinie J82 am deutlichsten nach der Behandlung mit Romidepsin beobachtet werden, wie in Abbildung 14 dargestellt ist. YAK40 zeigte die stärkste apoptotische Wirkung unter den neuen HDACi. Im Gegensatz dazu induzierte KSK43 Apoptose in J82-Zellen in geringerem Maße, ähnlich wie bereits bei UM-UC-3 beobachtet. Die Behandlung von HBLAK-Zellen führte weniger stark zu einer Apoptose-Induktion (siehe Abbildung 15).

Zusammengefasst führte die Behandlung von UM-UC-3 und J82 mit Romidepsin und den neuen HDACi zu einer Induktion von Apoptose. Der Effekt nach Romidepsin-Behandlung war in beiden Zelllinien am stärksten ausgeprägt. Unter den neuen HDACi induzierte DDK122 die Apoptose am stärksten in der Zelllinie UM-UC-3, während YAK40 in J82-Zellen die stärkste Wirkung zeigte.

Ergebnisse

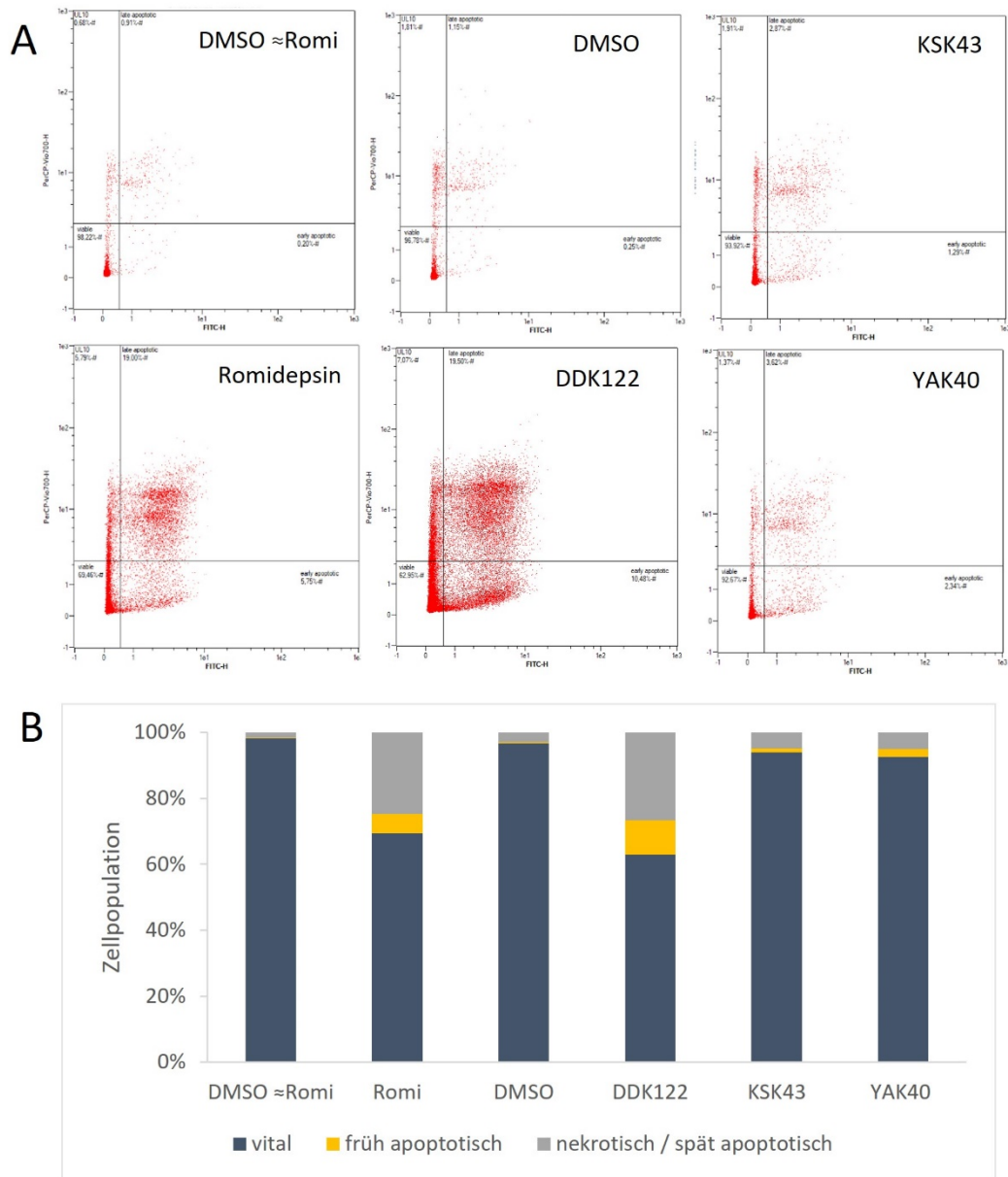


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie UM-UC-3 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zelltod-Induktion wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. Eine repräsentative Messung ist in (A) als Punktdiagramm abgebildet. Unten links: lebensfähige Zellen. Unten rechts: früh-apoptotische Zellen. Oben links und rechts: nekrotische und spät-apoptotische Zellen. In (B) ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation in einem geschichteten Säulendiagramm dargestellt.

Ergebnisse

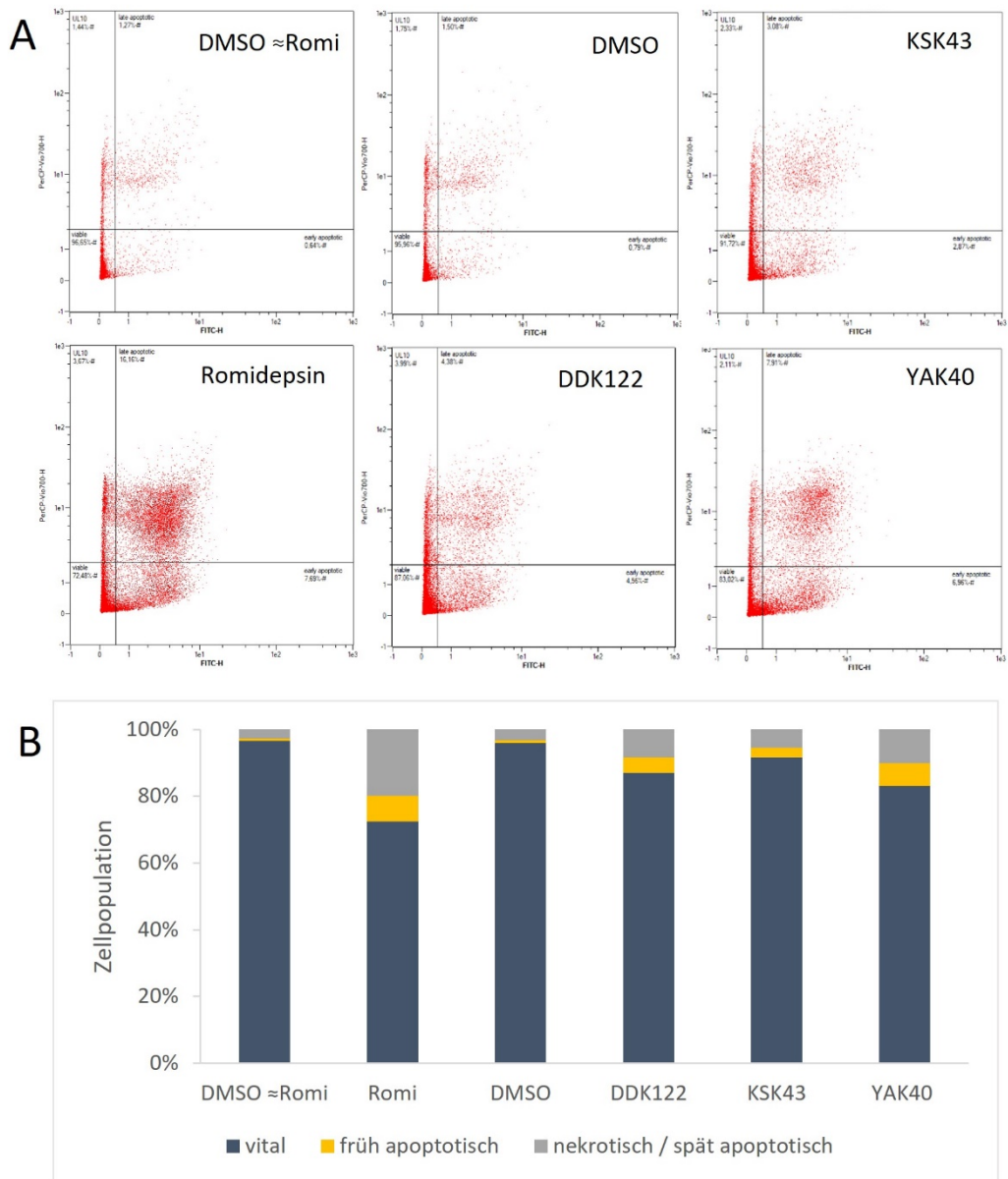


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie J82 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zelltod-Induktion wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. Eine repräsentative Messung ist in (A) als Punktdiagramm abgebildet. Unten links: lebensfähige Zellen. Unten rechts: früh-apoptotische Zellen. Oben links und rechts: nekrotische und spät-apoptotische Zellen. In (B) ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation in einem geschichteten Säulendiagramm dargestellt.

Ergebnisse

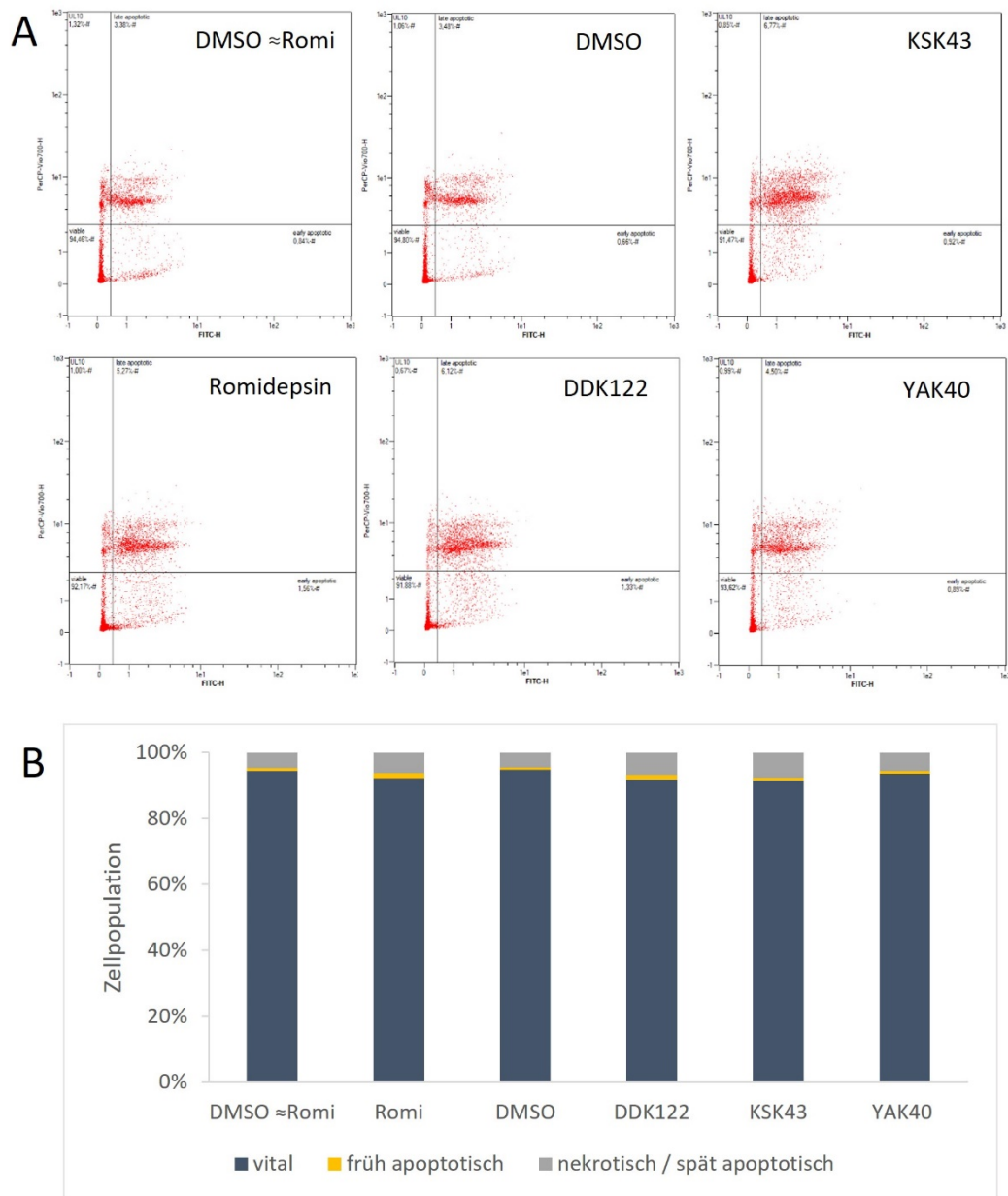


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Apoptose-Analyse der Zelllinie HBLAK nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zelltod-Induktion wurde mittels FACS in Dreifachmessung bestimmt. Eine repräsentative Messung ist in (A) als Punktdiagramm abgebildet. Unten links: lebensfähige Zellen. Unten rechts: früh-apoptotische Zellen. Oben links und rechts: nekrotische und spät-apoptotische Zellen. In (B) ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation in einem geschichteten Säulendiagramm dargestellt.

3.4.4. Nachweis von Caspase-Aktivität mittels Caspase-Glo® 3/7

Nachdem mittels Durchflusszytometrie Indizien für eine Apoptoseinduktion durch die epigenetischen Inhibitoren gesammelt wurden, sollte die Apoptose-assoziierte Aktivierung von Caspasen untersucht werden. Ein Kombinationstest mit Caspase-Glo® 3/7 und CellTiter-Glo® ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung der Caspase-Aktivität und der entsprechenden Zellviabilität.

In der Zelllinie UM-UC-3 zeigte DDK122 die stärkste Wirkung auf die Zellviabilität, gefolgt von Romidepsin, KSK43 und YAK40 (Abbildung 16A, siehe auch Abbildung 13). Parallel dazu wurde nach der Behandlung mit DDK122 die höchste Caspase-Aktivität beobachtet, die etwa viermal höher war als in der Kontrollgruppe. Auf dem zweiten Platz war Romidepsin, gefolgt von KSK43 und YAK40. Diese Ergebnisse bedeuten, dass die HDACi, insbesondere DDK122, in den UM-UC-3-Zellen die Aktivierung von Apoptose-assoziierten Caspasen verursachten.

In Abbildung 15B sind die Ergebnisse für die Zelllinie J82 dargestellt. Die ausgeprägteste Reduktion der Zellviabilität wurde nach der Behandlung mit Romidepsin beobachtet. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse (siehe Abbildung 13) induzierte Romidepsin auch die stärkste Apoptose und führte zur höchsten Caspaseaktivität im Vergleich zu den anderen HDACi. Die Caspaseaktivität war dabei etwa fünfmal höher als in der Kontrollgruppe. Bei den neuen HDACi zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nicht direkt mit denen der Caspase-Analyse korrelieren. So induzierte die Behandlung mit YAK40 eine stärkere Apoptose als DDK122, obwohl DDK122 eine höhere Caspaseaktivität aufwies. KSK43 und YAK40 zeigten vergleichbare Caspaseaktivitätsniveaus, was jedoch nicht mit einer gleichwertigen Apoptoseinduktion einherging.

In dieser Caspase-Analyse wurde auch die Zelllinie SW-1710 untersucht (siehe Abbildung 15C). Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Caspase-Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Im Gegensatz zu den Zelllinien UM-UC-3 und J82 war die Caspase-Aktivität jedoch insgesamt geringer ausgeprägt, was mit einer geringeren Reduktion der Zellviabilität einherging. Der durch HDACi ausgelöste Zelltodmechanismus in der Zelllinie SW1710 ist dennoch Caspase-induziert.

Ergebnisse

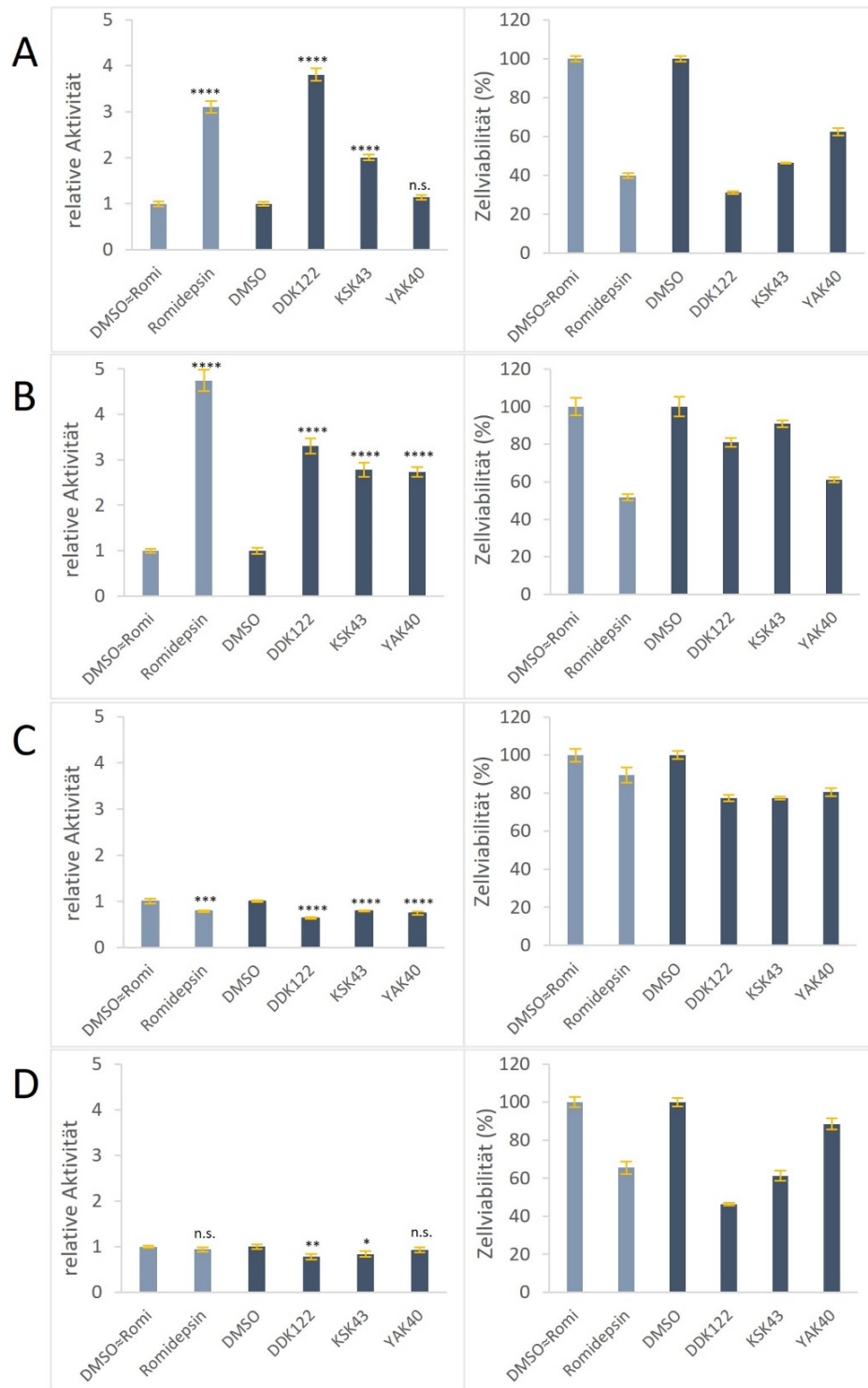


Abbildung 16: Caspase induzierter Zelltod von UCCs nach 72h Behandlung mit den HDACi.

Die Caspase-Aktivität wurde in dreifachen Messungen bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Messung der relativen Caspase 3/7-Aktivität (links) und der Zellviabilität (rechts) in den Zelllinien (A) UM-UC-3, (B) J82, (C) SW-1710 und (D) HBLAK. Die relative Caspase-Aktivität (normiert auf die Zellviabilität) von DMSO wurde als 1 festgelegt und die der HDACi-behandelten Proben wurde entsprechend auf DMSO normalisiert. Signifikante Unterschiede zwischen den HDACi und der jeweiligen DMSO-Kontrolle sind durch * gekennzeichnet. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ und n.s.: nicht signifikant.

Ergebnisse

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in der HBLAK-Zelllinie beobachtet. Obwohl die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Substanz signifikant reduziert wurde, blieb die Caspase-Aktivität unverändert. Dies warf die Frage auf, ob der durchgeführte Test für die Zelllinie geeignet ist und wie die Apoptose-Reaktion von HBLAK-Zellen aussieht. Zur Kontrolle wurden HBLAK-Zellen mit Etoposid behandelt. Etoposid ist bekannt als Auslöser für Apoptoseinduktion. Die HBLAK-Zellen wurden mit 5 μM bzw. 50 μM Etoposid für 24 Stunden behandelt. Das Ergebnis in Abbildung 17 zeigte eine Abnahme der Zellviabilität und die erwartete Zunahme der Caspase-Aktivität. Mit zunehmender Konzentration von Etoposid stieg die Caspase-Aktivität an, während die Zellviabilität abnahm. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit 50 μM Etoposid war die Caspase-Aktivität etwa 13-fach höher als Kontrolle und mit 5 μM Etoposid war sie etwa 7-fach höher. Dies bestätigt, dass der Caspase-Test grundsätzlich für HBLAK Zellen geeignet ist, die Behandlung von HBLAK-Zellen mit den HDACi zwar zu einem Zelltod führt, der aber scheinbar nicht Caspase-abhängig ist.

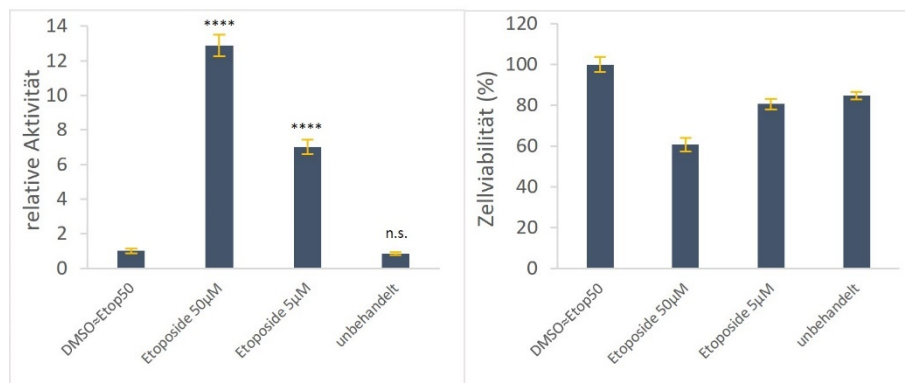


Abbildung 17: Caspase-abhängiger Zelltod von HBLAK Zellen nach 24h Behandlung mit Etoposid als Positivkontrolle.

Dargestellt sind die relative Caspase-Aktivität (links) und Zellviabilität (rechts). Die relative Caspase-Aktivität (normiert auf die Zellviabilität) von DMSO wurde als 1 festgelegt und die der Etoposid behandelten Proben wurde entsprechend auf DMSO normalisiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Testsubstanzen und der jeweiligen DMSO-Kontrolle sind durch * gekennzeichnet. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ und n.s.: nicht signifikant.

3.5. Induktion der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit HDACi

Die DNA-schädigende Wirkung von HDACi wurde mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Experiment-Typen untersucht. Im ersten Experiment wurden die behandelten Zellen fixiert und dann die Proteine γ H2AX sowie 53BP1 als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche immunzytochemisch detektiert (Kapitel 3.5.1). Zur Untersuchung der nachgeschalteten DNA-Schadensantwort wurde in Kapitel 3.5.2 die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 mittels Western Blot bestimmt.

3.5.1. Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche

Da γ H2AX auch durch andere Formen von DNA-Schäden induziert werden kann, wurde die gleichzeitige Zunahme der γ H2AX und von 53BP1 als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche untersucht. Die Behandlung von UM-UC-3- und J82-Zellen mit Romidepsin und neuen HDACi führte zu einer Anreicherung von γ H2AX und 53BP1, wie in Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt. In einer Subpopulation erschien pan-nukleäres γ H2AX und/oder 53BP1. In den meisten Zellen wurde γ H2AX jedoch fokal induziert und zeigte eine Kolo-kalisation mit 53BP1, was typisch für Zellen mit DNA-Schäden ist. Es konnte festgestellt werden, dass die Kerne behandelten Zellen deutlich vergrößert waren, insbesondere diejenigen mit erhöhter Menge an γ H2AX und 53BP1 Foci. Darüber hinaus konnte durch die Kernfärbung mit DAPI die aberrante Kernmorphologie beobachtet werden. Abhängig vom HDACi wurden verschiedene Kernveränderungen festgestellt, wie z.B. Mehrkernigkeit, apoptotische Kerne, Auftreten von *lagging chromosomes*, Entstehung von Mikronuklei und Kernasymmetrie der Tochterzellen, sowie Bildung von Kern- und Zytoplasmabrücken. Diese Beobachtungen deuten zudem auf Störungen während der Mitose und der Zytokinese hin.

Ähnlich wie bei UM-UC-3 zeigten die mit Romidepsin und DDK122 behandelten J82-Zellen sowohl eine Anreicherung von γ H2AX und 53BP1 als auch Störungen in der Mitose und Zytokinese. Nach Behandlung mit YAK40 wurden in den J82-Zellen eine erhöhte Anzahl von Foci und Kernanomalien beobachtet im Vergleich zu den UM-UC-3-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten der Durchflusszytometrie überein. In der benignen Zelllinie HBLAK wurden im Vergleich zur Kontrolle weniger ausgeprägte Veränderungen beobachtet (Abbildung 20). Die Größe der Zellkerne blieb weitgehend unverändert. Die Anreicherungen von γ H2AX und 53BP1 Foci war selten und es wurden nur geringfügige nukleäre Anomalien festgestellt.

Ergebnisse

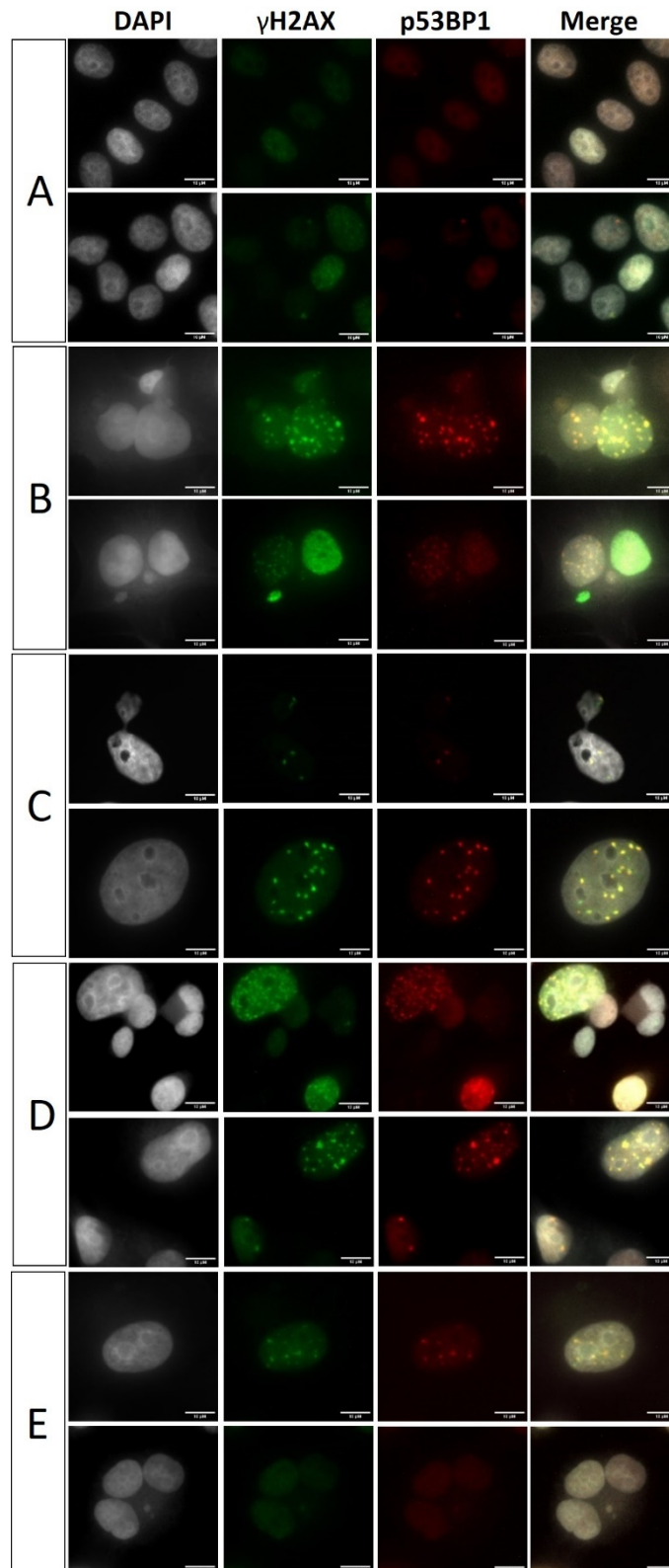


Abbildung 18: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der UM-UC-3-Zelllinie.

Die Zellen wurden 72h mit (A) DMSO-Kontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40 behandelt. Repräsentative Bilder der Kernfärbung DAPI (grau), der ICC-Doppelfärbung γ H2AX (grün) und 53BP1 (rot) sowie der Kombination von γ H2AX und 53BP1. Es gibt doppelt immungefärbte Foci (gelb), aber auch einzelne Foci mit γ H2AX oder 53BP1. Der Größenbalken entspricht 10 μ m, die Vergrößerung beträgt 63x. Die Aufnahmen für die jeweilige Kanäle wurden mit einer konstanten Belichtungszeit durchgeführt.

Ergebnisse

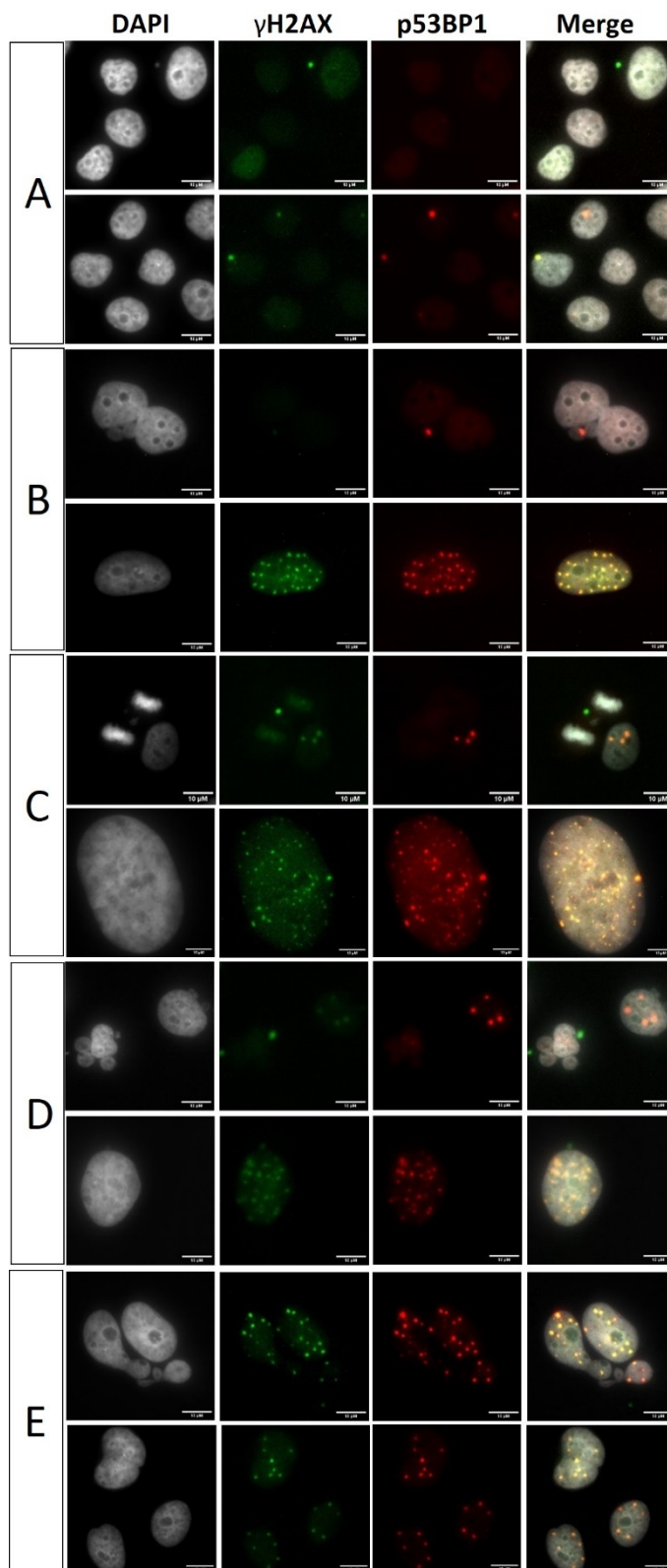


Abbildung 19: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der J82-Zelllinie.

Die Zellen wurden 72h mit (A) DMSO-Kontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40 behandelt. Repräsentative Bilder der Kernfärbung DAPI (grau), der ICC-Doppelfärbung γ H2AX (grün) und 53BP1 (rot) sowie der Kombination von γ H2AX und 53BP1. Es gibt doppelt immungefärbte Foci (gelb), aber auch einzelne Foci mit γ H2AX oder 53BP1. Der Größenbalken entspricht 10 μ m, die Vergrößerung beträgt 63x. Die Aufnahmen für die jeweilige Kanäle wurden mit einer konstanten Belichtungszeit durchgeführt.

Ergebnisse

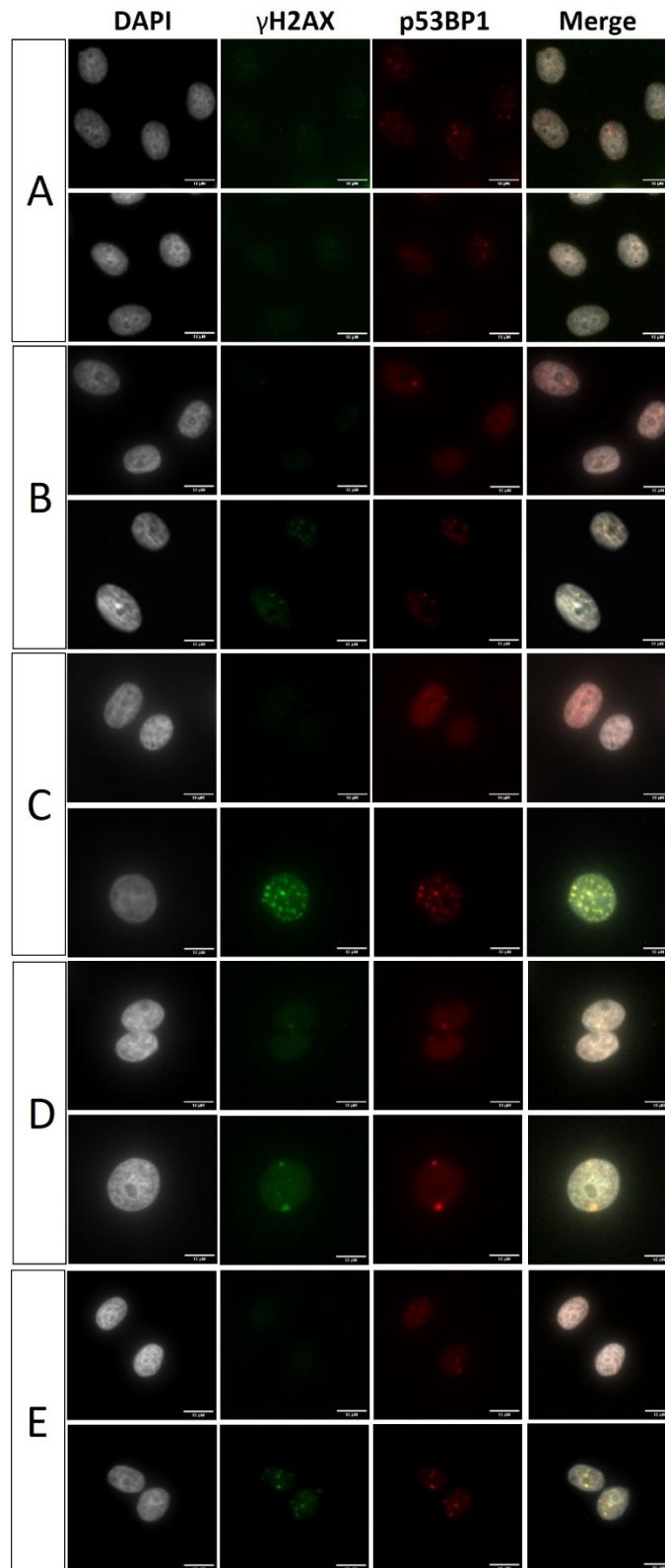


Abbildung 20: Nachweis von γ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker in der HBLAK-Zelllinie.

Die Zellen wurden 72h mit (A) DMSO-Kontrolle, (B) Romidepsin, (C) DDK122, (D) KSK43 und (E) YAK40 behandelt. Repräsentative Bilder der Kernfärbung DAPI (grau), der ICC-Doppelfärbung γ H2AX (grün) und 53BP1 (rot) sowie der Kombination von γ H2AX und 53BP1. Es gibt doppelt immungefärbte Foci (gelb), aber auch einzelne Foci mit γ H2AX oder 53BP1. Der Größenbalken entspricht 10 μ m, die Vergrößerung beträgt 63x. Die Aufnahmen für die jeweilige Kanäle wurden mit einer konstanten Belichtungszeit durchgeführt.

3.5.2. Nachweis von pChk1 und pChk2 als Marker für die DNA-Schadensantwort

Da im Verlauf der Arbeit die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und die Veränderung des Zellzyklus durch epigenetische Inhibitoren nachgewiesen werden konnte, wurde weiter untersucht, ob dies zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort führt. Hierfür erfolgte mittels Western Blot der Nachweis von phosphoryliertem Chk1 und Chk2 im Vergleich zum Totalprotein in den Zelllinien UM-UC-3 und J82. Als zusätzliche Ladekontrolle wurde Vinculin eingesetzt. Neben den Proteinlysaten von behandelten UCCs wurden auch Lysate aus Gemcitabine-behandelten Zellen als Positivkontrolle verwendet (VMCUB1 und RT112). Der Gehalt an pChk1 und pChk2 sowie Chk1 und Chk2 wurde semi-quantitativ mittels Western Blot bestimmt. Die Bandenintensität von pChk1 oder pChk2 wurde im Verhältnis zum Gesamtprotein Chk1 oder Chk2 berechnet. Daraus wurde eine relative Intensität abgeleitet, die nach Normalisierung mit der entsprechenden DMSO-Kontrolle als quantitatives Maß für die Bandenintensität diene.

In Abbildung 21 und Abbildung 22 sind die Ergebnisse für die Zelllinie UM-UC-3 dargestellt. Insgesamt waren die Signale für pChk1 in allen Proben -mit Ausnahme der Positivkontrollen- schwer detektierbar, so dass die Phosphorylierung von Chk1 nach HDACi Behandlung nicht nachgewiesen werden konnte. Nach der Behandlung mit Romidepsin und DDK122 konnte eine verminderte Expression des Gesamtproteins Chk1 nachgewiesen werden. Dies führte zu einer höheren relativen Intensität, obwohl die Intensität von pChk1 nicht beurteilt werden konnte. Ein ähnliches Muster war bei pChk2 und Chk2 zu sehen. Hier war jedoch die Veränderung von pChk2 gut erkennbar. Wie bei Chk1 führten Romidepsin und DDK122 zu einer Reduktion von Chk2. Gleichzeitig waren die Bandenintensitäten von pChk2 stärker. KSK43 und YAK40 hingegen verursachten kaum Unterschiede in der Expression von Chk1 und Chk2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. In der Zelllinie J82 (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24) wurde nach Behandlung mit allen HDACi eine verringerte Expression von Chk1 beobachtet. Die Signale von pChk1 waren hier ebenfalls nicht detektierbar. Alle HDACi führten zu einer vermehrten Phosphorylierung von Chk2, wobei das stärkste Signal von KSK43 ausging, gefolgt von YAK40. Parallel dazu blieben die Signale für Chk2 praktisch unverändert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Wirkung von HDACi, die mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse korrelierten. DDK122 wirkte ähnlich wie Romidepsin und beide hatten eine signifikante Wirkung auf UM-UC-3-Zellen. Im Gegensatz dazu hatten KSK43 und YAK40 einen stärkeren Effekt auf die Zelllinie J82. Obwohl HDACi die Phosphorylierung von Chk1 nicht beeinflussten, bewirkten sie eine Reduktion des

Ergebnisse

Gesamtproteins Chk1. Die Behandlung mit HDACi führte zu einer leicht gesteigerten Phosphorylierung von Chk2, insbesondere durch KSK43 und YAK40 in der Zelllinie J82.

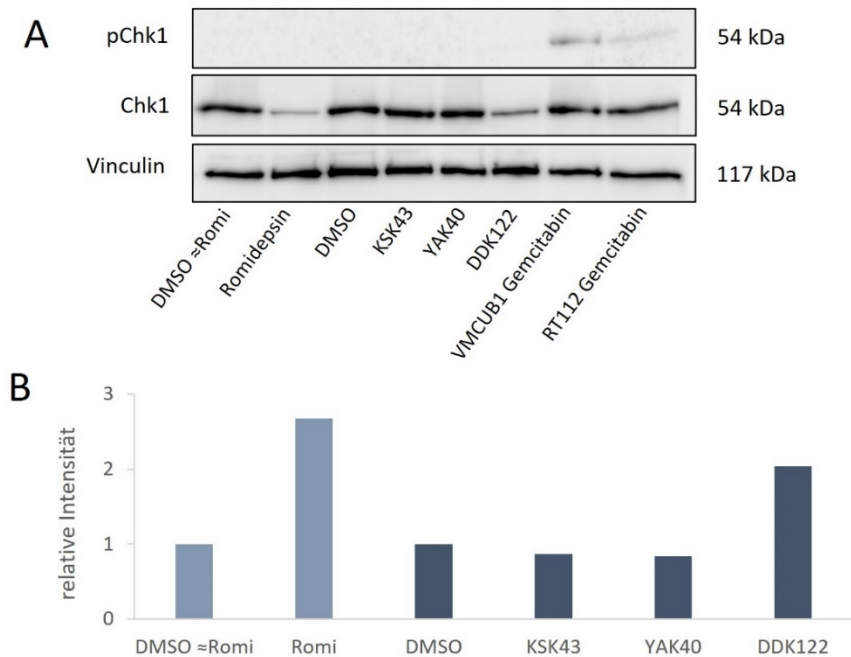


Abbildung 21: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk1 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Chk1 und totales Chk1. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der pChk1 zu totalen Chk1 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

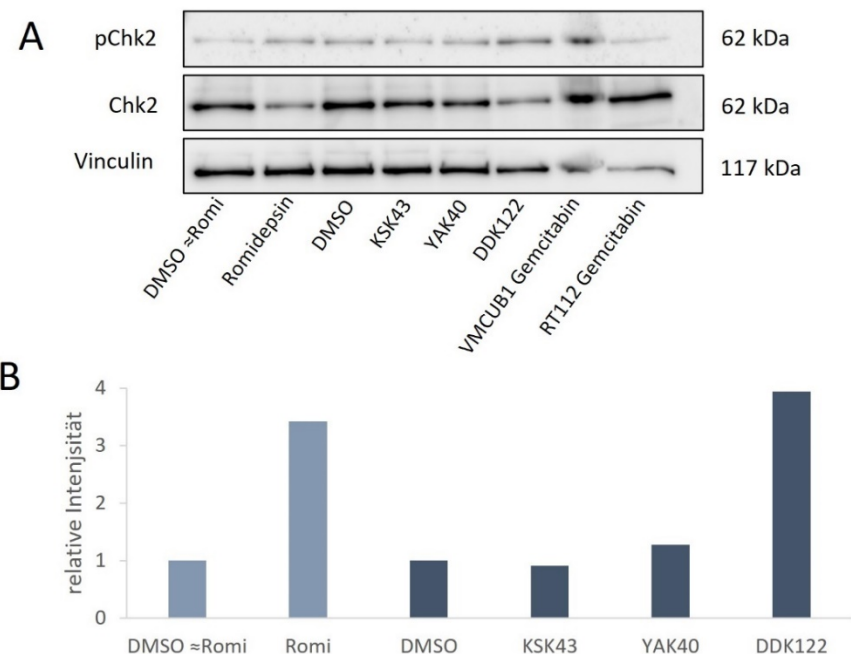


Abbildung 22: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk2 in UM-UC-3-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Chk2 und totales Chk2. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der pChk2 zu totalen Chk2 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

Ergebnisse

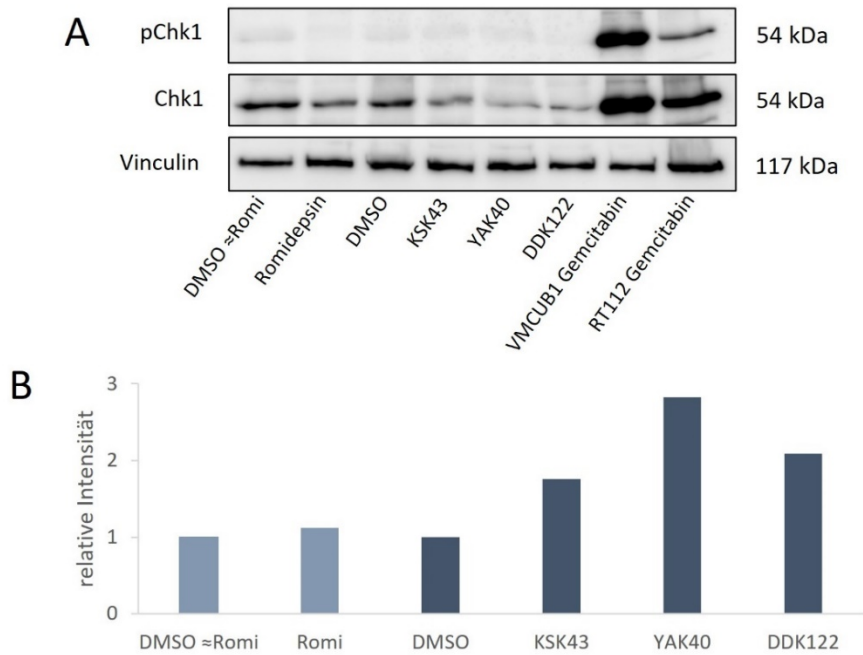


Abbildung 23: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk1 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Chk1 und totales Chk1. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der pChk1 zu totalen Chk1 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

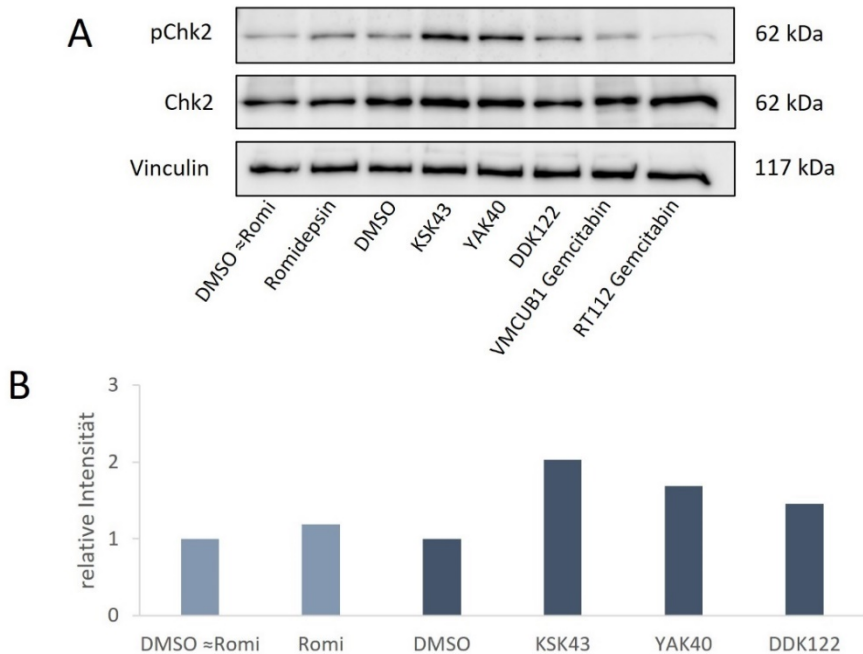


Abbildung 24: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von Chk2 in J82-Zellen nach 72h Behandlung mit HDACi.

(A) Proteinblot mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Chk2 und totales Chk2. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet. Aufgetragen wurde 20 µg Protein. (B) relative Intensität der pChk2 zu totalen Chk2 nach Normalisierung zur entsprechenden DMSO-Kontrolle.

3.6. Veränderung der Genexpression nach Behandlung mit HDACi

Nach den bisherigen Ergebnissen war es weiterhin von Interesse, die Wirkung von HDACi auf die mRNA-Expression bestimmter Gene in UCCs mittels RT-qPCR zu erforschen. Zu diesem Zweck wurden spezifische Gene ausgewählt, die eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und -Reparatur (*BCCIP*, *MCM2*, und *MCM3*) sowie bei der Mitose und Zytokinese (*PLK4*, *ESPL1*, und *NCAPG*) spielen. Die Genexpression wurde für jede Zelllinie in dreifacher Messung bestimmt und relativ zu den Referenzgenen *TBP* und *SDHA* normalisiert. Daraus wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die mRNA-Expression nach Kontrollbehandlung mit DMSO wurde auf den Wert 1 gesetzt und die relative Genexpression im Vergleich zur Genexpression unter DMSO-Bedingung bestimmt. Ein positiver Wert deutet auf eine erhöhte Genexpression hin, während ein negativer Wert auf eine verminderte Genexpression hinweist. Veränderungen wurden ab einem Schwellenwert von $\pm 1,5$ als relevant angesehen.

Abbildung 25 fasst die Ergebnisse der RT-qPCR zusammen. Die Behandlung mit HDACi führt zu keiner Veränderung in der relativen *BCCIP*-Expression. Hingegen wurde eine signifikante Reduktion der *MCM2*-Expression in UM-UC-3-Zellen nach der Behandlung mit Romidepsin (1,8-fach) und DDK122 (1,8-fach) beobachtet. Ein ähnlicher Effekt war auch in der *MCM3*-Expression zu sehen. Romidepsin führte zu einer 1,5-fachen und DDK122 zu einer 1,6-fachen Reduktion. In der Zelllinie J82 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Hier blieb die Expression von Genen, die an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt sind, unverändert. Romidepsin und DDK122 bewirkten eine Abnahme der *PLK4*-Expression sowohl in der Zelllinie UM-UC-3 als auch in J82, wobei Romidepsin (um den Faktor 2,7 bzw. 3,0) eine stärkere Wirkung zeigte als DDK122 (um den Faktor 1,6 bzw. 2,0). In Bezug auf das *ESPL1*-Gen zeigte Romidepsin die stärkste Wirkung in J82 (3,2-fach) und UM-UC-3 (2,1-fach). YAK40 und DDK122 hatten mit Werten von 1,7 bzw. 1,8 in etwa die gleiche Effektstärke auf J82-Zellen. Wie in der *ESPL1*-Expression in UM-UC-3-Zellen konnte eine Verminderung des *NCAPG*-Gens nur nach der Behandlung mit Romidepsin (1,9-fach) beobachtet werden.

Insgesamt wies DDK122 in beiden Zelllinien ein ähnliches Wirkprofil wie Romidepsin auf. Die Wirkung von Romidepsin und DDK122 auf die Genexpression in J82 war besonders ausgeprägt bei Faktoren, die an der Regulation von Mitose und Zytokinese beteiligt sind, jedoch kaum in der Expression von DNA-Replikations- und -Reparaturgenen. Im Gegensatz dazu war die Wirkung von Romidepsin und DDK122 in UM-UC-3 in fast allen untersuchten Genen stark. KSK43 und YAK40 wirkten sichtlich anders auf die Expression der gemessenen Gene.

Ergebnisse

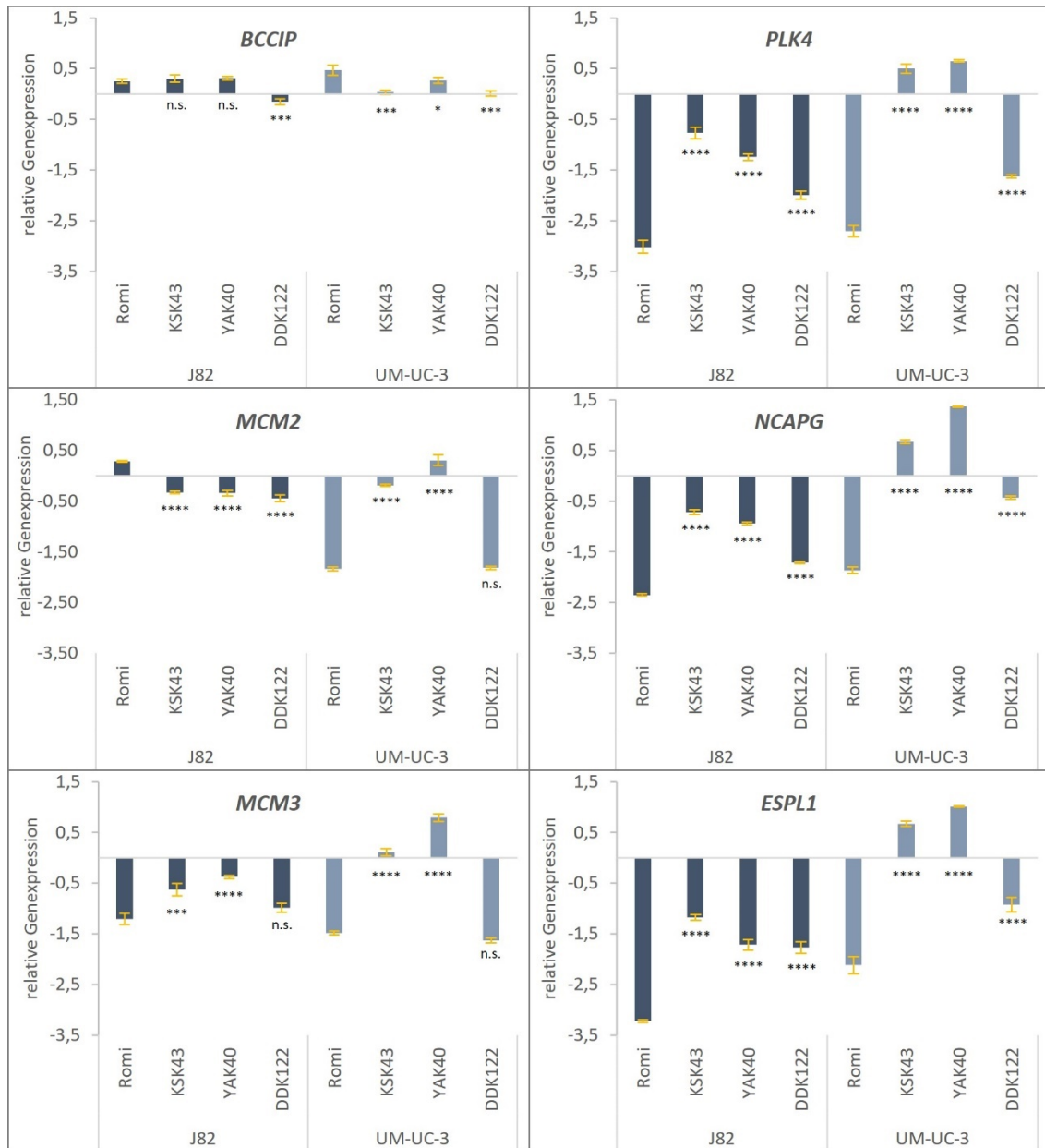


Abbildung 25: relative mRNA-Expression der Zelllinien UM-UC-3 und J82 nach 72h Behandlung mit HDACi.

Links sind Gene für DNA-Reparatur: *BCCIP*, *MCM2*, *MCM3* und rechts sind Gene für Mitose und Zytokinese dargestellt: *PLK4*, *ESPL1*, *NCAPG*. Die Genexpression wurde auf die Referenzgene *TBP* und *SDHA* normalisiert. Das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle wurde als 1 gesetzt und die Expressionswerte der anderen Proben wurden darauf bezogen. Signifikante Unterschiede zwischen den neuen HDACi und Romidepsin sind durch * gekennzeichnet. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ und n.s.: nicht signifikant.

3.7. Synergistische Wirkung nach einer Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und HDACi

Sowohl in der Zytotoxizität, bei der Induktion von DNA-Schäden, dem Zellzyklusarrest als auch durch Veränderung der Genexpression erwies sich DDK122 als vielversprechende Substanz. UM-UC-3 Zellen hatten sich als responsiv herausgestellt. Daher wurde am Ende der Arbeit untersucht, ob eine Kombinationsbehandlung mit DDK122 und Cisplatin zu einer synergistischen Abnahme der Zellviabilität führt. Patienten mit muskel-invasiven Urothelkarzinomen werden mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie behandelt, die jedoch häufig nur begrenzt wirksam ist. Hierfür wurden UM-UC-3-Zellen in Einzel- und Kombinationsbehandlung mit DDK122 und Cisplatin gleichzeitig behandelt und mittels MTT-Tests die Zellviabilität bestimmt. Zur Überprüfung der synergistischen Wirkung wurde die Chou-Talalay-Methode herangezogen.

Ein repräsentatives Ergebnis der Kombinationsanalyse ist in Abbildung 26 veranschaulicht. Die Qualität der Regressionslinie wurde mittels des R^2 -Wertes bewertet. Für die Behandlung mit DDK122, Cisplatin und deren Kombination betrugen die Werte 0,97; 0,99; und 0,96. Die Kombination von DDK122 mit Cisplatin ergab bei allen Dosis-Punkten synergistische Effekte mit $CI < 1$. Schon bei der Dosierung mit dem 0,25-fachen IC_{50} zeigte die Kombinationsbehandlung eine synergistische Reduktion der Zellviabilität. Der Anteil an toten Zellen (Fa) nach der Kombinationsbehandlung mit dem 0,25-fachen IC_{50} lag ungefähr bei 0,42. Bei einem Fa-Wert von 1 sind 100% der Zellen tot. Hingegen lagen die Werte von Einzelbehandlung mit DDK122 bei 0,06 und mit Cisplatin bei 0,10. Bei einer Dosierung mit dem 1,0-fachen IC_{50} -Wert lagen die Fa-Werte nach der Behandlung mit DDK122, Cisplatin und deren Kombination bei 0,62, 0,63 und 0,94. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination des neuen HDACi DDK122 mit Cisplatin eine effektive erfolgversprechende Therapie sein könnte, die die Wirkung von Cisplatin erheblich steigert. Durch den Synergieeffekt wären Dosisreduktionen möglich, die für die Reduktion der Nebentoxizität günstig sind. Zudem war diese Substanz ursprünglich basierend auf Ihrer Potenz und stärker tumorspezifischen Wirkung ausgesucht worden.

Ergebnisse

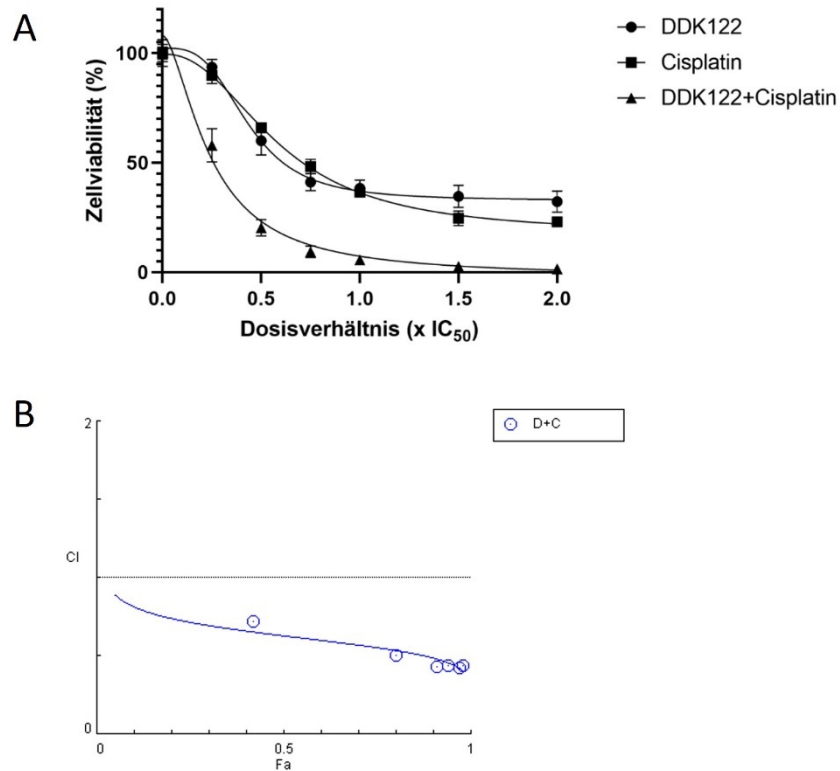


Abbildung 26: Die synergistische Wirkung von Cisplatin und DDK122 auf die UM-UC-3 Zelllinie.

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis mit Mittelwerten $\pm$ Standardabweichungen von Quadruplikaten eines 3-mal durchgeführten Experiments. (A) Die Zellviabilität ist dargestellt nach 72h Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin und DDK122 im Bereich von 0,25-facher bis 2,0-facher IC_{50} . Die Zellviabilität wurde gegenüber der entsprechenden DMSO-Kontrolle normalisiert. (B) Das resultierende CI/Fa-Diagramm wurde mittels Chou-Talalay-Methode mit der Compusyn Software erstellt. Dargestellt sind Fraktion toter Zellen (Fa) und der Kombinationsindex (CI). Eine horizontale Linie bei $CI = 1$ repräsentiert einen additiven Effekt, Werte unterhalb der Linie ($CI < 1$) geben einen synergistischen Effekt an und Werte oberhalb der Linie ($CI > 1$) einen antagonistischen Effekt. D+C steht für die Kombination von DDK122 und Cisplatin.

4 Diskussion

Das Harnblasenkarzinom stellt global eine bedeutende Herausforderung im Bereich der onkologischen Erkrankungen dar. Angesichts der komplexen molekularen Mechanismen, die der Tumorentstehung zugrunde liegen, gewinnt die Erforschung der epigenetischen Regulation zunehmend an Bedeutung. Im Gegensatz zu genetischen Veränderungen, bei denen die DNA-Sequenz selbst betroffen ist, bezieht sich die Epigenetik auf Modifikationsprozesse, die die Genexpression beeinflussen, ohne die zugrunde liegende DNA-Sequenz zu verändern. Dazu gehören beispielsweise DNA-Methylierung, Histon-Demethylierung und Histon-Deacetylierung. Insbesondere die Hemmung von Histondeacetylasen (HDAC) hat sich als vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie erwiesen (Witt et al. 2009). Ein tieferes Verständnis dieser molekularen Mechanismen könnte nicht nur dazu beitragen, die Grundlagen der Tumorentstehung besser zu verstehen, sondern auch innovative und zielgerichtete Therapieoptionen für Patienten mit Harnblasenkarzinom zu entwickeln.

Laborinterne Vorarbeiten haben die Bedeutung von verschiedenen HDACi im Zusammenhang mit dem Harnblasenkarzinom aufgezeigt. Die Herunterregulation oder pharmakologische Inhibition von HDACs, insbesondere der Klasse I HDACs, zeigte signifikante Auswirkungen auf die Zellviabilität, Störungen im Zellzyklus, Induktion von Zelltod, Initiierung von DNA-Schäden sowie Veränderungen im Transkriptom (Pinkerneil et al. 2016a; Hoffmann et al. 2021). Bisher von der AG untersuchte Inhibitoren wie z.B. Romidepsin hatten teilweise auch relevante Effekte auf gutartige Kontrollzelllinien gezeigt. Daher wurden im Vorfeld in einem Drug-Screen in der Core facility neue HDACi der AG Kurz aus der Pharmazie auf Ihre Wirkung auf eine gutartige Uroepithel-Zelllinie (HBLAK) im Vergleich zu UC-Zelllinien untersucht. Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse für 10 Substanzen mittels MTT validiert, die im Screen stärkere Wirkung auf UCCs als auf HBLAK Zellen hatten. Daraus ergaben sich die TOP 3 Inhibitoren, nämlich DDK112, KSK43 und YAK40, deren Wirkung in dieser Arbeit im Vergleich zum kommerziellen HDACi Romidepsin genauer untersucht werden sollte. Laut ihrer Molekülstruktur sollten diese Substanzen vor allem HDAC der Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8) und IIb (HDAC 6 und 10) inhibieren. Bisher deuten die Ergebnisse der AG darauf hin, dass die HDACs 1 und 2 besonders vielversprechende Angriffspunkte darstellen, während HDAC6 (Rosik et al. 2014) und HDAC8 (Lehmann et al. 2014) sich als weniger geeignete therapeutische Targets beim Harnblasenkarzinom erwiesen. Die kombinierte Hemmung von HDAC1/2 scheint die beste Wirkung gegenüber malignen UC-Zellen zu haben, während eine Hemmung von HDAC3 toleriert wird. Es bleibt zu klären, ob eine verstärkte Hemmung von HDAC3 die Wirksamkeit oder

Selektivität von HDAC1/2-Inhibitoren gegenüber malignen UC-Zellen beeinflusst. Über HDAC10 ist zum Urothelkarzinomen wenig bekannt (Pinkerneil et al. 2016a; Pinkerneil et al. 2017).

Das Ziel der Arbeit war es daher, Substanzen zu identifizieren, die eine möglichst vergleichbare molekulare Wirkung wie Romidepsin zeigen, jedoch eine höhere Spezifität für Tumorzellen aufweisen und eine geringere Beeinträchtigung normaler Zellen verursachen. Daher wurde die Wirkung der neuen HDACi auf die Zellproliferation von UCCs, die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose sowie die Induktion von DNA-Schäden im Vergleich zu Romidepsin charakterisiert.

4.1. Isoenzym-Spezifität der neuen HDACi

Histon H3 wird in den Histonschwänzen an mehreren Positionen durch Acetylierungen und Methylierungen modifiziert. Diese Modifikationen korrelieren je nach Position mit einer Suppression oder Aktivierung der Transkription (Al Aboud et al. 2023). Die Acetylierungszustand der Histone wird im Wesentlichen durch die HDAC Isoenzyme der Klasse I reguliert. Durch die Bestimmung der Histon H3 Acetylierung kann der Einfluss von HDACi auf diese Histonmodifikation untersucht werden. Das Ziel war festzustellen, ob die Anwendung der neuen HDACi auf UCCs zu einer Erhöhung des Gehalts an acetyliertem Histon H3 führt.

Sowohl in UM-UC-3 als auch in J82 Zellen wurde eine erhöhte Acetylierung beobachtet, besonders signifikant nach der Behandlung mit Romidepsin und DDK122. KSK43 und YAK40 führte zu weniger starken Veränderungen in der Histonacetylierung. Zusammen betrachtet deuten diese Daten darauf hin, dass Romidepsin insbesondere HDAC Isoenzyme der Klasse I inhibiert und so die Deacetylierung von Histon H3 am stärksten hemmt. Im Gegensatz zu dem handelsüblichen HDAC-Inhibitor Romidepsin ist die Substratspezifität der neuen HDACi gegenüber den HDAC Isoenzymen von der AG Kurz bisher nicht eingehend erforscht. Die Histonanalysen in dieser Arbeit deuten an, dass DDK122, wie Romidepsin, Klasse I Enzyme hemmt, während die anderen beiden Substanzen eher eine stärkere inhibitorische Wirkung auf andere HDAC-Klassen, vermutlich der Klasse II ausüben.

4.2. HDACi reduzieren die Zellviabilität und verändern die Zellmorphologie

Die Überprüfung der zytotoxischen Wirkung von HDACi auf Zellen ist ein wesentlicher Schritt, um ihre potenzielle Anwendung als therapeutische Option für die Behandlung des Urothelkarzinoms zu gewährleisten.

Diskussion

Die 72-stündige Behandlung von UCCs mit Romidepsin und neuen HDACi führte in allen Fällen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Viabilität im MTT-Test. Im Vergleich dazu zeigte die Behandlung mit LAK126 keine signifikante Veränderung der Zellviabilität. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Daten überein, die darauf hindeuten, dass insbesondere HDAC1/2-spezifische Inhibitoren wirksam sind, während die HDAC3-spezifische Inhibitoren (wie z.B. durch die Substanz RGFP966) kaum zytotoxische Wirkung zeigten (Pinkerneil et al. 2017).

In früheren Arbeiten dieser AG wurde bereits die Wirkung von Romidepsin auf Urothelkarzinom-Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die IC_{50} -Werte für normale Zellen (HBLAK und TERT-NHUC) niedriger waren als für UCCs (VM-CUB1 und UM-UC-3) (Pinkerneil et al. 2016a). Romidepsin zeigt in dieser Studie mit zelllinienabhängigen IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (1,2 nM - 23,3 nM) eine deutlich höhere Potenz, was auf seine etablierte pharmakologische Aktivität und möglicherweise eine höhere Affinität zu den Ziel-HDACs zurückzuführen ist. Die neu entwickelten HDACi weisen dagegen IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich (0,9 μ M - 18,3 μ M) auf. Dies könnte auf mehrere Faktoren bedingt sein: 1) Reinheit der Substanzen, möglicherweise enthalten die neu synthetisierten Verbindungen noch Verunreinigungen oder Nebenprodukte, die die effektive Wirkstoffkonzentration verringern; 2) Optimierung der Molekülstruktur, während Romidepsin bereits eine optimierte Struktur besitzt, könnten die neuen HDACi weitere Modifikationen erfordern, um eine höhere Zielaffinität und damit Wirksamkeit zu erreichen; oder 3) Zelluläre Aufnahme und Stabilität, Unterschiede in der Lipophilie oder der chemischen Stabilität könnten die Bioverfügbarkeit der neuen Substanzen in den Zellen einschränken.

Insgesamt zeigte SW-1710 eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber den neuen HDACi. Im Gegensatz dazu war die Zelllinie J82 sowohl gegenüber Romidepsin als auch gegenüber den neuen HDACi weniger responsiv, ihre Sensitivität beschränkte sich vorwiegend auf YAK40. Im Gegensatz zu Romidepsin, lagen die IC_{50} -Werte der neu entwickelten HDACi in UCCs niedriger als in HBLAK.

Zusätzlich zur Analyse der Zellviabilität wurde zahlreichen morphologischen Veränderungen festgestellt. Die Behandlung mit Romidepsin und den neuen HDACi führte bei allen Zelllinien zu einer Zunahme der Zellgröße und einer Abflachung der Zellen. Die behandelten UM-UC-3 und J82 Zellen wurden länglich mit fibroblastoider Morphologie und zahlreichen Filopodien und Lamellipodien. Im Gegensatz dazu nahmen die behandelten SW-1710 Zellen einen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp an. Die Zellen hatten eine große, flache, spiegeleiartige Morphologie. Die Kontrollzellen HBLAK zeigten eine noch deutlicher ausgeprägten Seneszenz-ähnliche Morphologie.

Mittels DAPI-Kernfärbung konnten weiterhin Veränderungen in den Zellkernen nachgewiesen werden. Unter der Behandlung mit unterschiedlichen HDACi wurden diverse Kernveränderungen in UCCs beobachtet, die auf Störungen während der Replikation, Mitose und Zytokinese hinweisen. Zu diesen Veränderungen zählen Mehrkernigkeit, apoptotische Kerne, Auftreten von *lagging chromosomes*, Bildung von Mikronuklei, Kernasymmetrie der Tochterzellen, sowie Bildung von Kern- und Zytoplasmabrücken. Diese beobachteten Veränderungen wurden ebenfalls in diversen Studien nach Behandlung mit HDACi der Klasse I dokumentiert (Pinkerneil et al. 2016b; Cimini et al. 2003; Qiu et al. 2000; Warrenner et al. 2003).

Bei HBLAK-Zellen blieb die Kerngröße unverändert, während die Gesamtzellgröße zunahm. Dies deutet darauf hin, dass HDACi nur einen geringen genomischen Einfluss auf HBLAK-Zellen hatten oder dass diese Zellen über andere Abwehrmechanismen verfügen als UCCs, was im folgenden Unterkapitel näher diskutiert wird.

4.3. HDACi führen in UCCs zur Apoptose

Zur weiteren Untersuchung der Wirkmechanismen von HDACi wurden Apoptoseanalysen mittels Annexin V/PI-Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Romidepsin als auch DDK122 deutlich Apoptose in UM-UC-3 Zellen induzierten. Im Vergleich zur Behandlung mit Romidepsin befanden sich nach 72 Stunden Behandlung mit DDK122 mehr Zellen im Zustand der frühen Apoptose. Dieser Effekt war bei J82-Zellen nicht zu beobachten, was mit den Ergebnissen des Zellviabilitätstests korrelierte. J82-Zellen reagieren wenig empfindlich auf die meisten HDACi mit Ausnahme von YAK40. Die apoptotische Wirkung von YAK40 war jedoch geringer als die von Romidepsin. KSK43 und YAK40 zeigen insgesamt schwache apoptotische Effekte in beiden Zelllinien (UM-UC-3 und J82).

Zur Ergänzung der Apoptose-Daten wurden Caspase 3/7-Messungen durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse mit durchflusszytometrischen Daten zeigte einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Caspase-Aktivität, der Intensität der Apoptose-Induktion und der Anzahl lebender Zellen in den Zelllinien UM-UC-3 und J82. In der Zelllinie SW-1710 zeigte die Analyse der Caspase-Aktivität unter Einfluss verschiedener HDACi einen vergleichbaren Trend.

Es lässt sich feststellen, dass die Substanzen DDK122 und Romidepsin die Caspase-vermittelte Apoptose am stärksten induzierten, während YAK40 und KSK43 einen geringeren Effekt aufwiesen. Die Isoenzympezifität von KSK43 und YAK40 lässt die Möglichkeit offen, dass sie entweder stärkere zytostatische Effekte oder andere nicht-apoptotische Zelltodmechanismen auslösen. Beispielsweise haben Studien gezeigt, dass HDACi die Zellproliferation verringern und

den Zelltod über einen nicht-apoptotischen Wege, wie Autophagie oder Nekroptosis, auslösen, ohne dabei apoptotischen Zelltod oder eine Zellzyklushemmung zu verursachen (Chang et al. 2021; Boyault et al. 2007). Dies wurde unter anderem bei Hepatokarzinomzellen (Jung et al. 2012; Liu et al. 2010), Glioblastomzellen (Gammoh et al. 2012), Brustkrebszellen (Natarajan et al. 2018) sowie Kopf- und Halskrebszellen (Hattori et al. 2021) beobachtet.

Nach Exposition von HBLAK-Zellen mit Romidepsin und den neuen HDACi wurde in der Durchflusszytometrie weder frühe noch späte Apoptose beobachtet. Gleichzeitig konnte trotz einer Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe keine nachweisbare Caspase-Aktivität festgestellt werden. Somit wurde in der Zelllinie HBLAK weder eine Caspase-Aktivierung noch Apoptose-Induktion beobachtet. Die Resultate deuten darauf hin, dass HDACi zwar in der Lage sind, Apoptose in den Tumorzelllinien UM-UC-3, J82 und SW-1710 zu induzieren, dies aber in der gutartigen HBLAK nicht der Fall ist. Es war das Ziel dieser Arbeit einen neuen HDCAi zu finden, der stärker auf UC-Zellen als auf HBLAK-Kontrollzellen wirkt.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass HBLAK-Zellen alternative Abwehrmechanismen gegenüber HDAC-induziertem Zellstress besitzen, wie z.B. den Eintritt in die Seneszenz. Andere berichten, dass normale Zellen relativ resistent gegen HDACi-induzierten Zelltod sein können (Insinga et al. 2005; Burgess et al. 2004). Als benigne Uroepithelzellen mit stark limitierten genetischen Veränderungen verfügen HBLAK-Zellen über eine normale Zellzyklusregulation, die bei den UCCs häufig gestört ist. Dies ermöglicht HBLAK-Zellen den Zellzyklus ordnungsgemäß zu stoppen, um die destruktiven Effekte von HDACi zu reparieren (Lee et al. 2010). Diese Hypothese wird durch beobachtete morphologische Veränderungen in Form von spiegeleiförmigen Zellveränderungen unterstützt. Frühere Arbeiten von Pinkerail (2016) zeigte, dass die Behandlung mit HDACi eine ausgeprägte zelluläre Seneszenz in HBLAK Zellen induziert.

Wie bereits diskutiert, induzieren HDACi in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Zelltodmechanismen. Weitere Untersuchungen zu anderen Zelltodmechanismen wären daher von Interesse.

4.4. HDACi induzieren Zellzyklusstörungen

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass HDACi ebenfalls einen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben können und damit die Zellproliferation hemmen. Dies geschieht, indem sie die Expression verschiedener Zellzyklusproteine sowohl regulieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen bösartigen Tumoren führen HDACi der Klasse I wie Romidepsin, Givinostat und der pan-

Inhibitor Vorinostat in Urothelkarzinomzellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und nicht in der G1-Phase (Kaletsch et al. 2018; Pinkerneil et al. 2016a). HDACi können durch Aktivierung eines G2-Checkpoints einen G2/M-Phasenarrest induzieren. In einigen Fällen kann der Verlust des G2-Checkpoints die Empfindlichkeit für Apoptose unter HDACi erhöhen. Da die UC-Zellen häufig eine defekte Checkpointregulation tragen, können sie sich nach HDACi-Behandlung zunächst in der G2/M-Phase anreichern und eine abweichende Mitose durchlaufen, die zur Bildung von multinukleären Zellen oder Mikronuklei und schließlich Apoptose führt (Bolden et al. 2006). Die Veränderung der Zellkerne wurden auch in dieser Arbeit beobachtet und wie in Kapitel 4.2. diskutiert.

Die Wirkung der neuen HDACi auf den Zellzyklusarrest wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nach einer Expositionszeit von 72 Stunden zeigten die Zellzyklus-Histogramme von UM-UC-3 und J82 deutliche Unregelmäßigkeiten mit einem signifikanten Anstieg der G2/M-Phasenfraktion. Insbesondere in UM-UC-3 stieg die G2/M-Fraktion nach Behandlung mit Romidepsin und DDK122 am stärksten an. Durch die Bestimmung der pH3-positiven Zellen als Mitosemarker konnte festgestellt werden, dass die mit Romidepsin und DDK122 behandelten Zellen nicht in die Mitosephase eingetreten sind. Die Zellen verblieben in der G2-Phase. Darüber hinaus wurde nach der Anwendung aller HDACi eine Zunahme der Zellen in der sub-G1-Phase festgestellt, was auf apoptotische und nekrotische Zellen hinweist, sowie eine Zunahme der Aneuploidie. KSK43 und YAK40 führten auch zu einer Erhöhung der S-Phasenfraktion. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass KSK43 und YAK40 die DNA-Replikation in UM-UC-3 stören und die Zellen daher in S-Phase verbleiben. HDAC1 und HDAC2 modulieren die Aufrechterhaltung des Chromatins in der S-Phase, deren Störung zu einer verlängerten Synthese führen kann (Bhaskara et al. 2013; Solta et al. 2023). Eine andere Studie zeigte, dass der HDACi Entinostat einen S-Phasenarrest in SCLC-Zelllinien (kleinzelliger Lungenkrebs) verursachte (Solta et al. 2023). Im Gegensatz zu KSK43 und YAK40 führten Romidepsin und die neuen HDACi in J82 zu einer Abnahme der S-Phasenfraktion. Hier scheinen HDACi die S-Phase zu beschleunigen, aber die Zellen können anschließend die G2/M-Phase nicht durchlaufen.

Anders als in Tumorzelllinien zeigte in HBLAK die G2/M-Fraktion kaum Veränderungen, während die G1- und S-Phasen variierten. Die HDACi zeigten eine gewisse Tumorselektivität. Wie in Vorarbeiten (Pinkerneil et al. 2016a) berichtet, induzieren HDACi in HBLAK einen Zellzyklus-Stillstand in G1. Zudem wird in normalen HBLAK Zellen anscheinend eher ein Seneszenz-ähnlicher Zustand induziert als in Tumorzellen. DDK122 zeigte in HBLAK einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Romidepsin, beide führten zu einer Zunahme der G1-Phase und einer

Abnahme der S-Phase. Im Gegensatz dazu führte YAK40 zu einer Abnahme der G1-Phase und einer Zunahme der S-Phase. KSK43 zeigte kaum einen Effekt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Generell scheint die Reduktion der Zellzahl nach Hemmung von HDAC Klasse I und IIb in UM-UC-3 sowohl auf Caspase-assoziiierter Apoptose als auch auf Zellzyklusarrest zurückzuführen zu sein. In J82 deutet die verringerte Zellzahl nach Behandlung mit Romidepsin und DDK122 eher auf gesteigerte Apoptose als auf Zyklusstillstand hin. Bei KSK43 und YAK40 ist dagegen ein umgekehrter Effekt zu beobachten. HBLAK-Zellen zeigen insgesamt eine deutlich geringere Beeinflussung des Zellzyklus durch HDACi. Dies könnte auf genetische Defekte in Zellzyklusregulatoren zurückzuführen sein, die in Urothelkarzinomzellen vorhanden sind, in normalen HBLAK-Zellen jedoch fehlen (Lee et al. 2010; Hoffmann et al. 2021).

4.5. HDACi induzieren DNA-Doppelstrangbrüche und reduzieren die Expression von Reparaturproteinen

Tumorzellen weisen häufig Defekte in den DNA-Reparaturwegen auf. Krebstherapien basieren in der Regel auf genotoxischen Ansätzen, die entweder direkt DNA-schädigend wirken oder den DNA-Stoffwechsel stören, was zu DSB und schließlich zum Zelltod führt (O'Connor 2015). Die Induktion von DSB durch HDACi wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Robert et al. 2016; Nikolova et al. 2017; Vollmer et al. 2023). Insbesondere die Hemmung von HDAC1/2 durch Inhibitoren oder Knockdown führt zu DSB und hemmt den DNA-Reparaturweg in Tumorzellen wie AML (Zhao et al. 2017), malignen Melanomen (Krumm et al. 2016) und Urothelkarzinomen (Thy et al. 2021).

Die Induktion von DSB führt zur Phosphorylierung von Histon H2AX, auch als γ H2AX bekannt, im umgebenden Chromatin. Daher kann ein Antikörper, der gegen γ H2AX gerichtet ist, effektiv eingesetzt werden, um die Ausmaße von DNA-Schäden zu messen. Jedoch führen auch andere Beschädigungen, wie eine blockierte Replikationsgabel, ebenfalls zur Aktivierung von H2AX. Jeder DSB hat also eine γ H2AX Aktivierung zur Folge, aber nicht alle γ H2AX-Foci sind zwangsweise durch DSB entstanden (Kuo und Yang 2008; Redon et al. 2010). Um eine präzisere Erkennung von DSB zu ermöglichen, wurde eine Doppelfärbung mit γ H2AX und 53BP1 durchgeführt. Dieser Ansatz wurde an den Urothelkarzinomzelllinien UM-UC-3 und J82 sowie an der benignen Zelllinie HBLAK angewandt.

Die HDACi behandelte UM-UC-3-Zelllinie zeigte insgesamt eine stärkere Anreicherung von γ H2AX mit einer gleichzeitigen Kolokalisation von 53BP1 im Vergleich zu J82. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber HDACi

zurückzuführen. Wie bereits in früheren Ergebnissen gezeigt wurde, ist J82 offenbar gegenüber HDACi, insbesondere Romidepsin und DDK122, gewissermaßen resistent. Im Vergleich zu UM-UC-3 führte YAK40 in J82-Zellen zu einer stärkeren Anreicherung von γ H2AX und 53BP1, was mit apoptotischen Effekten und Zellzyklusveränderungen korreliert. Ähnliche Anreicherungen von γ H2AX und 53BP1 unter HDACi-Behandlung wurden auch in Zellen des multiplen Myeloms (Maes et al. 2014), in NSCLC-Zellen (Wang et al. 2021) sowie in Fibroblasten-, Lungenkarzinom-Osteosarkom- und Gliomzellen (Johnson et al. 2021) beobachtet, mit oder ohne Kombinationsbehandlungen wie ionisierter Strahlung oder anderen Inhibitoren. Zellen mit einer Anreicherung von γ H2AX und 53BP1 zeigten stark vergrößerte Zellkerne. Aufgrund der DSB verbleiben diese Zellen in der G2/M-Phase und können die Mitose nicht abschließen, wodurch sie sich nicht in zwei Tochterzellen teilen können (Sunada et al. 2021; Chang et al. 2013).

In der benignen Zelllinie HBLAK wurden kaum Veränderungen sowohl in der Zellgröße als auch in den Anreicherungen von γ H2AX und 53BP1 beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die effiziente Reparatur von DSB in normalen Zellen sein, wie sie auch in anderen Studien berichtet wurde. Beispielsweise zeigten normale Fibroblastenzellen im Gegensatz zu Tumorzellen (Prostatakarzinom- und Lungenadenokarzinomzellen) die Fähigkeit, DSB unter Behandlung mit HDACi Vorinostat zu reparieren (Lee et al. 2010). Eine weitere mögliche Erklärung ist, wie bereits im vorherigen Kapitel diskutiert, dass DNA-Schäden in HBLAK-Zellen zu einem Übergang in einen seneszenzähnlichen Zustand führen, in dem das Reparatursystem nur in geringem Maße aktiviert wird.

Zusammengefasst stören HDACi die DSB-Reparatur in Tumorzellen (Wang und Zhao 2022; Fernandez et al. 2021) und steigern die Wirksamkeit anderer Therapieansätze, indem sie die Empfindlichkeit gegenüber den Chemotherapeutika erhöhen (Zhao et al. 2017). Diese Eigenschaften machen sie zu wichtigen Werkzeugen in der Krebstherapie.

Bei der Erkennung von DSB werden als Reaktion auf die DNA-Schädigung zelluläre Signalwege aktiviert, zu denen Chk1 und Chk2 gehören. Ihre Aktivierung durch Phosphorylierung führt zur Hemmung des Zellzyklus und ermöglicht so die Reparatur der DSB, um die genomische Integrität zu erhalten. Nach dem Nachweis von Zellzyklusarrest und DNA-Doppelstrangbrüchen in UCCs durch Behandlung mit HDACi wurde daher als nächster Schritt die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 untersucht. Chk1 wird vorwiegend durch die ATR-Kinase aktiviert, die besonders durch Einzelstrangbrüche zur geschädigten DNA rekrutiert wird. Chk1 fungiert als regulatorisches Element während der Replikation in der S-Phase und als Antwort auf DNA-Schäden in der G2-Phase (Zhang und Hunter 2013). Chk2 kann durch die Kinasen ATM und ATR als Reaktion auf

Doppelstrangbrüche phosphoryliert werden. Chk2 kann die Zelle an den Kontrollpunkten G1/S- oder G2/M in der Zellzyklusregulation stoppen (Zannini et al. 2014).

DDK122 und Romidepsin zeigten etwa gleich starke Wirkung auf die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 in UM-UC-3 Zellen, während KSK43 und YAK40 eine ausgeprägte Wirkung in der Zelllinie J82 hatten. Die Behandlung mit HDACi modulierten die Phosphorylierung von Chk1 in beiden Zelllinien nicht, führte aber zu einer Reduktion des Gesamtproteins Chk1. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Chk1 bzw. die ATR-Chk1-Achse in UCCs durch HDACi nicht aktiviert wird. Die Aktivierung der ATR-Chk1-Achse durch HDACi bleibt in UCCs möglicherweise aus, weil diese Inhibitoren entweder die Expression und Stabilität von Chk1 reduzieren (Kachhap et al. 2010) oder weil UCCs spezifische molekulare Eigenschaften besitzen könnten, die sie weniger abhängig von diesem Signalweg machen (Hoffmann et al. 2021). HDACi induzieren DSB in UCCs, wie durch die Phosphorylierung von Histon H2AX nachgewiesen wurde. Die DSB führen zur Aktivierung des ATM-Chk2-Signalwegs, jedoch nicht zur Aktivierung von ATR-Chk1.

In Bezug auf Chk2 führte die HDACi-Behandlung, besonders mit Romidepsin und DDK122 in UM-UC-3-Zellen, zu einer verstärkten Phosphorylierung von Chk2, ohne die Expression des Gesamtproteins Chk2 zu beeinflussen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die HDACi vor allem DSB verursachen, die letztlich zu einem G2/M-Arrest durch die Aktivierung von Chk2 führen. Weitere Folgen der Aktivierung von Chk2 als Reaktion auf Doppelstrangbrüche sind G1/S-Arrest und Seneszenz (Zannini et al. 2014). Diese Entwicklung konnte in behandelten HBLAK-Zellen beobachtet werden. Obwohl die Expression von Chk2 in HBLAK-Zellen in dieser Studie nicht explizit bestimmt wurde, konnte eine seneszenz-ähnliche Morphologie beobachtet und G1-Arrest in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nachgewiesen werden.

Obwohl beide Kinasen an der Reaktion auf DNA-Schäden beteiligt sind, gibt es derzeit keine spezifischen Studien, die zeigen, dass der Chk2-Signalweg bei UCCs stärker aktiviert ist als der Chk1-Signalweg, oder dass der Chk2-Signalweg stärker von HDACi beeinflusst wird. Weitere Forschung ist erforderlich, um die genauen Rollen und potenziellen therapeutischen Ziele von Chk1 und Chk2 bei UCCs vollständig zu verstehen.

Tritt eine DNA-Schädigung in der G2-Phase auf, stoppt Chk2 normalerweise den Zellzyklus an der G2/M-Grenze. Wird Chk2 jedoch unterdrückt, z.B. durch eine Chk2-Mutation, die in UCCs nicht selten ist (Bartkova et al. 2004), können Zellen mit DNA-Schäden in die Mitose eintreten. Dies führt zu fehlerhaften Spindelapparaten, Unregelmäßigkeiten im mitotischen Ablauf und Apoptose in der Metaphase. Letzteres wird als mitotische Katastrophe bezeichnet (Castedo und

Kroemer 2004). Diese Erscheinung könnten die Reaktionen von J82-Zellen auf verschiedene HDACi erklären. Die Chk2-Phosphorylierung in J82 war insbesondere durch KSK43 und YAK40 erhöht, was zu einer geringeren Rate an mitotischen Störungen im Vergleich zu Romidepsin und DDK122 führte. Effekte von HDACi auf die mitotische Katastrophe wurden auch in verschiedenen Tumorentitäten berichtet (Tomoyasu et al. 2019; Zhang et al. 2008; Cai et al. 2013).

Um zu überleben, können Zellen versuchen, Chk2 und Caspase zu unterdrücken und so die mitotische Katastrophe zu verhindern. Wichtig ist jedoch, dass die Unterdrückung der mitotischen Katastrophe die Teilung in drei oder mehr Tochterzellen begünstigen kann. Solche multipolaren Teilungen führen zu einer asymmetrischen Verteilung von Zytoplasma (Anisozytose), DNA (Anisokaryose) und Chromosomen (Aneuploidie) (Castedo et al. 2004). In dieser Studie wurde die asymmetrische Verteilung der Tochterzellen in UCCs durch DAPI-Färbung beobachtet. Dabei wurden verschiedene Kernveränderungen festgestellt, wie Mikronuklei, Lagging-Chromosomen, Mehrkernigkeit, Kernasymmetrie der Tochterzellen sowie die Bildung von Kern- und Zytoplasmabrücken. Im Gegensatz dazu wurden diese Phänomene in HBLAK-Zellen kaum beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Behandlung mit HDACi in diesen Zellen eine mitotische Katastrophe ausgelöst haben könnte.

4.6. HDACi führen zu Störungen in Genexpression

Nachdem die Wirkung der neuen HDACi auf Zelltod, Zellzyklusstörungen, DNA-Schäden und DNA-Reparatur nachgewiesen wurde, war es wichtig zu untersuchen, welche Gene daran beteiligt sein könnten. Zu diesem Zweck wurden Gene ausgewählt, die an der Regulation der DNA-Replikation und -Reparatur (*BCCIP*, *MCM2*, *MCM3*) sowie an der Mitose und Zytokinese (*PLK4*, *NCAPG*, *ESPL1*) beteiligt sind, und mittels RT-qPCR analysiert.

BCCIP kodiert für das BRCA2- und CDKN1A interagierende Protein, das als wichtiger Kofaktor für die Tumorsuppression von BRCA2 ist und die CDK2-Kinaseaktivität über p21 modulieren kann. Dieses Protein spielt möglicherweise eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden durch homologe Rekombination in Verbindung mit BRCA2 und unterstützt den Zellzyklusarrest (Meng et al. 2004). *MCM2* und *MCM3* sind Untereinheiten des MCM-Komplexes (*Minichromosome Maintenance*), der in eukaryotischen Zellen als Replikationshelikase fungiert. Die Beladung der DNA mit dem MCM-Komplex ist ein entscheidender Schritt bei der Initiation der Replikation (Rzechorzek et al. 2020). Die Ausschaltung von *MCM2* durch siRNA führte zu einem Zellzyklusarrest und zur Apoptose in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116. Darüber hinaus wurde

die Genexpression von *MCM2* durch Hemmung von Klasse I- und Klasse II- HDAC in HCT116 signifikant herunterreguliert (Liu et al. 2013). In der vorliegenden Studie fanden wir heraus, dass die 72-stündige Behandlung mit Romidepsin und den neuen HDACi keine Veränderung der relativen *BCCIP*-Expression in UM-UC-3 und J82 zeigte. Die Behandlung von UM-UC-3 Zellen mit Romidepsin und DDK122 führte zu einer signifikanten Expressionsreduktion von *MCM2* und *MCM3*. Im Gegensatz dazu wurde in der Zelllinie J82 nach Zugabe aller HDACi keine Veränderung in der Expression dieser beiden Gene beobachtet. Es scheint, dass die Wirkung von HDACi auf die Genexpression stark von der spezifischen Zelllinie abhängt, insgesamt waren die Expressionsveränderungen der Replikations-assoziierten Gene eher klein.

Neben den drei Genen, die für die DNA-Replikation und -Reparatur verantwortlich sind, wurden *PLK4*, *NCAPG* und *ESPL1* als essenzielle Gene in der Mitose und Cytokinese eingehend untersucht. *PLK4* ist in den Zentriolen lokalisiert und reguliert die Duplikation dieser Strukturen (Denu et al. 2019). Eine Überexpression von *PLK4* führt zu einer übermäßigen Vermehrung von Zentrosomen, während eine Ausschaltung von *PLK4* zu einem Verlust von Zentrosomen führt (Godinho et al. 2014). Das Gen *NCAPG* kodiert eine Untereinheit des Kondensinkomplexes, der für die Kondensation und Stabilisierung von Chromosomen während der Mitose und Meiose verantwortlich ist (Cai et al. 2022). *ESPL1* kodiert für die Cysteinprotease Separase, auch Separin genannt. Diese Protease spaltet Kohäsion während der Anaphase, was zur endgültigen Trennung der Schwesterchromatiden führt (Hauf et al. 2001). Im Rahmen der aktuellen Studie konnten wir nachweisen, dass HDACi einen signifikanten Einfluss auf die Expression dieser Gene ausüben. Romidepsin und DDK122 führten in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der *PLK4*-Expression, wobei Romidepsin einen stärkeren Effekt hatte. Die stärkste Wirkung auf das *ESPL1*-Gen wurde durch Romidepsin in J82 und UM-UC-3 beobachtet. Eine Reduktion des *NCAPG*-Gens wurde in UM-UC-3 Zellen nur nach Behandlung mit Romidepsin beobachtet.

Insgesamt zeigte DDK122 in beiden Zelllinien ein ähnliches Wirkungsprofil wie Romidepsin mit besonders ausgeprägten Effekten auf Mitose- und Zytokinese-regulierende Gene. KSK43 und YAK40 haben in der Zelllinie UM-UC-3 eine geringere Wirkung im Vergleich zu DDK122 und Romidepsin. In der Zelllinie J82 hingegen zeigten KSK43 und YAK40 andere Effekte im Vergleich zu DDK122 und Romidepsin, indem sie eine Erhöhung der Genexpression induzierten, während Romidepsin und DDK122 eine Verringerung der Genexpression bewirkten. Wie bereits erwähnt, könnte die unterschiedliche Wirkung der HDACi auf die Isoenzympezifität zurückzuführen sein. Romidepsin und DDK112 hemmen offenbar insbesondere HDAC der Klasse I, während die beiden anderen Substanzen eher auf andere HDAC-Klassen, vermutlich Klasse II, wirken.

Da HBLAK-Zellen eine intakte Zellzyklusregulation aufweisen, während diese Regulation in UCCs durch genomische Aberrationen gestört ist, erscheint es besonders interessant, die Veränderung der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Gene in HBLAK-Zellen weiter zu untersuchen.

4.7. Kombination von DDK122 und Cisplatin verstärkt die Apoptose in UM-UC-3

Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizierten DDK122 als die vielversprechendste Substanz für einen neuen Therapieansatz zur Behandlung des Urothelkarzinoms. In Vorarbeiten der AG konnte wiederholt bestätigt werden, dass die Kombinationsbehandlung mit HDACi und Agenzien wie z.B. Cisplatin synergistische Wirkung entfalten kann. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Kombination von Romidepsin und Cisplatin bei verschiedenen Urothelkarzinomzellen in bestimmten Substanzkonzentrationen synergistisch wirkt (Thy et al. 2021).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit an der Zelllinie UM-UC-3 die Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und DDK122 mittels Zellviabilitätstests untersucht. Im Konzentrationsbereich von $0,25 \times IC_{50}$ bis $2 \times IC_{50}$ konnte ein ausgeprägter synergistischer Effekt auf die Viabilitätsreduktion beobachtet werden. Der Synergieeffekt von DDK122 war somit stärker als für Romidespin. Eine solche Substanz zu identifizieren war das Hauptziel des Projekts. Die 50%ige Viabilität wurde bereits bei einer Konzentration von ca. $0,25 \times IC_{50}$ erreicht, was eine deutliche Reduktion der Substanzen ermöglicht. Durch eine Kombinationsbehandlung könnten somit die toxischen Effekte von Cisplatin auf normale Zellen umgangen werden. Diese Kombinationen könnte auch in Cisplatin-resistenten Zelllinien wirksam sein und so die Chemoresistenz beim Urothelkarzinom überwinden. DDK122 zeigt in der Kombinationstherapie mit Cisplatin eine potenziell bessere Wirkung als kommerzielle HDACi Romidepsin.

Da die zytotoxischen Effekte der Inhibitoren der HDAC Klasse I auf Störungen der Zellzyklusregulation und Caspase-abhängigem Zelltod beruhen, könnte die Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren, die an ATM/ATR oder Chk2/Chk1 angreifen, oder mit Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloiden und Taxanen, die auf die Mitose abzielen, ebenfalls von besonderem Interesse sein. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Kombination von HDACi mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Vincristin, Etoposid, Gemcitabin und Docetaxel die Apoptose in Tumorzellen verstärken kann (Fuino et al. 2003; Kim et al. 2003; Pauer et al. 2004).

4.8. Schlussfolgerung

Diese Arbeit konzentrierte sich auf zelluläre und molekulare Wirkmechanismen der neu entwickelten HDACi im Vergleich zum kommerziellen Romidepsin in UCCs. Durch Zellviabilitätstest wurden spezifische IC_{50} -Werte der jeweiligen Substanzen auf unterschiedlichen Zelllinien festgestellt. Die Top 3 Substanzen (DDK122, KSK43 und YAK40) wurden für tiefere Untersuchungen ausgewählt. Alle HDACi verursachten morphologische Veränderungen und hemmten die Proliferation stark. Die IC_{50} -Werte der neuen HDACi DDK122, KSK43 und YAK40 waren in den Urothelkarzinomzelllinien UM-UC-3, J82 und SW-1710 niedriger als in den benignen HBLAK-Zellen. Im Gegensatz dazu lag der IC_{50} -Wert von Romidepsin in HBLAK höher als die Werte in den UCCs. Die neuen HDACi haben also eine erhöhte tumorspezifische Wirksamkeit gegenüber den Urothelkarzinomzelllinien und eine geringere Toxizität gegenüber der benignen Urothelzelllinie HBLAK.

Die Zellzyklusprogression wurde durch alle HDACi beeinflusst. In Abhängigkeit von der Zelllinie führten sie in UM-UC-3 und J82 durch Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und Reduktion der Expression bestimmter Gene zu einem G2/M-Arrest und Caspase-assoziiertem programmierten Zelltod. In HBLAK-Zellen wurden dagegen keine derartigen Effekte beobachtet. Von den Top 3 HDACi zeigte DDK122 ähnlich starke Effekte wie Romidepsin in Bezug auf Zellzyklusarrest, Caspase-abhängige Apoptose, DNA-Schadensantwort und Genexpressionsveränderungen. Diese vergleichbare Wirkung könnte an einem ähnlichen Spezifitätsprofil beider Substanzen gegenüber den HDAC Isoenzymen liegen.

Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die neuen HDACi, insbesondere DDK122, eine verstärkte tumorspezifische Wirkung aufweisen und in Kombination mit Cisplatin synergistische Effekte entfalten. Damit stellen sie vielversprechende Kandidaten für eine neuartige Kombinationstherapie des Urothelkarzinoms dar.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Akman, B., & Erkek-Ozhan, S. (2022). *Urologic Cancers: Implications of Chromatin Modifier Mutations in Epigenetic Regulation of Bladder Cancer*. Brisbane (AU).
- Al Aboud, N.M., Tupper, C., & Jialal, I. (2023). *StatPearls: Genetics, Epigenetic Mechanism*. Treasure Island (FL).
- Alves Avelar, L.A., Schrenk, C., Sönnichsen, M., Hamacher, A., Hansen, F.K., Schliehe-Diecks, J., et al. (2021). Synergistic induction of apoptosis in resistant head and neck carcinoma and leukemia by alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 211, 113095.
- Asfaha, Y., Schrenk, C., Alves Avelar, L.A., Lange, F., Wang, C., Bandolik, J.J., et al. (2020). Novel alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors reverse cisplatin resistance in chemoresistant cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 28(1), 115108.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3(5), 421–429.
- Bartkova, J., Guldberg, P., Grønbaek, K., Koed, K., Primdahl, H., Møller, K., et al. (2004). Aberrations of the Chk2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer. *Oncogene*, 23(52), 8545–8551.
- Baylin, S.B., & Jones, P.A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9).
- Bhaskara, S., Chyla, B.J., Amann, J.M., Knutson, S.K., Cortez, D., Sun, Z.-W., et al. (2008). Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Molecular cell*, 30(1), 61–72.
- Bhaskara, S., Jacques, V., Rusche, J.R., Olson, E.N., Cairns, B.R., & Chandrasekharan, M.B. (2013). Histone deacetylases 1 and 2 maintain S-phase chromatin and DNA replication fork progression. *Epigenetics & chromatin*, 6(1), 27.
- Bolden, J.E., Peart, M.J., & Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(9), 769–784.
- Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., & Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, 26(37), 5468–5476.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424.
- Buckwalter, J.M., Chan, W., Shuman, L., Wildermuth, T., Ellis-Mohl, J., Walter, V., et al. (2019). Characterization of Histone Deacetylase Expression Within In Vitro and In Vivo Bladder Cancer Model Systems. *International journal of molecular sciences*, 20(10).
- Burgess, A., Ruefli, A., Beamish, H., Warrener, R., Saunders, N., Johnstone, R., et al. (2004). Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene*, 23(40), 6693–6701.

- Cai, B., Lyu, H., Huang, J., Wang, S., Lee, C.-K., Gao, C., et al. (2013). Combination of bendamustine and entinostat synergistically inhibits proliferation of multiple myeloma cells via induction of apoptosis and DNA damage response. *Cancer letters*, 335(2), 343–350.
- Cai, X., Gao, J., Shi, C., Guo, W.Z., Guo, D., & Zhang, S. (2022). The role of NCAPG in various of tumors. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 155, 113635.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–322.
- Castedo, M., & Kroemer, G. (2004). La catastrophe mitotique: un cas particulier d'apoptose. *Journal de la Societe de biologie*, 198(2), 97–103.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., et al. (2004). Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, 23(25), 4362–4370.
- Chang, H.-Y., Shih, M.-H., Huang, H.-C., Tsai, S.-R., Juan, H.-F., & Lee, S.-C. (2013). Middle infrared radiation induces G2/M cell cycle arrest in A549 lung cancer cells. *PloS one*, 8(1), e54117.
- Chang, P., Li, H., Hu, H., Li, Y., & Wang, T. (2021). The Role of HDAC6 in Autophagy and NLRP3 Inflammasome. *Frontiers in immunology*, 12, 763831.
- Chou, T.-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440–446.
- Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L., & Degrossi, F. (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Molecular biology of the cell*, 14(9), 3821–3833.
- Conti, C., Leo, E., Eichler, G.S., Sordet, O., Martin, M.M., Fan, A., et al. (2010). Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage. *Cancer research*, 70(11), 4470–4480.
- Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., & Waterhouse, N.J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016(11).
- Delpont, A., & Hewer, R. (2022). A superior loading control for the cellular thermal shift assay. *Scientific reports*, 12(1), 6672.
- Denu, R.A., Sass, M.M., Johnson, J.M., Potts, G.K., Choudhary, A., Coon, J.J., et al. (2019). Polo-like kinase 4 maintains centriolar satellite integrity by phosphorylation of centrosomal protein 131 (CEP131). *The Journal of biological chemistry*, 294(16), 6531–6549.
- Diedrich, D., Hamacher, A., Gertzen, C.G.W., Alves Avelar, L.A., Reiss, G.J., Kurz, T., et al. (2016). Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors. *Chemical Communications*, 52(15), 3219–3222.
- Dobrush, J., & Oszczudłowski, M. (2021). Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(8).
- Dokmanovic, M., Clarke, C., & Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research : MCR*, 5(10), 981–989.

- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International journal of molecular sciences*, 18(7).
- Fernandez, A., O'Leary, C., O'Byrne, K.J., Burgess, J., Richard, D.J., & Suraweera, A. (2021). Epigenetic Mechanisms in DNA Double Strand Break Repair: A Clinical Review. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 685440.
- Fuino, L., Bali, P., Wittmann, S., Donapaty, S., Guo, F., Yamaguchi, H., et al. (2003). Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Molecular cancer therapeutics*, 2(10), 971–984.
- Gabrielli, B., Chia, K., & Warrener, R. (2011). Finally, how histone deacetylase inhibitors disrupt mitosis! *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(16), 2658–2661.
- Gammoh, N., Du Lam, Puente, C., Ganley, I., Marks, P.A., & Jiang, X. (2012). Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6561–6565.
- Godinho, S.A., Picone, R., Burute, M., Dagher, R., Su, Y., Leung, C.T., et al. (2014). Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification. *Nature*, 510(7503), 167–171.
- Guo, G., Sun, X., Chen, C., Wu, S., Huang, P., Li, Z., et al. (2013). Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nature genetics*, 45(12), 1459–1463.
- Hans, F., & Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20(24), 3021–3027.
- Hattori, K., Takano, N., Kazama, H., Moriya, S., Miyake, K., Hiramoto, M., et al. (2021). Induction of synergistic non-apoptotic cell death by simultaneously targeting proteasomes with bortezomib and histone deacetylase 6 with ricolinostat in head and neck tumor cells. *Oncology letters*, 22(3), 680.
- Hauf, S., Waizenegger, I.C., & Peters, J.M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5533), 1320–1323.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., et al. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360.
- Ho, T.C.S., Chan, A.H.Y., & Ganesan, A. (2020). Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of medicinal chemistry*, 63(21), 12460–12484.
- 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).
- Hoffmann, M.J., & Schulz, W.A. (2021). Alterations of Chromatin Regulators in the Pathogenesis of Urinary Bladder Urothelial Carcinoma. *Cancers*, 13(23).

- 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.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., et al. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nature medicine*, 11(1), 71–76.
- Johnson, A.M., Bennett, P.V., Sanidad, K.Z., Hoang, A., Jardine, J.H., Keszenman, D.J., et al. (2021). Evaluation of Histone Deacetylase Inhibitors as Radiosensitizers for Proton and Light Ion Radiotherapy. *Frontiers in oncology*, 11, 735940.
- Jung, K.H., Noh, J.H., Kim, J.K., Eun, J.W., Bae, H.J., Chang, Y.G., et al. (2012). Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(2), 644–657.
- Kachhap, S.K., Rosmus, N., Collis, S.J., Kortenhorst, M.S.Q., Wissing, M.D., Hedayati, M., et al. (2010). Downregulation of Homologous Recombination DNA Repair Genes by HDAC Inhibition in Prostate Cancer Is Mediated through the E2F1 Transcription Factor. *PloS one*, 5(6).
- Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M.J., Jaguva Vasudevan, A.A., Wang, C., Hansen, F.K., et al. (2018). Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. *Clinical epigenetics*, 10(1), 100.
- Kelly, A.D., & Issa, J.-P.J. (2017). The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. *Current opinion in genetics & development*, 42, 68–77.
- Kiemeny, L.A., Witjes, J.A., Verbeek, A.L., Heijbroek, R.P., & Debruyne, F.M. (1993). The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *British journal of cancer*, 67(4), 806–812.
- Kim, M.S., Blake, M., Baek, J.H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., & Carrier, F. (2003). Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer research*, 63(21), 7291–7300.
- Krumm, A., Barckhausen, C., Küçük, P., Tomaszowski, K.-H., Loquai, C., Fahrner, J., et al. (2016). Enhanced Histone Deacetylase Activity in Malignant Melanoma Provokes RAD51 and FANCD2-Triggered Drug Resistance. *Cancer research*, 76(10), 3067–3077.
- Kubicek, S., Schirghuber, E., Klepsch, F., & Colinge, J. (2012). Epigenetik in der Onkologie. *Wiener klinisches Magazin*, 15(6), 10–18.
- Kuo, L.J., & Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, 22(3), 305–309.
- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M.C., Jones, P., Neddermann, P., et al. (2007). Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17335–17340.
- Lee, J.-H., Choy, M.L., Ngo, L., Foster, S.S., & Marks, P.A. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14639–14644.

- 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 : CR*, 33, 59.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2020). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf. Zugriffen: 3. April 2023.
- Lenis, A.T., Lec, P.M., Chamie, K., & Mshs, M.D. (2020). Bladder Cancer: A Review. *JAMA*, 324(19), 1980–1991.
- Lindl, T. (2000). *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl.
- Liu, D., Abbosh, P., Keliher, D., Reardon, B., Miao, D., Mouw, K., et al. (2017). Mutational patterns in chemotherapy resistant muscle-invasive bladder cancer. *Nature communications*, 8(1), 2193.
- Liu, Y., He, G., Wang, Y., Guan, X., Pang, X., & Zhang, B. (2013). MCM-2 is a therapeutic target of Trichostatin A in colon cancer cells. *Toxicology letters*, 221(1), 23–30.
- Liu, Y.-L., Yang, P.-M., Shun, C.-T., Wu, M.-S., Weng, J.-R., & Chen, C.-C. (2010). Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy*, 6(8), 1057–1065.
- Luo, Y., & Li, H. (2020). Structure-Based Inhibitor Discovery of Class I Histone Deacetylases (HDACs). *International journal of molecular sciences*, 21(22).
- Maes, K., Smedt, E. de, Lemaire, M., Raeve, H. de, Menu, E., van Valckenborgh, E., et al. (2014). The role of DNA damage and repair in decitabine-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncotarget*, 5(10), 3115–3129.
- Meng, X., Lu, H., & Shen, Z. (2004). BCCIP functions through p53 to regulate the expression of p21Waf1/Cip1. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(11), 1457–1462.
- Merighi, A., Gionchiglia, N., Granato, A., & Lossi, L. (2021). The Phosphorylated Form of the Histone H2AX (γ H2AX) in the Brain from Embryonic Life to Old Age. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23).
- Natarajan, U., Venkatesan, T., Radhakrishnan, V., Samuel, S., & Rathinavelu, A. (2018). Differential Mechanisms of Cell Death Induced by HDAC Inhibitor SAHA and MDM2 Inhibitor RG7388 in MCF-7 Cells. *Cells*, 8(1).
- Niegisch, G., Knievel, J., Koch, A., Hader, C., Fischer, U., Albers, P., et al. (2013). Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urologic oncology*, 31(8), 1770–1779.
- Nikolova, T., Kiweler, N., & Krämer, O.H. (2017). Interstrand Crosslink Repair as a Target for HDAC Inhibition. *Trends in pharmacological sciences*, 38(9), 822–836.
- Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2007). Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(7-8), 1367–1374.

- O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular cell*, 60(4), 547–560.
- Patel, V.G., Oh, W.K., & Galsky, M.D. (2020). Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(5), 404–423.
- Pauer, L.R., Olivares, J., Cunningham, C., Williams, A., Grove, W., Kraker, A., et al. (2004). Phase I study of oral CI-994 in combination with carboplatin and paclitaxel in the treatment of patients with advanced solid tumors. *Cancer investigation*, 22(6), 886–896.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M.J., Deenen, R., Köhrer, K., Arent, T., Schulz, W.A., et al. (2016a). Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*, 15(2), 299–312.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M.J., Kohlhof, H., Schulz, W.A., & Niegisch, G. (2016b). Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Targeted oncology*, 11(6), 783–798.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M.J., Schulz, W.A., & Niegisch, G. (2017). HDACs and HDAC Inhibitors in Urothelial Carcinoma - Perspectives for an Antineoplastic Treatment. *Current medicinal chemistry*, 24(37), 4151–4165.
- Porten, S.P. (2018). Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. *Current urology reports*, 19(12), 102.
- Porter, N.J., Osko, J.D., Diedrich, D., Kurz, T., Hooker, J.M., Hansen, F.K., et al. (2018). Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors and the Influence of Capping Groups on Hydroxamate-Zinc Denticity. *Journal of medicinal chemistry*, 61(17), 8054–8060.
- Promega Corporation (2023a). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay: Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573. Promega Corporation. https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=30e8ec640fdd4866b207e28c0cbc497c&sc_lang=en. Zugegriffen: 30. Mai 2024.
- Promega Corporation (2023b). Caspase-Glo® 3/7 Assay: Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093. Promega Corporation. https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?rev=1f820c7a060d4994a70245f7b858a0da&sc_lang=en. Zugegriffen: 30. Mai 2024.
- QIAGEN (2023). RNeasy® Mini Handbook. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. Zugegriffen: 30. Mai 2024.
- Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, D.P., Leonard, H., Parsons, P.G., & Gabrielli, B.G. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Molecular biology of the cell*, 11(6), 2069–2083.

- Redon, C.E., Nakamura, A.J., Zhang, Y., Ji, J., Bonner, W.M., Kinders, R., et al. (2010). Histone γ H2AX and Poly(ADP ribose) as Clinical Pharmacodynamic Biomarkers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(18), 4532–4542.
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3), 1458–1461.
- Robert, C., Nagaria, P.K., Pawar, N., Adewuyi, A., Gojo, I., Meyers, D.J., et al. (2016). Histone deacetylase inhibitors decrease NHEJ both by acetylation of repair factors and trapping of PARP1 at DNA double-strand breaks in chromatin. *Leukemia research*, 45, 14–23.
- Roos, W.P., & Krumm, A. (2016). The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair. *Nucleic acids research*, 44(21), 10017–10030.
- 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.
- Rzechorzek, N.J., Hardwick, S.W., Jatikusumo, V.A., Chirgadze, D.Y., & Pellegrini, L. (2020). CryoEM structures of human CMG-ATPyS-DNA and CMG-AND-1 complexes. *Nucleic acids research*, 48(12), 6980–6995.
- Sharan, R.N., Vaiphei, S.T., Nongrum, S., Keppen, J., & Ksoo, M. (2015). Consensus reference gene(s) for gene expression studies in human cancers: end of the tunnel visible? *Cellular oncology (Dordrecht)*, 38(6), 419–431.
- Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., & Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols*, 2(6), 1445–1457.
- Skowron, M.A., Melnikova, M., van Roermund, J.G.H., Romano, A., Albers, P., Thomale, J., et al. (2018). Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *International journal of molecular sciences*, 19(2).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Solta, A., Boettiger, K., Kovács, I., Lang, C., Megyesfalvi, Z., Ferk, F., et al. (2023). Entinostat Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Small Cell Lung Cancer Through S-phase Arrest and Decreased Base Excision Repair. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 29(22), 4644–4659.
- Stengel, K.R., & Hiebert, S.W. (2015). Class I HDACs Affect DNA Replication, Repair, and Chromatin Structure: Implications for Cancer Therapy. *Antioxidants & redox signaling*, 23(1), 51–65.
- Stenzel, K., Hamacher, A., Hansen, F.K., Gertzen, C.G.W., Senger, J., Marquardt, V., et al. (2017). Alkoxyurea-Based Histone Deacetylase Inhibitors Increase Cisplatin Potency in Chemoresistant Cancer Cell Lines. *Journal of medicinal chemistry*, 60(13), 5334–5348.

- Stepanenko, A.A., & Dmitrenko, V.V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203.
- Sunada, S., Saito, H., Zhang, D., Xu, Z., & Miki, Y. (2021). CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity. *Biochemical and biophysical research communications*, 550, 56–61.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Teoh, J.Y.-C., Huang, J., Ko, W.Y.-K., Lok, V., Choi, P., Ng, C.-F., et al. (2020). Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita. *European urology*, 78(6), 893–906.
- The Global Cancer Observatory (2024). Bladder.
<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/30-bladder-fact-sheet.pdf>. Zugriffen: 29. Mai 2024.
- Thompson, D., Lawrentschuk, N., & Bolton, D. (2023). New Approaches to Targeting Epigenetic Regulation in Bladder Cancer. *Cancers*, 15(6).
- Thy, S., Hommel, A., Meneceur, S., Bartkowiak, A.L., Schulz, W.A., Niegisch, G., et al. (2021). Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. *Cancers*, 13(6).
- Tomoyasu, C., Kikuchi, K., Kaneda, D., Yagyu, S., Miyachi, M., Tsuchiya, K., et al. (2019). OBP-801, a novel histone deacetylase inhibitor, induces M-phase arrest and apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. *Oncology reports*, 41(1), 643–649.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39–51.
- Vollmer, J., Ecker, J., Hielscher, T., Valinciute, G., Ridinger, J., Jamaladdin, N., et al. (2023). Class I HDAC inhibition reduces DNA damage repair capacity of MYC-amplified medulloblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*, 164(3), 617–632.
- Wang, X., & Zhao, J. (2022). Targeted Cancer Therapy Based on Acetylation and Deacetylation of Key Proteins Involved in Double-Strand Break Repair. *Cancer management and research*, 14, 259–271.
- Wang, Y., Liu, F., Fang, C., Xu, L., Chen, L., Xu, Z., et al. (2021). Combination of rapamycin and SAHA enhanced radiosensitization by inducing autophagy and acetylation in NSCLC. *Aging*, 13(14), 18223–18237.
- Warrener, R., Beamish, H., Burgess, A., Waterhouse, N.J., Giles, N., Fairlie, D., et al. (2003). Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), 1550–1552.
- West, A.C., & Johnstone, R.W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of clinical investigation*, 124(1), 30–39.

- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer letters*, 277(1), 8–21.
- Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(6), 442–457.
- Zhang, X.-H., Rao, M., Loprieato, J.A., Hong, J.A., Zhao, M., Chen, G.-Z., et al. (2008). Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer biology & therapy*, 7(9), 1388–1397.
- Zhang, Y., & Hunter, T. (2013). Roles of Chk1 in Cell Biology and Cancer Therapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 134(5).
- Zhao, J., Xie, C., Edwards, H., Wang, G., Taub, J.W., & Ge, Y. (2017). Histone deacetylases 1 and 2 cooperate in regulating BRCA1, CHK1, and RAD51 expression in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 8(4), 6319–6329.

Anhang

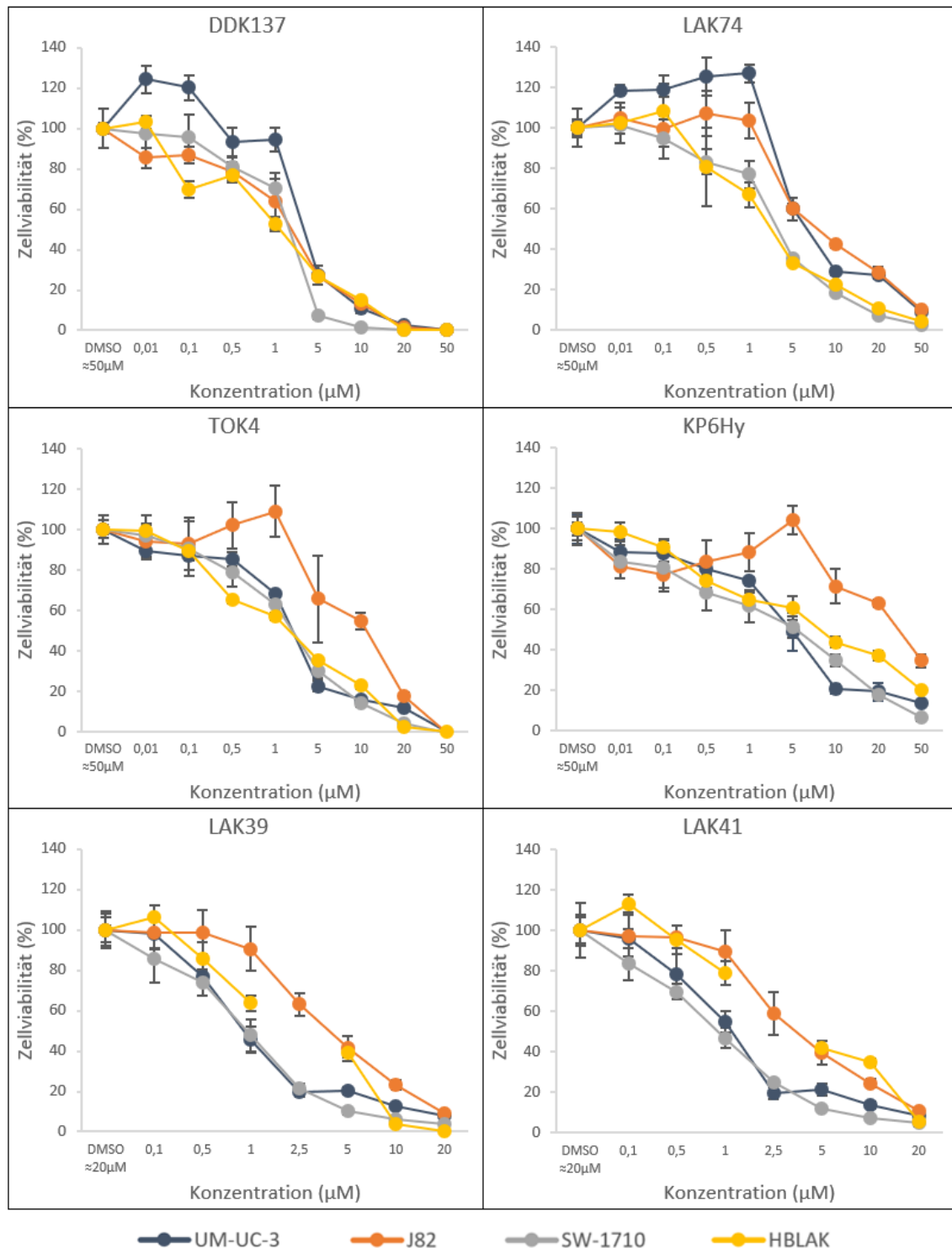
Anhang A: IC₅₀-Werte der HDACi auf UCCs nach 72h Behandlung mit Romidepsin (in nM) und mit den neuen HDACi (in µM).

HDACi	UM-UC-3	J82	SW-1710	HBLAK
LAK39	0,9	3,3	0,9	0,8
LAK41	1,0	3,0	0,8	1,6
KSK43	4,0	12,4	1,9	4,5
YAK40	1,2	4,2	0,9	5,2
TOK4	2,0	8,0	1,8	1,4
KP6Hy	2,1	13,6	1,7	2,3
LAK19	2,2	3,3	0,8	1,2
LAK74	4,5	5,9	2,4	1,6
DDK122	4,1	18,3	1,8	4,7
DDK137	1,9	1,7	1,5	1,1
Romidepsin	3,0	23,3	1,9	1,2

Anhang

Anhang B: Zellviabilität der UCCs nach 72h Behandlung mit HDACi.

Die Zellviabilität wurde in 4-facher Messung bestimmt und daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Auf der Y-Achse ist die Zellviabilität dargestellt, die zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (100%, als negative Kontrolle) normalisiert wurde.



Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen aufrichtigen Dank an alle Personen auszudrücken, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt und inspiriert haben.

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, die hervorragende Betreuung, die konstruktiven Ratschläge, den unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten und die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Arbeit. Ihre Betreuung hat mir den Freiraum für kreatives Denken gegeben, und ich bin dankbar für die wertvollen Einblicke durch ihre Expertise.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz danke ich für die Möglichkeit an seiner Forschung teilzunehmen, für die Bereitstellung der Testsubstanzen, die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und die Unterstützung beim wesentlichen Teil meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuerteam Christiane Hader und Dr. Sarah Meneceur, die mir nicht nur wertvolle Zeit und Fachwissen zur Verfügung gestellt haben, sondern auch konstruktive Kritik und hilfreiche Anregungen gegeben haben. Ihre unterschiedlichen Perspektiven haben meine Forschung bereichert.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Kollegin und beste Freundin, Hanin Khatib, die mir durch inspirierende Diskussionen und den Ideenaustausch geholfen hat, meine Gedanken zu schärfen und meine Arbeit zu verbessern. Sie stand nicht nur während der Promotion an meiner Seite, sondern auch während meines gesamten Studiums.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie für ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung in allen Phasen dieser Arbeit. Ihre Liebe und Geduld sind nicht nur ein Geschenk, sondern auch eine Quelle der Inspiration für meinen Erfolg.

Zuletzt, aber keineswegs am wenigsten, danke ich alle Kollegen und Kolleginnen des urologischen Forschungslabors und der AG Pharmazie, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben. Euer Fachwissen, eure moralische Unterstützung und eure Ermutigung haben mir Kraft gegeben.

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung dieser wunderbaren Menschen nicht möglich gewesen. Vielen Dank an jeden einzelnen von Euch für Eure Beiträge, die einen bleibenden Eindruck hinterlassen haben.