

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

Wirkung von CDK9-Inhibitoren einzeln und in Kombination mit dem
HDAC-Inhibitor Mocetinostat auf Urothelkarzinomzelllinien

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa Grote

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Matthias Kassack

„Lass dich nicht unterkriegen, sei frech und wild und wunderbar!“

- Astrid Lindgren

In der vorliegenden Arbeit wird darauf verzichtet, bei Personenbezeichnungen sowohl die männliche als auch die weibliche Form zu nennen. Die männliche Form gilt in allen Fällen, in denen dies nicht explizit ausgeschlossen wird, für beide Geschlechter.

In der vorliegenden Dissertation wurde eine KI-gestützte Software ausschließlich unterstützend zur sprachlichen Optimierung, insbesondere von Grammatik, Rechtschreibung und Satzbau, eingesetzt, ohne inhaltliche Arbeiten zu übernehmen.

Zusammenfassung

Aufgrund einer hohen Metastasierungsrate und eingeschränkter kurativer Behandlungsoptionen hat das muskelinvasiv wachsende Urothelkarzinom (UC) eine schlechte Prognose. Die Relevanz epigenetischer Veränderungen in neoplastischen Geschehen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies gilt auch für die Pathogenese von Urothelzellkarzinomen, da sich im Vergleich zu anderen Tumorentitäten viele Mutationen bzw. aberrante Expressionen von epigenetischen Regulatoren finden ließen. Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse I sind häufig überexprimiert im UC, was Veränderungen der Histonacetylierung nach sich zieht und sich global auf die Transkriptionsaktivität von Genen auswirkt. Daher sind solche HDACs ein beliebter Angriffspunkt in der Findung neuer Therapien mit HDAC-Inhibitoren (HDACi). Zu den HDACi der Klasse I gehört beispielsweise Mocetinostat. Erste klinische Studien mit dem HDACi Mocetinostat wurden jedoch aufgrund hoher Toxizität beendet. Eine weitere Möglichkeit, global die Gentranskription in Tumoren pharmakologisch zu remodellieren, sind selektive Inhibitoren von CDK9 (CDK9i), wie z.B. die Substanz LDC 000067. Diese stellen bereits in der Behandlung von anderen Malignitäten ein wichtiges Standbein dar. Im Rahmen der Entwicklung des neuen CDK9i MC 180295 konnte gleichzeitig eine epigenetische Wirksamkeit nachgewiesen werden, da CDK9 sich als wichtig für die Aufrechterhaltung der Heterochromatinstruktur erwies. Für das UC fehlen entsprechende Daten. Daher wurde zunächst in Urothelkarzinomzelllinien (UCC) die Häufigkeit von CDK9 überprüft. Anschließend erfolgte für die beiden UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1, sowie für die benigne uroepitheliale Kontrollzelllinie HBLAK, die Bestimmung der IC₅₀-Werte für alle drei Inhibitoren (Mocetinostat, MC 180295, LDC 000067). Anschließend wurde untersucht, ob eine kombinierte Therapie aus HDACi und CDK9i in UCCs synergistisch wirkt, was ggf. eine Reduktion der Dosierung zur Folge hätte und damit zu einer möglichen Reduktion der Toxizität führen könnte. In der Untersuchung der Kurzzeitproliferation ergab sich für die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 (UM-UC-3) sowie für Mocetinostat und LDC 000067 (VM-CUB-1, HBLAK) ein synergistischer Effekt. Die Langzeitproliferation wurde vor allem durch den HDACi Mocetinostat negativ beeinflusst, jedoch war ein synergistischer Effekt im Rahmen der Kombinationstherapie nicht auszuschließen. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Kombinationsbehandlung zu einer Zunahme der Zellzyklusdysregulation und zur Apoptoseinduktion führte. Mittels RNA-Sequenzierung nach Behandlung der UCCs und HBLAK mit jeweils einem der beiden CDK9i wurden differentiell exprimierte Gene bestimmt. Vor allem waren Gene betroffen, die an viralen Prozessen, an der Negativregulation antiapoptotischer Prozesse oder an immunologischen Prozessen beteiligt waren. Es konnte festgehalten werden, dass sich nach der kombinatorischen Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat und einem der beiden CDK9i MC 180295 bzw. LDC 000067 ein leichter synergistischer Effekt erkennen ließ, dieser jedoch als nicht ausreichend für eine intensivere Untersuchung dieses Kombinationsansatzes gedeutet wurde.

Summary

Due to high metastasis rate and limited curative treatment options, muscle-invasive urothelial carcinoma (UC) has a poorer prognosis. The relevance of epigenetic changes in neoplastic events has increased significantly in recent years. This also applies to the pathogenesis of urothelial cell carcinomas, as many mutations or aberrant expressions of epigenetic regulators have been found in comparison to other tumor entities. Class I histone deacetylases (HDACs) are frequently overexpressed in UC, which leads to changes in histone acetylation and has a global effect on the transcriptional activity of genes. Therefore, such HDACs are a favorite target in the discovery of new therapies with HDAC inhibitors (HDACi). Class I HDACs include mocetinostat, for example. However, initial clinical trials with mocetinostat were terminated due to its high toxicity. Another option for the global pharmacological remodelling of gene transcription in tumours are selective inhibitors of CDK9 (CDK9i), such as the substance LDC 000067. These inhibitors already represent an important pillar in the treatment of other malignancies. Epigenetic efficacy was also demonstrated during the development of the new CDK9i MC 180295, as CDK9 was found to be important for maintaining heterochromatin structure. However, there is a lack of corresponding data for UC. Therefore, the abundance of CDK9 was first tested in UC cell lines (UCCs). The IC₅₀ values for all three inhibitors (mocetinostat, MC 180295 and LDC 000067) were then determined for two UCCs (UM-UC-3 and VM-UCB-1) and the benign uroepithelial control cell line HBLAK. Subsequently, the potential for a combined HDACi and CDK9i therapy to have a synergistic effect in UCCs was investigated, which could result in a reduced dosage and thus potentially reduce toxicity. The study of short-term proliferation revealed a synergistic effect for mocetinostat and MC 180295 (UM-UC-3), as well as for mocetinostat and LDC 000067 (VM-UCB-1, HBLAK). Long-term proliferation was primarily influenced negatively by mocetinostat (HDACi), but a synergistic effect in the context of combination therapy could not be ruled out. Furthermore, it was found that the combination treatment induced an increase in cell cycle dysregulation and apoptosis. Differentially expressed genes were determined by RNA sequencing following the treatment of UCCs and HBLAK with one of two CDK9is. Genes involved in viral processes, the negative regulation of anti-apoptotic processes, and immunological processes were particularly affected. Following combinatorial treatment with the HDACi mocetinostat and one of the two CDK9i (MC 180295 or LDC 000067), a slight synergistic effect was observed. However, this was deemed insufficient for further investigation of this combination approach.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius	CoRest	Corepressor of RE1 silencing transcription factor 1 (Corepressor des RE1-Silencing-Transkriptionsfaktors 1)
µl	Mikroliter	CREBBP	CREB Binding Protein (CREB-bindendes Protein)
5mC	C5-Methyl-Cytosin	CRLF2	Cytokine Receptor Like Factor 2 (Zytokin-Rezeptor ähnlicher Faktor 2)
Abb.	Abbildung	CTD	C-terminale Domäne
AML	Akute myeloische Leukämie	C-Terminus	Carboxy-Terminus
APK/JNK	aktivierte Proteinkinase/c-Jun N-terminale Kinase	DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ATM-Kinase	Ataxia telangiectasia mutated kinase (Ataxia telangiectasia mutierte Kinase)	DMSO	Dimethylsulfoxid
ATP	Adenosintriphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BCA	Bicinchoninic Acid	DNMT	DNA-Methyltransferasen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B-Zell-Lymphom 2)	DSIF	DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) sensitivity inducing factor (5,6-Dichloro-1-beta-D-Ribofuranosylbenzimidazol sensitivitätssteigernder Faktor)
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum	DUSP4	Dual Specificity Phosphatase 4
BRG-1	Brahma-Related Gen 1 protein (Brahma-ähnliches Gen-1-Protein)	E2F	Heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus verschiedenen E2F- und DP-Untereinheiten bestehen
CaCl ₂	Calciumchlorid	EAU	European Association of Urology (Europäische Gesellschaft für Urologie)
CAF1	Chromatin Assembly Factor-1 (Chromatin-Assemblierungsfaktor 1)	EP300	Protein kodierendes Gen
CDK	Cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)	ESMO	European Society of Medical Oncology (Europäische Gesellschaft für medizinische Onkologie)
CDKi	Cyclin-dependent kinase inhibitor (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor)	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
CDT1	Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1 (Chromatin-Lizenzierungs- und DNA-Replikationsfaktor 1)		
CITED4	Cbp/P300 Interacting Transactivator with Glu/Asp Rich (Transaktivator mit Glu/Asp reichem Bereich, der Cbp/P300)		

FGFR-Inhibitor	Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Inhibitor)	MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1
		mg	Milligramm
g	Fallbeschleunigung in m/s^2 (Trägheitskraft pro Masse)	MgCl_2	Magnesiumchlorid
GDF15	Growth Differentiation Factor 15 (Wachstumsdifferenzierungsfaktor 15)	MGD0103	Mocetinostat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	MIBC	muscle invasive bladder cancer (muskelinvasiver Blasenkrebs)
GO-Gruppen-Analyse	Gene Ontology-Gruppen-Analyse	MiDAC	Mitotic Deacetylase Complex (mitotischer Deacetylase-Lomplex)
GSN	Gelsolin	MIER	MIER co-repressor scaffold proteins (MIER Co-Repressor-Gerüstproteine)
h	Stunde	ml	Milliliter
H19	H19 Imprinted Maternally	mM	Millimol
HAT	Histon-Acetyltransferase	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Hda1	Katalytische Untereinheit HDAC-Komplex Klasse II	NaCl	Natriumchlorid
HDAC	Histon-Deacetylase	NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid
HDACi	HDAC-Inhibitor	N-CoR-Komplex	Nuclear Receptor Corepressor-Komplex (Kernrezeptor-Corepressor-Komplex)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure	NELF	negative elongation factor
IC_{50}	halbmaximale inhibitorische Konzentration	NF- κB	nuclear factor “kappa- light-chain-enhancer” of activated B-cells (nuklearer Faktor „Kappa-Leichtketten-Enhancer“ aktivierter B-Zellen)
IFIT3	Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 3 (Interferon-induziertes Protein mit Tetratricopeptid-Wiederholungen 3)	NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Institut)
KCl	Kaliumchlorid	NMIBC	non-muscle invasive bladder cancer (nicht-muskelinvasiver Blasenkrebs)
kDa	Kilodalton	NSCLC	Non-small cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
KLF6	KLF Transcription Factor 6	N-Terminus	Amino-Terminus
LSD1	Lysine-specific demethylase 1 (Lysine-spezifische Demethylase 1)	NuRD	nucleosome remodeling and deacetylating complex (Komplex für Nukleosomenumbau und Deacetylierung)
MAPK/ERK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)/ Extracellular signal-regulated kinase (Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase)	p53	Tumorprotein p53

PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen	SIRT	Sirtuin
PARPi	Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen-Inhibitor	SMARCA	SWI/SNF Related BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit ATPase (SWI/SNF-ähnlicher BAF-Chromatinremodelierungskomplex, Untereinheit ATPase)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PBXIP1	PBX Homeobox Interacting Protein 1 (PBX Homeobox interagierendes Protein 1)	SMRT-Komplex	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptors-Komplex (stiller Mediator des Retinoid- und Schilddrüsenrezeptorkomplexes)
PD-L1	Programmed Death Ligand 1 (programmierter Zelltod-Ligand 1)		
PGPEP1	Pyroglutamyl-Peptidase 1	SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-fermentable (ATP-abhängiger Chromatin-Remodeling-Komplex)
pH	Potential des Wasserstoffs (pondus hydrogenii)		
PI	Propidiumiodid	Tab.	Tabelle
P-TEFb	positive-transcription elongation factor b (positiver Transkriptionsverlängerungsfaktor b)	TBS -T	Tris-buffered saline Puffer + Tween
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	TEMED	Tetramethylethylenediamin
Rdp3	reduced potassium dependency 3	TMEM173	Stimulator Of Interferon Response CGAMP Interactor 1 (Stimulator der Interferonantwort)
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassaypuffer	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
RNA	Ribonukleinsäure	T-Stadium	Tumorstadium
RNAPII	Ribonukleinsäure-Polymerase-II	TUR-B	transurethrale Resektion
Rpb1	RNAPII-Untereinheit B1	u.a.	unter anderem
S100A3	S100 Calcium Binding Protein A3 (S100-bindendes Protein A3)	UC	Urothelkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat	UCC	Urothelkarzinomzelllinie
s	Sekunde	UEC	Uroepithelzelllinie
Sin3A	SIN3 Transkriptionsregulator Homolog A	V	Volt
Sir 1-7	silent information regulator (stiller Informationsregulator)	vs.	versus
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure	z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Urothelkarzinom der Harnblase	1
1.2	Epigenetische Regulation	5
1.2.1	Histon-Deacetylasen.....	8
1.2.2	Klasse I HDACs	10
1.2.3	Klasse IV HDACs	11
1.3	Epigenetische Arzneimittel	11
1.3.1	HDAC-Inhibitoren + Angriffsziele in Urothelzellkarzinomen.....	12
1.3.2	Mocetinostat	14
1.4	Cyclin-abhängige Kinasen	15
1.4.1	Cyclin-abhängige Kinase 9.....	16
1.5	CDK9-Inhibitoren	18
1.5.1	MC 180295	19
1.5.2	LDC 000067	23
1.6	Zielsetzung	24
2	Material	25
2.1	Zelllinien	25
2.2	Chemikalien und Reagenzien	25
2.3	Molekularbiologische Kits	28
2.4	Puffer und Lösungen	28
2.4.1	Puffer und Lösungen zur Herstellung von Proteinlysaten.....	28
2.4.2	Puffer und Lösungen für Western Blots	28
2.4.3	Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen.....	29

2.4.4 Puffer und Lösungen für Annexin-V-PI-Tests	29
2.4.5 Puffer und Lösungen für BCA-Assays	29
2.5 Antikörper für Western Blots.....	30
2.6 Verbrauchsmaterialien	31
2.7 Geräte	32
2.8 Software	33
2.9 Datenbanken.....	34
3 Methoden.....	35
3.1 Zellkultur.....	35
3.1.1 Passage humaner Zelllinien	35
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	36
3.1.3 Aussaat im Well-Format	36
3.2 Funktionelle Zellkulturexperimente.....	36
3.2.1 Viabilitätsanalysen mittels MTT-Tests	36
3.2.2 Zellzyklusanalyse	38
3.2.3 Annexin-V-PI-Test.....	39
3.2.4 Klonogenitätstest	39
3.3 Analyse der Proteinexpression	40
3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	40
3.3.2 BCA-Proteinbestimmung	41
3.3.3 Western Blot	41
3.3.3.1 Zusammensetzung der Tris-Glycin Gele	42
3.3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tris-Glycin Gelen.....	43
3.3.3.3 Proteintransfer (Tris-Glycin Gel)	43
3.3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tris-Acetat-Gelen.....	44

3.3.3.5 Proteintransfer (Tris-Acetat Gel)	44
3.3.3.6 Proteindetektion	45
3.3.3.7 Stripping-Protokoll	45
3.4 RNA-Analyse	46
3.4.1 RNA-Extraktion	46
3.4.2 RNA-Sequenzierung.....	46
3.4.3 Auswertung der RNA-Sequenzierung	46
3.5 Statistik.....	47
3.5.1 Dosiswirkungskurven	47
4 Ergebnisse	48
4.1 Expression von CDK9 in verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien	48
4.2 Behandlung der UCCs und der UEC mit zwei CDK9i und einem HDACi.....	50
4.2.1 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC ₅₀)	50
4.2.2 Synergistische Effekte durch die gleichzeitige Inhibition von CDK9 und HDAC- Enzymen der Klasse I.....	54
4.3 Quantifizierung kombinatorischer Effekte auf die Proliferation der Zellen	57
4.3.1 Auswirkungen der Kombination auf die Kurzzeitproliferation der Zellen	57
4.3.2 Auswirkung der Kombination auf die Langzeitproliferation der Zellen	60
4.4 Einfluss des HDACi und der CDK9i auf den Zellzyklus	62
4.5 Einfluss der Inhibitoren allein und in Kombination auf die Apoptose-Induktion.....	65
4.5.1 Darstellung der Apoptose-Induktion mittels Annexin-V-PI-Test	65
4.5.2 Validierung der Apoptose-Induktion mittels PARP-Spaltung	70
4.5.3 Regulation antiapoptotischer Proteine nach HDAC- und CDK9-Inhibition.....	72
4.6 Proteinniveaus des Onkogens MYC	75

4.7 Einfluss der Inhibitor Kombination auf das Proteinniveau und die Aktivierung der RNA-Polymerase	76
4.8 Reaktivierung epigenetisch reprimierter Gene durch die Dephosphorylierung von BRG-1.....	78
4.9 RNA-Sequenzierung und Identifizierung von Veränderungen in der Regulation von Genen durch die Behandlung mit einem CDK9i.....	80
5 Diskussion.....	92
5.1 CDK9i – neuer epigenetischer Therapieansatz einzeln bzw. in Kombination mit dem bereits erprobten HDACi Mocetinostat?	92
5.2. Die Kombination aus CDK9i und dem HDACi Mocetinostat senkt die Viabilität der UCCs über die Zeit	94
5.3 Molekularer Effekt von CDK9i einzeln und in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat auf UCCs	96
5.3.1 Einfluss auf die Kurz- und Langzeitproliferation.....	96
5.3.2 Dysregulation des Zellzyklus	98
5.3.3 Induktion der Apoptose und Einfluss auf die Regulation antiapoptotischer Proteine durch CDK9- und HDAC-Inhibition	100
5.3.4 Einfluss der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf das Proteinniveau und die Aktivierung eng verbundener Proteine	104
5.3.5 Effekt der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf die globale Gen-Expression	106
5.4 Ausblick und mögliche Hindernisse für weitere Forschungsreihen.....	110
5.5 Fazit.....	112
6 Abbildungsverzeichnis	114
7 Tabellenverzeichnis	117

8	Literaturverzeichnis.....	118
9	Anhang	128
10	Danksagung.....	131
11	Eidesstattliche Erklärung	133

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

Das Urothelkarzinom der Harnblase gehört zu den häufigsten Malignomen weltweit (*Bray et al., 2022*). In Deutschland steht das Harnblasenkarzinom mit 4,8 % auf Platz 4 der häufigsten malignen Tumorerkrankungen des Mannes. Bei Frauen hingegen machen Malignitäten der Blase nur etwa 2,0 % aller malignen Tumorerkrankungen aus und finden sich somit an 13. Stelle. Insgesamt sind im Jahr 2020 in Deutschland ca. 17.130 Menschen (4.630 Frauen / 12.500 Männer) an einem Harnblasenkarzinom erkrankt. Zählt man die in situ-Tumoren und Neubildungen unsicheren oder unbekannten Verhaltens hinzu, sind 2020 insgesamt 47.940 Menschen erkrankt. Davon waren etwa 17.100 der Patienten von einem invasiv wachsenden Karzinom betroffen. 2020 waren 4.630 der Erkrankten Frauen, was gut ein Viertel der Gesamtanzahl beträgt. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Harnblasenkarzinomen für Männer bei durchschnittlich 75 Jahren, Frauen hingegen erkranken durchschnittlich 2 Jahre später (77 Jahre) (*Robert-Koch-Institut, www.krebsdaten.de*). Patienten, die an einem nicht-invasiven Harnblasenkarzinom erkranken, sind in der Regel jünger als Patienten, die an einem invasiven Harnblasenkarzinom erkranken. Dies ist unabhängig vom Geschlecht der Patienten (*Kraywinkel et al., 2018*).

Die Ätiologie der Harnblasenkarzinome ist gut erforscht und dient vor allem der Identifizierung von Risikofaktoren, die zur Entstehung von malignen Tumoren beitragen. Dadurch ist eine primäre Prävention z.B. durch Verzicht auf das Rauchen oder der Schutz gefährdeter Berufsgruppen durch Arbeitssicherheitsmaßnahmen möglich. Eine wichtige Rolle spielen karzinogene Substanzen wie aromatische Amine, welche beispielsweise in der Farbindustrie, der Gasproduktion oder der Textilindustrie einen wichtigen Risikofaktor darstellen. Die Aufnahme der karzinogenen Substanzen erfolgt meist exogen über den Gastrointestinaltrakt, die Haut und die Lunge (*Rübben, 6. Auflage, 2014*). Auch die Einnahme von bestimmten Medikamenten wie Chlornaphazin (Verwendung bis 1963), Phenacetin und Cyclophosphamid erhöht das Risiko der Entstehung von Harnblasenkarzinomen. Des Weiteren sind Zigarettenkonsum, chronische Entzündungen der Harnblase, das Vorhandensein von Fremdkörpern und Bestrahlungen eigenständige Risikofaktoren, die zu einem erhöhten Risiko für maligne Entartungen in der Harnblase führen (*Rübben, 6. Auflage, 2014*).

Die vom Urothel ausgehenden malignen Tumoren der Harnblase sind mit etwa 90 % die am häufigsten auftretende Morphologie. Hierbei wird generell zwischen einem muskelinvasiven, meist soliden, und einem nicht muskelinvasiven meist papillären Tumorwachstum unterschieden. 80 % dieser Tumoren weisen bei Erstdiagnose ein papilläres, oberflächliches Wachstum auf. Im Verlauf kommt es bei 10-15 % dieser Patienten zur Tumorprogression und einem damit einhergehenden muskelinvasiven Tumorwachstum. Hingegen besteht bei 20 % der Patienten bereits bei Erstdiagnose ein muskelinvasives Wachstum, welches mit einer erheblich schlechteren Prognose einhergeht. Bei etwa 10 % der Patienten mit einem Blasenkarzinom finden sich primäre Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome sowie weitere seltene nicht-urotheliale Tumorentitäten (*Rübben, 6. Auflage, 2014*).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate der invasiven Harnblasenkarzinome lag im Jahr 2020 bei 46 % für Frauen und 58 % für Männer (*Robert-Koch-Institut, www.krebsdaten.de*). Frauen erkranken im Durchschnitt deutlich seltener als Männer, weisen jedoch eine schlechtere Prognose aufgrund fortgeschrittener Tumorstadien bei meist späterer Diagnosestellung auf (*Doshi et al., 2023*).

Zur Diagnosestellung können verschiedene klinische Zeichen und Befunde herangezogen werden. Der Verdacht auf ein malignes Geschehen der Harnblase kann durch das Vorliegen einer Mikrohämaturie, einer schmerzlosen Makrohämaturie, einer positiven Urinzytologie sowie unspezifischen Symptomen wie Dysurie, Pollakisurie oder einer Drangsymptomatik begründet werden. Zur weiteren Abklärung, bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom, wird eine (Urethro-) Zystoskopie durchgeführt. Ergänzt werden kann diese Untersuchung durch eine Sonografie der Harnblase und der Nieren sowie eine Urinzytologie. Zu den weiteren Maßnahmen in der klinischen Routine dienen schnittbildgebende Verfahren (Computertomographie, Magnetresonanztomographie) (*S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, März 2025*).

Die Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase richtet sich nach Wachstum und Invasivität des Malignoms. Bei Vorliegen eines nicht-muskelinvasiven Karzinoms der Harnblase (non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) steht neben der Vermeidung eines Rezidivs der Funktionserhalt der Harnblase im Vordergrund. Zur Entfernung des Harnblasenkarzinoms wird eine transurethrale Resektion durchgeführt (TUR-B), ggf. wird diese je nach Indikation nach 2-6 Wochen wiederholt (*S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, März 2025*). Zur Verminderung von Rezidiven und einer

Progression zu einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (muscle invasive bladder cancer, MIBC) werden je nach individuellem Risikoprofil adjuvante Instillationstherapien eingesetzt. Die Therapie des MIBC ist neben dem lokalen Tumorstadium (T-Stadium) abhängig von der Tumorausbreitung (Abb. 1), den lokoregionären Lymphknoten bzw. dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Verschiedene Behandlungsoptionen, wie beispielsweise eine radikale Zystektomie, TUR-B, Strahlentherapie, Harnblasenteilresektion, multimodale Therapiekonzepte zur Organerhaltung sowie eine systemische Chemotherapie, werden individuell für jeden Patienten geprüft (*S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, März 2025*). Bei einer lokal begrenzten Erkrankung ohne Fernmetastasen kann das Überleben des Patienten durch eine Chemotherapie als Teil der primären Therapie verbessert werden. Empfohlen wird eine platinbasierte neoadjuvante Chemotherapie vor einer radikalen Zystektomie. Abhängig vom histologischen Befund können nach dem Eingriff zusätzlich adjuvante Immuntherapien eingesetzt werden. Ist eine Zystektomie ohne neoadjuvante Chemotherapie erfolgt, kommen stadienabhängig ebenfalls platinbasierte Chemotherapien oder Immuntherapien zum Einsatz (*S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, März 2025*).

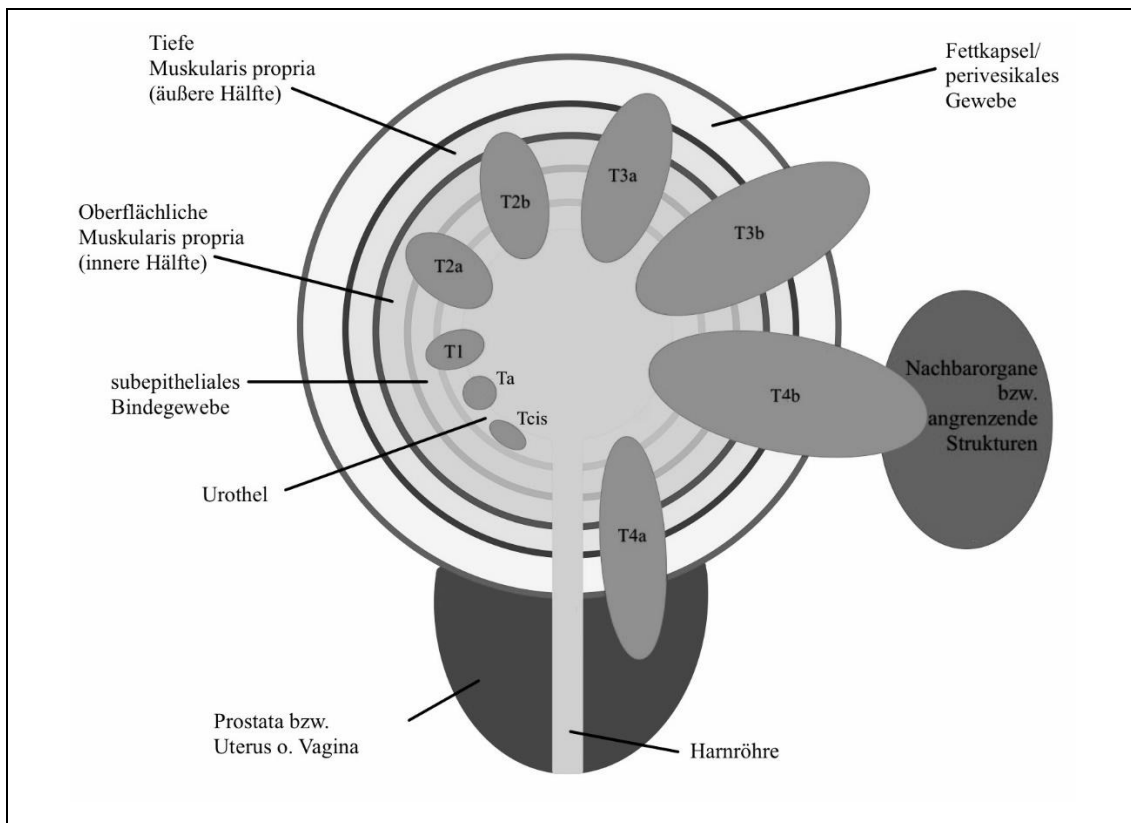


Abb. 1: Darstellung der Klassifikation anhand der Tumorgroße

„TcIS = Carinoma in situ, Ta = nicht muskelinvasives papilläres Karzinom, T1 = Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein, T2a = Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte), T2b = Tumor dringt tief in Muskularis propria ein (äußere Hälfte), T3a = Tumor dringt mikroskopisch in perivesikales Gewebe ein, T3b = Tumor dringt makroskopisch in perivesikales Gewebe ein, T4a = Tumor dringt in Prostata, Samenbläschen, Uterus oder Vagina ein, T4b = Tumor dringt in Beckenwand oder Abdominalwand ein“ (S3-Leitlinie, März 2025, Seite 62).

Abbildung eigenständig erstellt. Modifiziert nach der Abbildung der österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie – Arbeitskreis urologische Onkologie (AUO).

Während in den letzten Jahrzehnten der Einsatz von platinbasierten Chemotherapien bei einem metastasierten oder nicht operablen Urothelkarzinom den Therapiestandard darstellte, hat sich die Behandlung dieser Patienten im Jahr 2024 grundlegend geändert. Ursache hierfür sind die positiven Daten der EV-302-Studie (*Powles et al., 2024*). In dieser klinischen Studie zeigte sich der Einsatz einer Kombinationsbehandlung mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab sowie dem Antikörper-Wirkstoffkonjugat Entortumab-Vedotin gegenüber einer platinbasierten Chemotherapie hinsichtlich des

Tumoransprechens sowie des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens deutlich überlegen und stellt somit den neuen Therapiestandard dar. Diesem Paradigmenwechsel tragen die europäischen Leitlinien der ESMO (European Society of Medical Oncology) sowie der EAU (European Association of Urology) bereits Rechnung (*ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up, 2021*; *EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer, 2024*). Neben dieser Kombinationstherapie kommen in der Behandlung des metastasierten Urothelkarzinoms weiterhin andere Immuncheckpoint-Inhibitoren, Chemotherapeutika, Kombinationen dieser Substanzen sowie bei bestimmten Patienten auch zielgerichtete Therapien mit FGFR-Inhibitoren zum Einsatz.

Trotz dieser Fortschritte in der Behandlung metastasierter Patienten ist die Prognose in diesem Krankheitsstadium schlecht. Eine langfristige Tumorkontrolle ist nur in Einzelfällen möglich und auch nach Einsatz von Enfortumab-Vedotin und Pembrolizumab verstirbt die Hälfte der Betroffenen innerhalb der ersten 32 Monate nach Diagnosestellung (*S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom, März 2025*).

1.2 Epigenetische Regulation

Unter Epigenetik versteht man stabile, vererbare Muster der Genexpression, welche nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz erklärt werden. Vielmehr können epigenetische Mechanismen durch chemische Modifikationen der DNA oder der an sie gebundenen Struktur- und Regulatorproteine erklärt werden (*Felsenfeld et al., 2014*). Eine wichtige Rolle spielen dabei auch diverse Umweltfaktoren (*Lu et al., 2013*). Es besteht die allgemeine Annahme, dass epigenetische Prozesse weniger auf der Ebene der Translation als auf der Ebene der Transkription die Genexpression steuern. Zu diesen epigenetischen Prozessen gehören die DNA-Methylierung, die Histonmodifikation und nicht-kodierende RNAs, die hauptsächlich auf Ebene der Transkription die Genexpression beeinflussen (*Gibney & Nolan et al., 2010*). Die DNA-Methylierung führt dazu, dass Gene stillgelegt werden und eine weitere Transkription dieser Gene pausiert wird. Meist findet diese Methylierung am Promoter statt. Die Methylierung erfolgt über die DNA-Methyltransferasen (DNMTs), welche sich entsprechend ihrer katalytischen Eigenschaften unterscheiden: DNMT1, DNMT2, DNMT3. DNMTs erzeugen durch den Einbau einer Methylgruppe an der C5-Position des Cytosins ein C5-Methyl-Cytosin

(5mC). Die DNA-Methylierung findet innerhalb einer CpG-Dinukleotidsequenz statt (*Razin & Riggs, 1980; Almouzni & Cedar, 2016; Greger et al., 1994*). Histonmodifikationen stellen einen weiteren wichtigen epigenetischen Mechanismus dar. Dazu gehören unter anderem die Acetylierung und Deacetylierung der Histone sowie die Histon-Methylierung und die posttranslationalen Histonmodifikationen (*Peixoto et al., 2020*). Die Histon-Acetyltransferasen katalysieren die Acetylierung von Lysinresten. Durch die Veränderung von Spannungsverhältnissen zwischen den beteiligten Strukturen kommt es zu einer Lockerung des Chromatins. Durch diese Lockerung wird die Transkription der betroffenen Genabschnitte gefördert. Um ein Gleichgewicht zwischen Transkription und ruhenden Genen zu erreichen, gibt es Histon-Deacetylasen, welche die Acetylgruppen entfernen und so für eine Kondensation des Chromatins sorgen, was die Transkription verhindert (*Gong & Miller, 2013*). Auch nicht kodierende RNAs rücken zunehmend weiter in den Fokus der Wissenschaft. Es gibt bereits Veröffentlichungen, die davon ausgehen, dass diese an der Genregulation beteiligt sind und mit anderen nicht-kodierenden RNAs interagieren (*Peixoto et al., 2020*). Trotzdem sind auch Mechanismen, bei denen die DNA bzw. der genetische Code in Protein-Sequenzen umgeschrieben werden, nicht nur abhängig von der Sequenz selbst, sondern auch von komplexen Regulationssystemen, welche ein Zusammenspiel aus genetischen Faktoren und Umweltfaktoren darstellen. Somit ergibt sich ein plausibler Zusammenhang zwischen verschiedenen Umwelteinflüssen und dem Auftreten bzw. der Entwicklung verschiedener Erkrankungen (*Lu et al., 2013*). Die relevante Verbindung zwischen Genetik und Epigenetik in verschiedenen Krebserkrankungen zeigt sich in der Veränderung des Stoffwechsels und bestimmter biochemischer Wege sowie durch Mutationen in Genen, welche für relevante epigenetisch wirksame Proteine kodieren (*Ilango et al., 2020*). Ein Beispiel dafür sind sowohl genetische als auch epigenetische Mutationen in Genen, die für Onko- oder Tumorsuppressorproteine kodieren. Diese Proteine steuern weitere Prozesse, wie beispielsweise die Zelltransformation, das Tumorstadium und die Metastasierung, welche entscheidende Säulen der Krebsentstehung darstellen (*Furtado et al., 2019*).

In den letzten Jahren ergab sich eine zunehmende Relevanz für Mutationen in epigenetischen Regulatoren in Hinblick auf die Entstehung frühesten Stadien von Neoplasien. Somit wurde diese zu einem entscheidenden Forschungsschwerpunkt in Hinblick auf die Entwicklung neuartiger und gezielter medikamentöser Therapien für bestimmte maligne Tumoren (*Furtado et al., 2019; Ilango et al., 2020*). Besonders

interessant und nicht minder wichtig ist dabei die dynamische und reversible Natur epigenetischer Veränderungen. Somit stellt die Möglichkeit, das Epigenom umzuprogrammieren bzw. zu verändern, eine neue und vielversprechende therapeutische Strategie dar (*Furtado et al., 2019*).

Epigenetische Veränderungen tragen insbesondere zur Pathogenese von Urothelkarzinomen bei. Analysen zeigen, dass sich im Vergleich zu anderen Tumorentitäten in Urothelkarzinomen die meisten Mutationen in regulatorischen epigenetischen Proteinen nachweisen lassen (*Guo et al., 2013; Niegisch et al., 2015*). Bestimmte epigenetische Modifikationen, wie die DNA-Hypermethylierung und nicht-kodierende RNAs, gehen histopathologischen Veränderungen voraus. Daher wären diese prinzipiell als diagnostische und therapeutische Marker nutzbar (*Han et al., 2012*). Ein höherer Grad und eine gesteigerte Intensität der DNA-Methylierung konnten z.B. bei invasiv wachsenden Harnblasenkarzinomen gegenüber nicht invasiv wachsenden Harnblasenkarzinomen festgestellt werden (*Porten, 2018*). Auch andere epigenetische Faktoren, wie die Histon-Modifikation, gewinnen zunehmend an Bedeutung. Die Histonmodifikation ist in Urothelkarzinomen häufig dysreguliert (*Schulz et al., 2015*). Zudem könnten diese epigenetischen Veränderungen in Urothelzellkarzinomen als Angriffspunkt für neue epigenetische Therapien genutzt werden (*Han et al., 2012*). Insbesondere die epigenetisch bedingten Veränderungen des Chromatins und die Modifikation der Histone stellen attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Therapieoptionen dar und wurden bereits in einzelnen Studien untersucht (z.B. *Grivas et al., 2018*). Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Untersuchung epigenetischer Dysregulationen in Urothelkarzinomen zu einem besseren Verständnis hinsichtlich der Pathogenese dieser Erkrankung führt. Ziel weiterer Untersuchungen ist die Identifizierung klinisch relevanter Biomarker und therapeutischer Zielstrukturen, die relevant für die Diagnose, Behandlung und Prognose von Harnblasenkarzinomen sind (*Porten et al., 2018*).

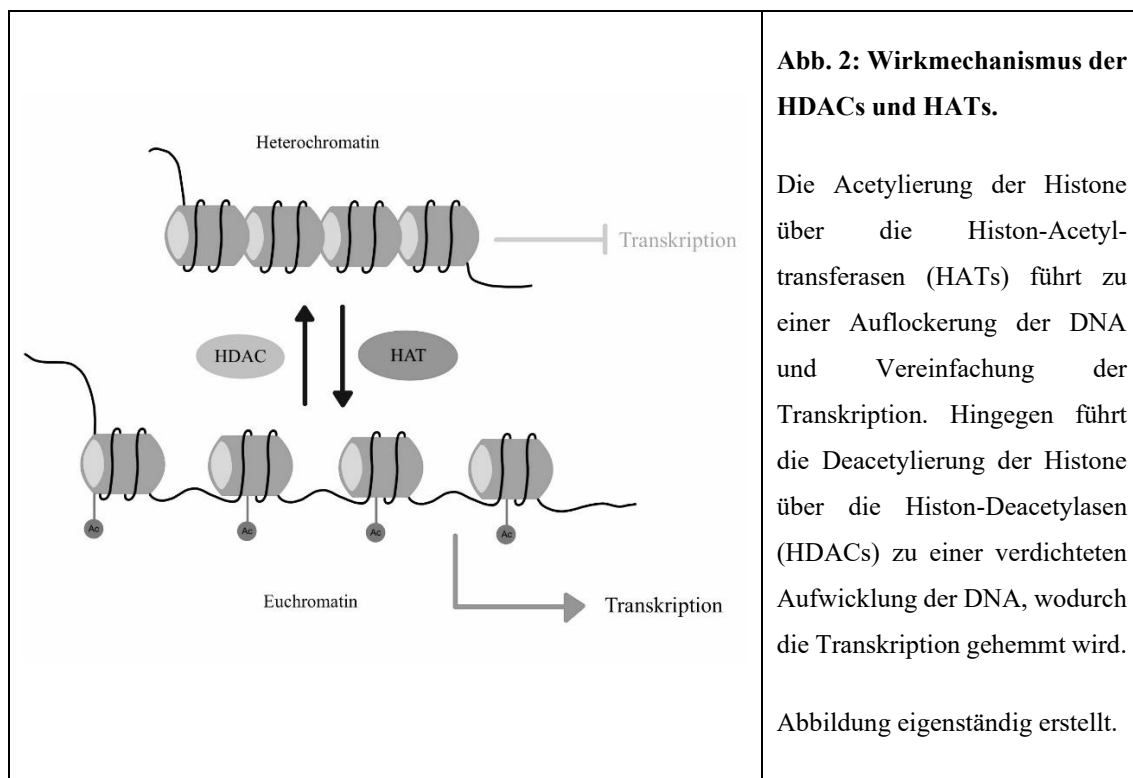
Im Folgenden werden gewisse Inhalte detaillierter thematisiert, die Grundlage der aufgestellten Hypothese sowie der durchgeführten Experimente sind. Hierbei wird zunächst der Fokus auf die beiden verwendeten Inhibitor-Gruppen und deren relevante Grundlagen gelegt.

1.2.1 Histon-Deacetylasen

Die Regulation der Transkription in eukaryotischen Zellen wird auf Ebene des Chromatins stark durch die posttranslationale Modifikation von Histonen beeinflusst. Hierbei sind insbesondere die Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung der Histone von Bedeutung (*de Ruijter et al., 2003*).

Eine vermehrte Expression bestimmter Gene lässt sich durch eine Acetylierung der Histone erklären. Dementsprechend führt eine Deacetylierung zu einer reduzierten Expression dieser Gene (*Grivas et al., 2018*) (Abb. 2). Mittlerweile ließen sich mehrere große Enzymkomplexe, bestehend aus mehreren Untereinheiten, beschreiben, welche eine gezielte Deacetylierung von Histonen herbeiführen. Dieser Enzymkomplex setzt sich aus den sogenannten Histon-Deacetylasen (HDAC), sowie weiteren Proteinen, die für die Rekrutierung, die Co-Repression oder den Chromatinumbau zuständig sind, zusammen (*de Ruijter et al., 2003*) (Abb. 2). Insgesamt wurden 18 verschiedene HDACs im menschlichen Organismus beschrieben, welche sich auf Grundlage der Sequenzähnlichkeit zu den Hefe-Orthologen Rdp3 (reduced potassium dependency 3), Hda1 (Katalytische Untereinheit HDAC-Komplex Klasse II) und Sir2 (silent information regulator) und entsprechend ihrer intrazellulären Lokalisation (zytoplasmatisch vs. intranukleär vs. beides) in vier Klassen unterteilen lassen (*Clocchiatti et al., 2011; Ho & Chan et al., 2020; Seto & Yoshida et al., 2014*). Zur Klasse I gehören HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 und HDAC 8, welche vorwiegend im Zellkern vorkommen und Homologien mit Rpd3 aufweisen. Sie sind Teil eines Komplexes, welcher an der Regulation der Transkription beteiligt ist, da diese HDACs im Wesentlichen die Deacetylierung an Histonschwänzen vermitteln. Eine Ausnahme stellt HDAC 8 dar. Die Klasse IIa setzt sich aus HDAC 4, HDAC 5, HDAC 7 und HDAC 9 zusammen. Diese kommen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vor. Für die Regulation der Transkription sind die HDACs der Klasse IIa auf eine Komplexbildung mit anderen Proteinen angewiesen. Im Zytoplasma sind sie teilweise an der posttranskriptionellen Proteinmodifikation beteiligt. HDAC 6 und HDAC 10 sind Teil der Klasse IIb und kommen vor allem im Zytoplasma sowie panzellulär vor. Eine Homologie mit Hda1 lässt sich bei beiden Subgruppen der Klasse II finden. Sie agieren meist unabhängig von anderen Proteinen und sind vorrangig an der posttranskriptionellen Proteinmodifikation beteiligt, können jedoch auch Teil der Transkriptionsregulation sein. Die Klasse III umfasst Proteine, die mit Sir2 in der Hefe homolog sind. Zu diesen Proteinen gehören SIRT1-7 (silent information regulator),

welche in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, einschließlich Mitochondrien, zu finden sind. HDAC 11 weist Ähnlichkeiten in der Sequenz mit den Klassen I und II auf und bildet damit die Klasse IV (Clocchiatti et al., 2011; Ho & Chan et al., 2020; Haberland et al., 2011). Des Weiteren lassen sich HDACs auch funktional klassifizieren. Hierbei unterscheidet man zwei große Gruppen: einerseits die Zink-abhängigen (Klasse I, II und IV) und andererseits die NAD^+ -abhängigen (Klasse III) Familien (Yoshida et al., 2017). Verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Funktion, beispielsweise Rekrutierung oder Chromatinumbau, sind an der Bildung eines Komplexes mit verschiedenen HDACs beteiligt (de Ruijter et al., 2003). Die Rekrutierung zu ihren entsprechenden Zielgenen erfolgt über ihren direkten Zusammenschluss mit Transkriptionsaktivatoren oder Transkriptionsrepressoren sowie über die Einbindung in große Multiprotein-Transkriptionskomplexe (Haberland et al., 2009). Die HDAC-Klassen I, II und IV gehören der übergeordneten Familie der Arginase/Deacetylase-Proteine an. Dazu gehören die Arginase-ähnlichen Amidino-Hydrolasen sowie die Histon-Deacetylasen (Seto & Yoshida et al., 2014).



Eine Dysregulation der Histonacetylierung kann durch die erhöhte Aktivität der HDACs und/oder eine genetische Inaktivierung der Histon-Acetyltransferasen (HATs) erreicht werden. Dadurch werden beispielsweise Tumorsuppressorgene oder andere wichtige

Gene stillgelegt (*Grivas et al., 2018*) (Abb. 2). Veränderte Histonmodifikationen, insbesondere die Dysregulation der Histon-Acetylierung, werden mit der Entstehung verschiedener Krebsarten, einschließlich der des Urothelkarzinoms, in Verbindung gebracht (*Grivas et al., 2018*).

Im weiteren Verlauf werden die Klasse I HDACs und die Klasse IV HDACs nochmal detailliert beschrieben. Diese HDACs sind wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit, da sie unter anderem als Zielstrukturen für die verwendeten Inhibitoren dienen.

1.2.2 Klasse I HDACs

Die vorwiegend im Zellkern vorkommenden und ubiquitär exprimierten HDACs der Klasse I setzen sich aus HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 und HDAC 8 zusammen (*Clocchiatti et al., 2011*). Detailliertere Untersuchungen gehen davon aus, dass alle vier HDACs der Klasse I auch im Zytoplasma oder in speziellen Zellorganellen lokalisiert sein können (*Seto & Yoshida et al., 2014*). Sie weisen eine hohe enzymatische Affinität gegenüber Histonsubstraten auf. Die eher einfache Struktur der HDACs der Klasse I besteht aus einer konservierten Deacetylase-Domäne mit kurzen Amino- und Carboxy-terminalen Domänen (*Haberland et al., 2009*).

Die strukturell nahezu identischen HDACs 1 und 2 kommen vorwiegend im Zellkern als Homo- und Heterodimer-Bestandteile der NuRD (nucleosome remodeling and deacetylating complex), CoREST (corepressor of RE1 silencing transcription factor 1), MIER (MIER co-repressor scaffold proteins), Sin3A (SIN3 Transkriptionsregulator Homolog A) und MiDAC (Mitotic Deacetylase Complex) Transkriptions-Repressor-Komplexe vor (*Wang et al., 2023*). Beide sind Teil unterschiedlichster epigenetischer Prozesse. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Deacetylierung von Histonen und der damit verbundenen Abnahme der Genexpression (*Grivas et al., 2018; Haberland et al., 2009*). Zusätzlich deacetylieren HDAC 1 und HDAC 2 Kernproteine, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem p53 (Tumorprotein p53), E2F (heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus verschiedenen E2F- und DP-Untereinheiten bestehen), ATM-Kinase (Ataxia telangiectasia mutated kinase) und CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1). Zusätzlich besteht eine Wechselwirkung zu anderen epigenetischen Prozessen, wie beispielsweise der

Methylierung, da sowohl DNMT1 als auch LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) zu ihren Substraten gehören (*Ho & Chan et al., 2020*). HDAC 1 zeigt eine typische Histon-Deacetylase-Aktivität. HDAC 2 wird als Corepressor an die DNA rekrutiert und sorgt für eine Herunterregulation der Transkription. Auch HDAC 3 unterdrückt die Transkription. Dieses wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise vom N-CoR-/SMRT-Komplex, rekrutiert und als Untereinheit gebunden. Mit diesen Eigenschaften ähnelt es stark HDAC 1 und 2 (*Seto & Yoshida et al., 2014; Haberland et al., 2009*). Von allen HDACs der Klasse I weist HDAC 8 die größte Ähnlichkeit mit HDAC 3 auf und ist die einzige Isoform für die das Gen auf dem X-Chromosom liegt (*de Ruijter et al., 2003; Ho et al., 2020*). Im Gegensatz zu den anderen HDACs der Klasse I fehlt HDAC 8 die C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne, welche normalerweise die Einbindung in Multiproteinkomplexe fördert. Aus diesem Grund ist HDAC 8 kleiner und agiert unabhängig von Cofaktoren (*Ho & Chan et al., 2020*). Trotzdem zeigt es eine typische Histon-Deacetylase-Aktivität (*Hu et al., 2000*).

1.2.3 Klasse IV HDACs

HDAC 11 ist die einzige HDAC der Klasse IV (*Clocchiatti et al., 2011*). HDAC 11 wird vorrangig im Gewebe des Gehirns, des Herzens, der Muskeln, der Nieren und der Hoden exprimiert. HDAC 11 wird aus einer Deacetylase-Domäne, welche eine Homologie zu den HDAC-Domänen der Klasse I und II aufweist, mit kleinen N- und C-terminalen Erweiterungen gebildet (*Haberland et al., 2009*). Es reguliert die Proteinstabilität des DNA-Replikators CDT1 und die Expression von Interleukin 10 (*Seto & Yoshida et al., 2014*).

1.3 Epigenetische Arzneimittel

Unter epigenetischen Arzneimitteln versteht man Medikamente, die die Funktion von Enzymen beeinflussen, welchen eine wichtige epigenetische Funktion zukommt. Diese epigenetisch wirksamen Enzyme sind beispielsweise wichtige Spieler in der Regulation der Transkription oder auch in der posttranskriptionellen Modifikation. Ziel ist es, beispielsweise bestimmte Gene, die in Tumoren „still-gelegt“ wurden, zu reaktivieren.

Häufig von der Stilllegung betroffen, sind Tumorsuppressorgene oder Gene, die für bestimmte DNA-Reparaturproteine kodieren (*Rodriguez-Paredes & Esteller, 2011*).

1.3.1 HDAC-Inhibitoren und Angriffsziele in Urothelzellkarzinomen

Vor mehr als 30 Jahren konnte bereits der erste potente HDAC-Inhibitor, das Streptomyces-Metabolit Trichostatin A, von Yoshida identifiziert werden (*Yoshida et al., 1990*). Im Jahr 2001 stellte Lin am Beispiel der Leukämogenese fest, dass die Blockierung von verschiedenen Differenzierungs- und Tumorsuppressorgenen eng mit der Dysregulation der Aktivität verschiedener HDACs in Verbindung steht (*Lin et al., 2001*).

Die HDACi unterscheiden sich in ihrer Selektivität gegenüber den jeweiligen HDACs. Es gibt pan-HDACi, die sowohl die zytoplasmatischen als auch die nukleären HDACs hemmen, aber auch klassenspezifische sowie mehr oder minder enzymselektive Inhibitoren. Abhängig von der jeweiligen Spezifität können sich die Auswirkungen unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren unterscheiden. Die unmittelbaren Auswirkungen einer HDAC-Inhibition sind nicht immer eindeutig. Prinzipiell führt zum Beispiel die Inhibition von HDAC1, HDAC2 und HDAC3 über die gesteigerte Acetylierung von Histonen und anderen Kernproteinen zu einer Freilegung der DNA für die RNA-Polymerase II, was eine globale Genaktivierung zur Folge hat (*Ho & Chan et al., 2020*). Da HDACs aber auch an der Transkriptionsaktivierung spezifischer Gene beteiligt sind, kann eine HDAC-Inhibition auch zu einer Herunterregulierung dieser Gene führen. Daher zeigt sich oft nach einer HDAC 1-3 Inhibition eine kombinierte Hoch- und Herunterregulation von ungefähr gleich vielen Genen (*Haberland et al., 2009*).

Trotzdem hat sich der Einsatz von HDACi als Möglichkeit zur Behandlung solider Tumoren und hämatologischer Malignome gezeigt, da sich durch eine vermehrte HDAC-Aktivität eine Reaktivierung von Onkogenen durch epigenetische Veränderungen in malignen Zellen findet (*Slingerland et al., 2014*). Durch den Einsatz von HDACi soll in diesen Zellen der „gesunde“ epigenetische Zustand wieder hergestellt werden und dadurch die Onkogene herunterreguliert werden. Unterschiedliche HDACi wurden bereits zur Behandlung sowohl urologischer Krebserkrankungen als auch anderer Malignitäten in klinischen Studien getestet. Dazu gehören beispielsweise die HDACi Vorinostat und Panobinostat (*Quinn et al., 2021; Mithraprabhu et al., 2020*). Die Studien

waren bisher jedoch alle negativ und zeigten bei eingeschränkter Wirksamkeit der entsprechenden HDACi ein hohes Toxizitätsrisiko (*Quinn et al., 2021; Mithraprabhu et al., 2020*). Daraus ergibt sich die Frage, ob durch den Einsatz selektiver Inhibitoren die Wirksamkeit verbessert und die Nebenwirkungen vermindert werden könnten. Berichte, beispielsweise von Fournel et al. aus dem Jahr 2008, zeigten, dass auch eine selektive Hemmung von HDAC 1 in vitro zum Wachstumsstillstand und zur Einleitung der Apoptose menschlicher Krebszellen ausreichend ist. Dies führte zur Entwicklung selektiver HDACi, wie beispielsweise des Wirkstoffs MGD0103, auch als Mocetinostat bekannt (*Fournel et al., 2008*). Ähnliche Ergebnisse konnten durch eine selektive HDAC1/2-Inhibition bei Urothelkarzinomzelllinien, beispielsweise durch Romidepsin oder Givinostat, gezeigt werden (*Pinkerneil et al., 2016*).

Klinische Studien mit „selektiven“ Klasse I Inhibitoren, wie Romidepsin (*Molife et al., 2010*) und Mocetinostat (*Grivas et al., 2019*) erbrachten jedoch bislang ebenfalls noch keine positiven Ergebnisse bzw. das Toxizitätsprofil stand in keinem guten Verhältnis zur Wirksamkeit. Daher stellt sich die Frage, ob nicht durch eine Kombination von HDACi mit anderen Substanzen die Wirksamkeit erhöht und das Toxizitätsprofil durch eine dann mögliche Dosisreduktion verbessert wird.

In bereits durchgeführten Genomanalysen verschiedenster Krebsentitäten konnten Veränderungen in den HDAC-Genen festgestellt werden. In Urothelkarzinomen zeigte sich häufig eine Hochregulation der Klasse-I-HDACs. Die erhöhte Expression von HDACs der Klasse I korrelierte mit der Tumordifferenzierung und einer hohen Proliferationsrate (*Niegisch et al., 2013*). In umfassenden immunhistochemischen Analysen konnte festgestellt werden, dass HDAC 1 und HDAC 2 vor allem mit hochgradigen papillären Harnblasenkarzinomen assoziiert sind. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine hohe Expression von HDAC 1 mit einer deutlich kürzeren Zeit ohne Progress assoziiert sein könnte. Zudem ergab sich daraus die Vermutung, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von Klasse I HDACs und der Prognose bei nicht-invasiven papillären Harnblasenkarzinomen gibt (*Poyet et al., 2014*). 2024 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe unseres Forschungslabors, dass die Kombination des HDACi Quisinostat mit Cisplatin oder dem PARP-Inhibitor (PARPi) Talazoparib in fünf verschiedenen UCCs, sowie platinresistenten Subzelllinien zu einem signifikanten synergistischen Effekt führte und somit eine Dosisreduktion beider Medikamente ermöglichte (*Meneceur et al., 2024*). Es zeigte sich ein Rückgang der Lebensfähigkeit der

Karzinomzellen, darunter auch eine Abnahme der Lebensfähigkeit der platinresistenten, malignen Zellen. Quisinostat zeigte im Vergleich zu Romidepsin eine hohe Selektivität gegenüber HDAC 1. Für Romidepsin hingegen sind seit langem HDAC 1 und 2 als Hauptzielstrukturen bekannt. Neben den beiden bereits erwähnten HDACi sind auch Givinostat, Etenostat und 4SC-202 selektive Klasse I HDACi. Jedoch zeigen weder Quisinostat noch Romidepsin eine Wirksamkeit gegen die beiden weiteren HDACs der Klasse I (HDAC 3 und 8). Die Arbeitsgruppe Lehmann et al. aus dem urologischen Forschungslabor veröffentlichte 2014, dass HDAC 8 in Urothelzellkarzinomen dysreguliert vorliegt, jedoch bisher keinen vielversprechenden Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten darstellt (*Meneceur et al., 2024; Hoffmann et al., 2021; Lehmann et al., 2014; Pinkerneil et al., Urothelial Carcinoma, 2018*). Die pharmakologische Hemmung von Klasse I HDACs, insbesondere der HDAC 1, stellt somit eine vielversprechende Therapieoption dar.

1.3.2 Mocetinostat

Mocetinostat (MGCD0103) ist ein HDACi der Klasse I und der Klasse IV HDACs und wurde durch die Arbeitsgruppe Fournel und Kollegen entwickelt und synthetisiert. Der Entwicklung von Mocetinostat gingen mehrere unabhängige Experimente voraus, in denen sich eine antiproliferative Wirkung durch die Hemmung von HDAC 1 in vier verschiedenen menschlichen Krebszelllinien, darunter eine Harnblasenkarzinomzelllinie, nachweisen ließ (*Fournel et al., 2008*). In vitro zeigte Mocetinostat eine hemmende Wirkung gegenüber HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3 und HDAC 11. Am stärksten hemmte es HDAC 1 und HDAC 2. Jedoch unterschied sich die maximale Hemmung der HDAC-Enzymaktivität je nach Zelllinie. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Mocetinostat die Histon-Acetylierung in Krebszellen induziert, jedoch keinen Effekt auf die Tubulin Acetylierung hatte. Des Weiteren konnte eine dosisabhängige antiproliferative Aktivität des Wirkstoffes gegenüber diverser menschlicher Krebszelllinien festgestellt werden (*Fournel et al., 2008*). Diese schlossen sowohl solide Tumoren als auch hämatologische Malignome ein. In der Durchflusszytometrie ergaben sich in vitro zelllinienspezifisch konträre Ergebnisse. Teilweise führte die Behandlung, beispielsweise bei humanen Dickdarmkarzinomzellen (HCT 116), zu einer signifikanten Abnahme der S-Phase und zu einer Akkumulation der Zellen in der G1 und G2/M-Phase. Zellzyklusprofile anderer Zellreihen, z.B. humane, epitheliale Brustkarzinomzellen

(HMEC), zeigten sich unverändert. Auch im menschlichen Xenograft-Modell reduzierte sich das Wachstum, der zuvor subkutan implantierten menschlichen Tumoren (A549 – nicht kleinzellige Lungenkarzinomzellen) in Nacktmäusen, nach etwa 13 Tagen bei täglicher oraler Einnahme von Mocetinostat (*Fournel et al., 2008*). Auch in folgenden experimentellen Studien konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit Mocetinostat, beispielsweise bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen, die Genexpression steigerte und die Histonmodifikation an Genloci, die für die Immunabwehr und Antigenpräsentation in Tumorzellen verantwortlich sind, modulierte. Die Expression dieser Zielgene wurde mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bestätigt (*Briere & Sudhakar et al., 2018*).

Grivas et al. berichteten 2018 von der ersten klinischen Studie mit Mocetinostat bei Patienten mit Urothelzellkarzinomen. Diese wurden entsprechend der vorliegenden Histologie ausgewählt. Somit wurden nur Patienten mit lokal fortgeschrittenem, metastasiertem oder inoperablem Urothelzellkarzinom ausgewählt, welche trotz platinbasierter Chemotherapie einen Progress erlitten. Das Tumorgewebe der ausgewählten Patienten wurde hinsichtlich einer inaktivierenden Mutation oder Deletion im Gen des CREB bindenden Proteins (*CREBBP*) und/oder im Protein kodierenden Gen *EP300* mittels Next-Generation-Sequencing getestet. Unter der Therapie mit Mocetinostat trat jedoch eine erhebliche Toxizität auf. Zudem wurde eine unzureichende Wirksamkeit beobachtet werden (*Grivas et al., 2018*).

Im weiteren Verlauf wird die Grundlage hinsichtlich des zweiten genutzten Inhibitors, des CDK9i, beschrieben und erklärt.

1.4 Cyklin-abhängige Kinasen (CDKs)

Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) sind heterodimere Enzyme, die aus einer Proteinkinase-Untereinheit und einer Cyclin-Untereinheit bestehen. Im menschlichen Organismus sind bereits 20 CDKs beschrieben. Einerseits sind Cyclin-abhängige Kinasen an der Regulation des Zellzyklus in eukaryontischen Zellen beteiligt, wo sie eine schalterähnliche Funktion zu Beginn der S-Phase und beim Ein- und Austritt aus der Mitose übernehmen (*Hochegger et al., 2008*). Andererseits sind CDKs an der Transkription beteiligt. Zu den wichtigsten Aufgaben gehört dabei die reversible

Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II. Je nach Phosphorylierungszustand kontrollieren und regulieren sie auf diese Weise die Transkription. Zu den CTD-phosphorylierenden CDKs gehören einerseits die zellzyklusbezogenen Kinasen CDK1 und CDK2, sowie andererseits die transkriptionellen CDKs der Unterfamilien CDK7, CDK8 und CDK9 (*Malumbres et al., 2014*). Sowohl transkriptionelle CDKs als auch zyklische CDKs besitzen regulatorische Cyclin-Untereinheiten, welche für die Enzymaktivität entscheidend sind (*Egloff, 2021*).

In menschlichen Zellen finden sich 29 unterschiedliche Cycline. Die Cycline haben etwa eine Masse von 35-90 Kilodalton (kDa) und lassen sich in 16 Unterfamilien, sowie 3 Hauptgruppen gliedern. Alle Cycline besitzen mindestens eine sogenannte Cyclin-Box. Dabei handelt es sich um eine Protein-Domäne aus etwa 100 Aminosäuren, die einen Stapel aus fünf α -Helices bildet. Die meisten Cycline setzen sich aus zwei Cyclin-Boxen zusammen. Die aminoterminal Box ist dabei relevant für die Bindung an die CDKs, wohingegen die carboxyterminale Box für die korrekte Faltung des Moleküls zuständig ist (*Cao et al., 2014*).

1.4.1 Cyclin-abhängige Kinase 9 (CDK9)

Die Cyclin-abhängige Kinase 9 ist eine transkriptionelle CDK und wird in allen menschlichen Geweben exprimiert. Es existieren zwei Isoformen von CDK9. Basierend auf ihrem Molekulargewicht unterscheidet man CDK9 (42) und CDK9 (55). Dabei wird für die Expression der 55 kDa-Isoform ein alternativer Promoter verwendet. Dieser kodiert für eine N-terminale Erweiterung, die 117 Aminosäuren umfasst. Im Allgemeinen wird die CDK9 (42) stärker exprimiert (*Shore et al., 2003*). CDK9 bildet die katalytische Untereinheit des positiven Transkriptionsverlängerungsfaktors b Komplexes (P-TEFb Komplexes) (*Zhu et al., 1997*). Zur Aktivierung des P-TEFb Komplexes geht CDK9 eine Bindung mit Cyclin T1, T2a, T2b oder K ein. Der aktive P-TEFb Komplex phosphoryliert den repressiven DSIF/NELF-Komplex der RNA-Polymerase. DSIF (DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) sensitivity inducing factor) und NELF (negative elongation factor) hemmen zusammen die frühe Elongation und wirken so auf die Polymerase ein. Durch die Phosphorylierung des DSIF/NELF Komplexes durch P-TEFb löst sich NELF und DSIF wird in einen Zustand überführt, der die Elongation der RNA-Polymerase II fördert (*Adelman & Lis, 2012*). Zusätzlich kommt es durch den P-TEFb

Komplex zu einer Phosphorylierung im Bereich der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II, welche die RNA-Synthese erleichtert. Bei der Rekrutierung des RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplexes an Promotoren, spielen verschiedene spezifische Transkriptionsfaktoren eine Rolle und stellen so einen wichtigen regulatorischen Schritt der Genexpression dar. Dazu gehören z.B. NF- κ B (nuclear factor “kappa- light-chain-enhancer” of activated B-cells), MYC (Protein des gleichnamigen Gens) und MCL-1 (Myeloid Cell Leukemia 1). Die transkriptionelle Elongation, der für diese Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene, wird durch P-TEFb vermittelt und gefördert. (Rahl *et al.*, 2010; Barboric *et al.*, 2001; Eberhardy *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Rahmen der Apoptoseregulation. Zudem spielt er eine entscheidende Rolle in der Elongation der Transkription, da NF- κ B P-TEFb benötigt, um die Elongation zu stimulieren (Barkett & Gilmore, 1999; Barboric *et al.*, 2001). Ein wichtiger Regulator der zellulären Proliferation ist der Transkriptionsfaktor MYC. Dieser spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der RNA-Polymerase II und hat so einen positiven Einfluss auf die Genexpression. MYC hat jedoch eine untergeordnete Bedeutung bei der Rekrutierung der RNA-Polymerase II an ihr Zielgen (Rahl *et al.*, 2010) (Abb. 3). MCL-1 ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma 2) und gehört zur Gruppe der proapoptotischen Faktoren. Es wurde festgestellt, dass MCL-1 beispielsweise in humanen myeloblastischen Leukämiezellen hochreguliert ist (MacCallum *et al.*, 2005). Zudem wird es mit einer höheren Überlebensrate von Krebszellen in Verbindung gebracht (Cidado *et al.*, 2020). Somit spielen das antiapoptotische Protein MCL-1 und das Onkogen MYC, eine entscheidende Rolle für das Überleben und das Wachstum von Krebszellen, sowie für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapien (Lücking *et al.*, 2017).

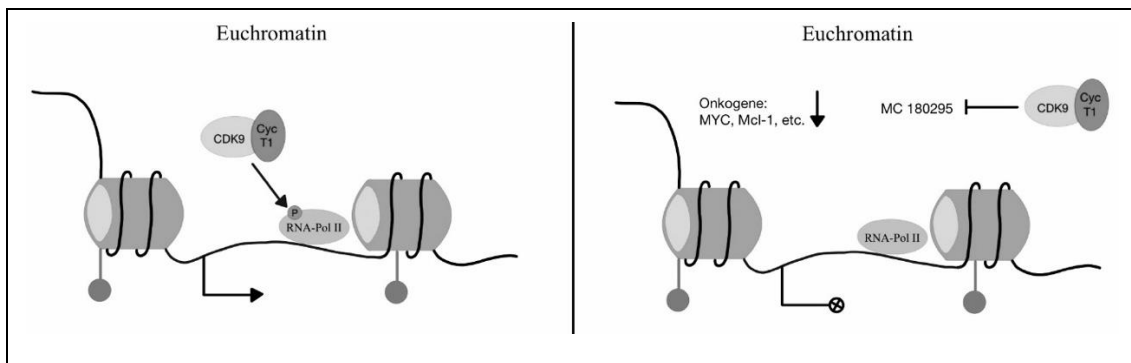


Abb. 3: Darstellung der Wirkung von CDK9-Aktivität bzw. CDK9-Inhibition auf die RNA-Polymerase II.

Die RNA-Polymerase II ist relevant für die Transkription protein-kodierender Gene (Euchromatin). Die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II unterliegt regelmäßigen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, was zur Steuerung der Aktivität der Polymerase dient. CDK9 bildet einen Komplex mit Cyclin T1. Dieser Komplex kann über eine Phosphorylierung den Promoter für die bereits rekrutierte RNA-Polymerase II und durch die Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase die Elongation der Transkription freigeben. Zusätzlich kommt es zur Rekrutierung relevanter Co-Faktoren für die weitere Verarbeitung der transkribierten RNA (Dahmus, 1996; Washington 2002).

Modifiziert selbst erstellt nach der Abbildung der Arbeitsgruppe Zhang *et al.*, Cell, 2018.

1.5 CDK9-Inhibitoren

Die Forschung hinsichtlich neuer CDK9-Inhibitoren und deren Targets umfasst ein weites Spektrum. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Krebstherapie zu revolutionieren. Im Folgenden wird nur auf die inhaltlich relevanten Themen eingegangen, die zum Verständnis der Zielsetzung und der Ergebnisse dieser Arbeit beitragen.

Die selektive Inhibition von PTEFb/CDK9 ist ein vielversprechender Ansatz in der heutigen Krebstherapie, da dies zu einem schnellen Abbau der kurzlebigen mRNA-Transkripte des antiapoptotischen Proteins MCL-1 und des Onkogens MYC führt (Lücking *et al.*, 2017). Lücking und Kollegen berichten über Ateveciclib (BAY 1143572), einen selektiven und potenten P-TEFb/CDK9-Inhibitor, der aufgrund guter antitumoraler Wirksamkeit nun klinisch erprobt wird (Clinical Trials gov - NCT02345382). Die Arbeitsgruppe von Cidado veröffentlichte im Jahr 2020, dass AZD4573, ein hochselektiver und potenter CDK9-Inhibitor, zu einer raschen Induktion der Apoptose in

hämatologischen Krebszellen und zu einer zeit- und dosisabhängigen Depletion von MCL-1 führt. Der dadurch ausgelöste Zelltod von Krebszellen wurde dem Medikament als Hauptmechanismus zugeschrieben. Die indirekte Hemmung von MCL-1 durch die selektive Ausrichtung auf CDK9 stellt somit eine therapeutische Option für MCL-1 abhängige Erkrankungen dar (*Cidado et al., 2020*).

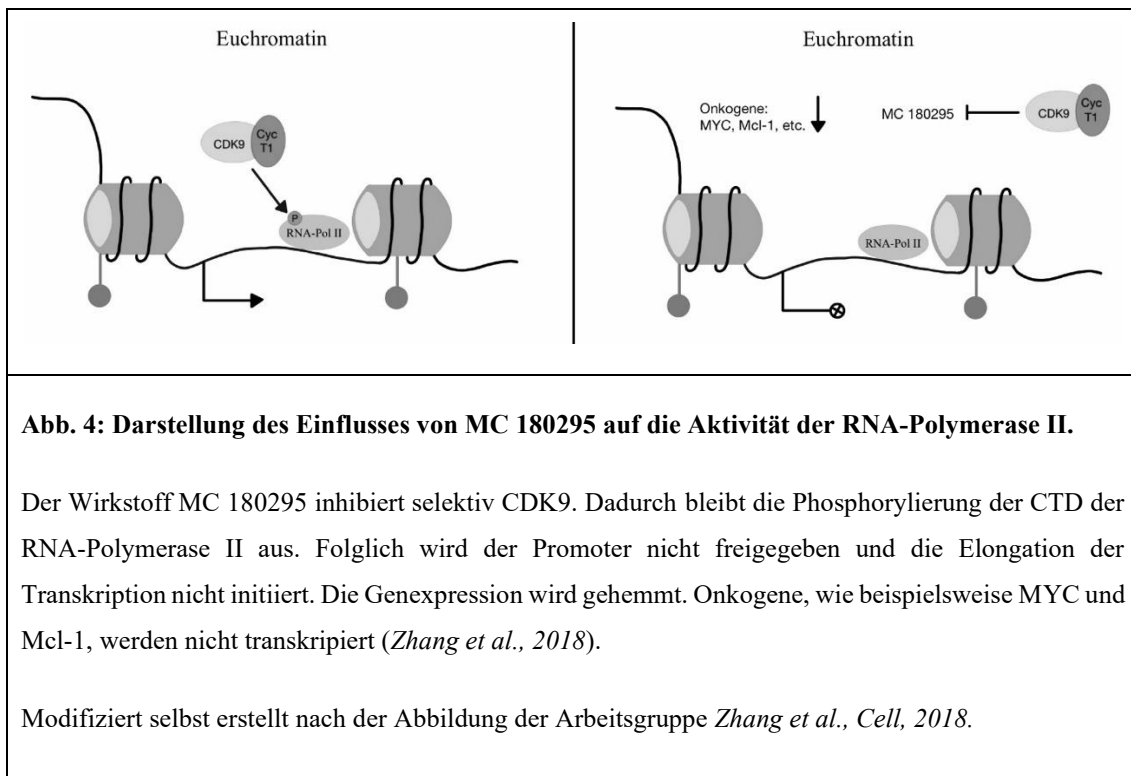
Die Arbeitsgruppe Zhang et al. testete 2018 neu synthetisierte Medikamente mit Aminothiazol-Verbindungen. Damit ähneln diese nicht den bisher bekannten epigenetisch wirksamen Medikamenten. Um das Ziel des Arzneimittels genauer zu bestimmen, wurden die DNA-Methylierung und die HDAC-Aktivität genauer untersucht (*Zhang et al., 2018*). Hierzu wurden die von der menschlichen Dickdarmkrebs-Zelllinie SW 48 abgeleiteten YB5-Zellen als Basis für das Screening epigenetischer Wirkstoffe genutzt (*Raynal et al., 2012*). YB-5 weist den Cytomegalie-Virus-Promoter auf, welcher die Expression des GFP-Gens (grün fluoreszierendes Protein), eines sogenannten Reportergens, positiv beeinflusst. Epigenetische Mechanismen, wie beispielsweise die DNA-Hypermethylierung, konnten die Expression von GFP in YB5 durch eine Veränderung des Chromatins negativ beeinflussen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit DNA-Methylierungsinhibitoren bzw. HDAC-Inhibitoren die GFP-Expression wieder reaktivierte. Dies diente als Grundlage und führte im Rahmen eines GFP-Reaktivierungsscreenings zu der Entdeckung einer neuen Wirkstoffgruppe. Es konnte nachgewiesen werden, dass die neue Wirkstoffgruppe stillgelegte Gene über CDK9 reaktivieren konnte, ohne die Methylierung der DNA zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass für die Stilllegung bestimmter Gene in Krebszellen CDK9 erforderlich ist (*Zhang et al., 2018*).

1.5.1 MC 180295

Der selektive CDK9-Inhibitor MC 180295 wurde erstmals durch die Arbeitsgruppe Zhang und Kollegen im Jahr 2018 beschrieben. MC 180295 besteht aus einem Aminothiazol-Kern mit abwechselnden Wasserstoffbrückenbindungs-Donatoren und -Akzeptoren. Es wurde herausgefunden, dass der Aminothiazol-Kern des beschriebenen Modells über kanonische Wasserstoffbrückenbindungen mit CDK9 eine Verbindung einging. MC 180295 weist eine hohe Selektivität gegenüber CDK9 auf. Jedoch lässt sich die Selektivität gegenüber CDK9 nicht durch die Struktur oder Wechselwirkungen des

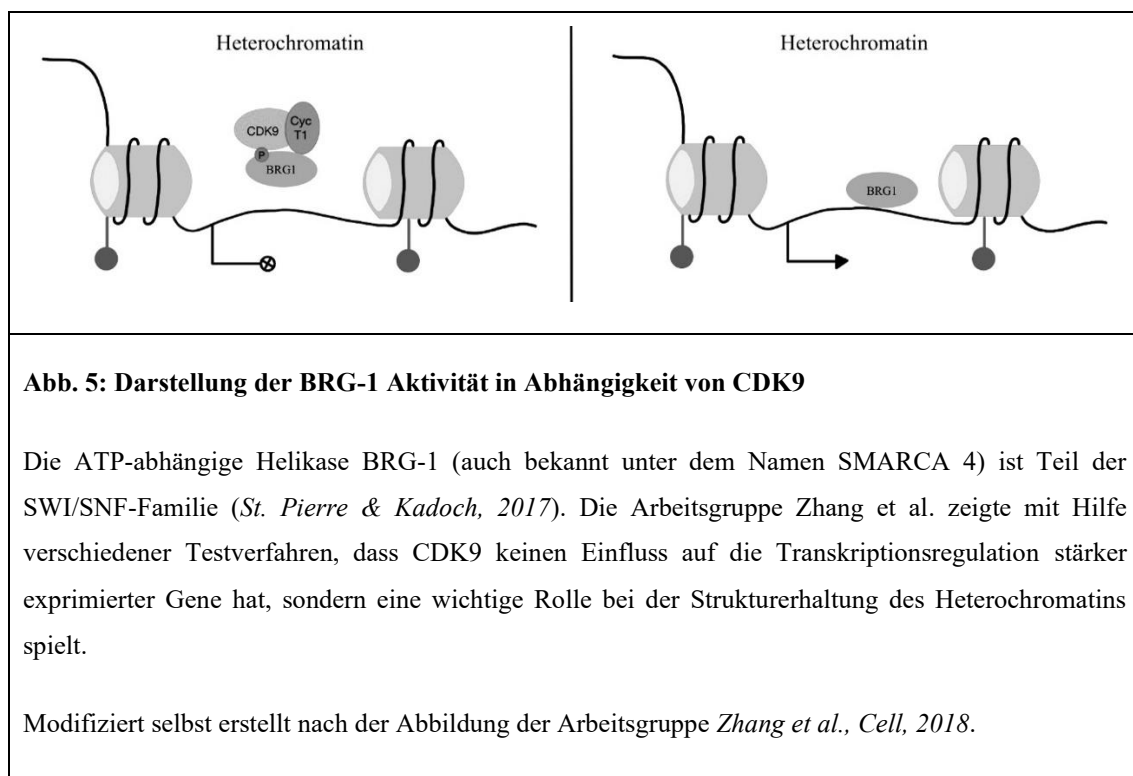
Wirkstoffes begründen, da MC 180295 in diesen Punkten anderen Multi-CDK-Inhibitoren sehr ähnlich ist. Der relevante Unterschied zu anderen CDKs befindet sich am C-terminalen Ende des CDK9, welches im Gegensatz zu den anderen CDKs eine niedrigere Konformation annehmen kann. Diese niedrigere Konformation bedingt, dass eine Norbornylgruppe am C-terminalen Ende des CDK9s aufgenommen werden kann. Dieser Unterschied in der Konformation erklärt die präferierte Bindung von MC 180295 an CDK9 (*Zhang et al., 2018*).

Die Entdeckung von MC 180295 gelang der Arbeitsgruppe Zhang et al. durch ein phänotypisches Screening zur Identifikation gesuchter Zielstrukturen und neuer Arzneimittel. Als strenges Kriterium wurde die GFP-Induktion festgelegt. Letztlich wiesen die potentesten Strukturen Aminothiazolverbindungen auf. Durch die chemische Optimierung der vorliegenden Aminothiazol-Analoga konnte HH1 als das Wirksamste identifiziert werden und man stellte fest, dass es das zuvor stillgelegte GFP in drei unterschiedlichen Lebendzelltests reaktivieren konnte. Die identifizierten Aminothiazol-Verbindungen ähnelten in Aufbau und Struktur nicht den bereits bekannten Epidrugs. Zur Identifizierung der Zielstruktur von HH1 wurden weitere Tests durchgeführt. Weder eine Demethylierung noch eine Hemmung der HDAC-Aktivität konnte festgestellt werden. Mit Hilfe der Konnektivitätszuordnung und einer RNA-Sequenzierung stellte man nach Behandlung mit HH1 fest, dass Inhibitoren, die Cyclin-abhängige Kinasen inhibieren, HH1 am ähnlichsten waren. In weiteren Tests stellte man fest, dass CDKs relevante Zielstrukturen für HH1 waren, jedoch deuteten die Daten stark darauf hin, dass CDK9 die Zielstruktur der neu identifizierten Aminothiazol-Verbindungen ist. Aus diesem Grund wurden neue Medikamente synthetisiert, welche in Struktur und Funktion HH1 sehr ähnlich waren. MC 180295 wurde aufgrund einer hohen Selektivität gegenüber menschlichen CDKs, insbesondere gegenüber CDK9, als das Wirksamste identifiziert. Zudem wurde festgestellt, dass es neben der CDK-Inhibition auch zu einer Hemmung der Glykogensynthasekinase 3 kommt (*Zhang et al., 2018*). Die selektive CDK9-Hemmung wurde bestätigt durch die Analyse der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II sowie durch den ausbleibenden Nachweis der Expression von MYC (*Zhang et al., 2018*) (Abb. 4).



Daten einer erneuten RNA-Sequenzierung legten nahe, dass einige Gene früh herunterreguliert wurden, andere Gene jedoch später hochreguliert wurden. Es zeigte sich, dass die ATP-abhängige Helikase SMARCA4 bzw. BRG-1 (Brahma-Related Gen 1 protein) zu den am stärksten aktivierten Regulatoren gehört. Das Protein BRG-1 ist als Bestandteil des SWI/SNF-Komplexes (SWItch/Sucrose Non-fermentable-Komplex) an der Regulierung der Chromatinstruktur beteiligt (St. Pierre & Kadoch, *Current Opinion in Genetics & Development*, 2017). Die Arbeitsgruppe Zhang *et al.* konnte nach CDK9-Inhibition eine diffuse Aufweitung des Chromatins feststellen, was zu der Annahme führte, dass die Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur CDK9-abhängig ist (Zhang *et al.*, 2018). Es wurde angenommen, dass die Phosphorylierung von BRG-1 durch CDK9 zu einer Aufrechterhaltung des dicht gepackten Heterochromatins führt. Bestimmte Sequenzen lagen somit nicht zur Transkription frei (linker Teil der Abb. 5). Folglich führte die Abwesenheit von CDK9 durch eine gezielte Inhibition zu einer Auflockerung des Heterochromatins und zur Einleitung der Transkription durch die Helikase BRG-1, welche dephosphoryliert vorlag (rechter Teil der Abb. 5). Daraus ergab sich die Annahme, dass es über die CDK9i und die damit verbundene BRG-1 Aktivierung es zu einer Änderung der Genexpression kommt (Zhang *et al.*, 2018). Diese Annahme wurde mittels In-vitro-Kinase-Assay bestätigt. Hierzu kam das aus der Kolonkarzinomzelllinie SW48

abgeleitete Zellsystem YB5 zum Einsatz, welches einen hypermethylierten Cytomegalovirus-Promoter enthält. Dieser Promoter steuert die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (Raynal *et al.*, 2012). Durch die gezielte Überexpression von BRG-1 in YB5 wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von BRG1 für die Aktivierung von Genen durch die Inhibition von CDK9 eine entscheidende Rolle spielt. Die Reaktivierung von GFP durch die CDK9-Inhibition wurde nochmal zusätzlich durch die Überexpression von BRG-1 deutlich verstärkt. Im nächsten Schritt wurde die Expression von BRG-1 durch siRNA in YB5 reduziert und diese im Anschluss erneut mit einem CDK9i behandelt. Es resultierte eine Reduktion der GFP-Induktion, was bestätigt, dass BRG-1 ein wichtiges Element der Genaktivierung darstellt. Insgesamt deuteten die erfolgten Experimente darauf hin, dass die Phosphorylierung von BRG1, vermittelt durch CDK9, die Rekrutierung von BRG1 an das Chromatin verhindert. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die CDK9i BRG1 die Umstrukturierung des Chromatins ermöglichen und über diesen Weg die Genexpression beeinflussen (Zhang *et al.*, 2018) (Abb. 5).



Des Weiteren wurde getestet, ob die neu beschriebenen Medikamente, genauso wie bereits bekannte CDK-Inhibitoren, eine antitumorale Komponente haben. In ersten Analysen zeigte sich, dass sowohl HH1 als auch MC 180295 effektiv die Proliferation von Krebszellen (YB5, HCT116) verringerten. Die Zellzyklusanalysen ergaben eine Zellanreicherung in der Sub-G1-Phase. Auch die Langzeitproliferation mittels Klonogenitätstest war stark eingeschränkt und zeigte keine Proliferation der Zellen (*Zhang et al., 2018*). Die In-vivo-Wirkung von MC 180295 wurde schließlich in Mausexperimenten ermittelt. Dazu wurden Mäusen SW48 (Kolonadenokarzinom-Zellen) subkutan injiziert und anschließend jeden zweiten Tag über 10 Wochen verlaufskontrolliert. Die Tumore wuchsen nachweislich langsamer und MC 180295 verbesserte das Überleben der Mäuse. Zudem ergaben sich keine schwerwiegenden Nebenwirkungen (*Zhang et al., 2018*).

1.5.2 LDC 000067

Albert und Kollegen untersuchten 2014 den neuen CDK9-Inhibitor LDC 000067. Die Selektivität gegenüber CDK9 konnte durch funktionelle Kinase-Assays bestätigt werden. Es zeigte sich 55-fach selektiver für CDK9 gegenüber CDK2 und über 230-fach selektiver gegenüber CDK6 und CDK7. Dies konnte in einem ATP-kompetitiven Kinase-Bindungstest bestätigt werden. Auch die in-vitro-Transkription wurde ATP-kompetitiv und dosisabhängig durch LDC 000067 inhibiert. Das Arzneimittel verminderte die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II und führte so zu einer Hemmung der Transkription. Des Weiteren führte die Behandlung der menschlichen Krebszellen mit LDC 000067 zur Induktion des Tumorsuppressorproteins p53 und zur Apoptose der entsprechenden Zellen. Vor allem zeigte sich durch Inhibition der RNA-Polymerase II eine selektive Reduktion kurzlebiger mRNAs, wie z.B. der Apoptose- und Proliferationsregulatoren MYC und MCL1. LDC 000067 präsentierte sich als potenzielles Medikament zur zielgerichteten Bekämpfung von Erkrankungen, die abhängig von CDK9 sind (*Albert et al., 2014*).

1.6 Zielsetzung

Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapien für maligne Erkrankungen, insbesondere der Harnblasenkarzinome, Forschungsschwerpunkt vieler wissenschaftlicher Arbeitsgruppen weltweit.

Die Verwendung epigenetisch wirksamer Arzneimittel stellt einen neuen Therapieansatz bei der Behandlung verschiedenster Malignitäten dar.

Ein vielversprechender HDACi ist Mocetinostat, welcher die Klasse I- und der Klasse IV-HDACs hemmt. Die Monotherapie mit Mocetinostat brachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg, sondern musste aufgrund zu hoher Toxizität vorzeitig abgebrochen werden (*Grivas et al., 2018*).

Mit dieser Arbeit soll CDK9 als Zielstruktur mittels Western Blot in den ausgewählten Urothelkarzinomzelllinien (UCCs) sowie in der Uroepithelzelllinie (UEC) HBLAK nachgewiesen werden. Des Weiteren soll das Ansprechen der beiden ausgewählten CDK9i MC 180295 und LDC 000067 sowohl einzeln als auch in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat auf die UCCs mittels MTT-Tests analysiert werden. Zudem soll eine Bestimmung der jeweiligen IC_{50} -Werte erfolgen. Folgend sollen Analysen zur Wirkung der CDK9i und des HDACi einzeln und in Kombination auf die Kurz- und Langzeitproliferation, auf den Zellzyklus sowie auf die Induktion der Apoptose in UCCs und der UEC erfolgen. Abschließend soll eine RNA-Sequenzierung nach Behandlung mit je einem der beiden CDK9i erfolgen, um Aufschluss über den Wirkmechanismus dieser Inhibitoren zu erlangen.

2 Material

2.1 Zelllinien

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten kommerziellen UCCs und der kommerziellen UEC. Aufgeführt wurden zusätzlich Geschlecht/(Alter in Jahren), Ursprung bzw. TNM/Grading, Morphologie/Histologie und die entsprechende Referenz.

Zelllinie	Geschlecht, Alter in Jahren	Ursprung	Morphologie	Referenz
HBLAK	M, 80	Blase	Primäre humane Uroepithelzellen	Hoffmann et al., 2016
Urothelkarzinom- zelllinie	Geschlecht	TNM/ Grading	Morphologie/ Histologie	Referenz
BFTC-905	F	Ta, G3	Epithelial TCC	Cheng et al., 1995; Tzeng et al., 1996; Steube et al., 1998
HT-1376	F	G3	Epitheloid TCC	Rasheed et al., 1977; Grimm et al., 1995
J82	M	T3, G3	Epithelial TCC	Marshall et al., 1977; O'Toole et al., 1983
RT-112	F	G2	Epitheloid TCC	Masters et al., 1986; Marshall et al., 1977
SW-1710	F	G1-2	Epithelial-like TCC	Kyriazis et al., 1984
T-24	F	G3	Epithelial TCC	Bubenik et al., 1970
UM-UC-3	M	G3	Epithelial TCC	Grossmann et al., 1986
VM-CUB-1	M	G3	Epithelial TCC	Williams et al., 1980; Grimm et al., 1995

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2: Aufstellung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien. Aufgeführt wurden zusätzlich Hersteller und Ort des Firmensitzes.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller	Ort
BSA (Rinderserumalbumin)	PAN TM BIOTECH	Aidenbach, Deutschland
Accutase [®] -Lösung	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Annexin-V FITC-Konjugat	Immuno Tools	Friesoythe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Auftragspuffer Roati Load (4x konz.)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Azur-Eosin-Methylenblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
Blotting Puffer (Tris-Glycin)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck	Darmstadt, Deutschland
CnT-Prime Epithelzellkulturmedium	CELLnTEC	Bern, Schweiz
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	GIBCO	Oberhausen, Deutschland
DOC (Natriumdeoxycholat)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Elektrophorese Puffer (10x Tris, Glycin, SDS)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
FCS (Fetales Rinderserum)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck	Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperaziny)-Ethansulfonsäure)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
HiMark Prestained Protein Standard	Invitrogen	Waltham, Massachusetts, USA
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kollagen IV-Lysophilisat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
LDC 000067	Selleckchem	Houston, Texas, USA
LDS Sample Puffer (4x)	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland

MACSQuant® Laufpuffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
MC 180295	ProbeChem	Shanghai, China
Methanol	VWR Chemicals	Langenfeld, Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Mocetinostat (MGCD0103)	Selleckchem	Houston, Texas, USA
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Page-Ruler™ - Prestained Protein ladder	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
Page-Ruler™ Plus - Prestained Protein ladder	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
PI (Propidiumiodid)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ponceau S (C.I. 27195)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Reducing Puffer	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
Salzsäure (25 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS Running Puffer	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung (0,25%)	Gibco	Oberhausen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

Zum Ansetzen von Puffern oder Lösungen wurde das Wasser durch die Q-Grad®2 Anlage von Millipore aufbereitet.

2.3. Molekularbiologische Kits

Tab. 3: Aufstellung der verwendeten Molekularbiologischen Kits. Aufgeführt wurden zusätzlich Hersteller und Ort des Firmensitzes.

Molekularbiologische Kits	Hersteller	Ort
Clarity Max™ Western ECL Substrate	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Pierce™ BCA-Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland

2.4 Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen von Puffern oder Lösungen wurde das Wasser durch die Q-Grad®2-Anlage von Millipore aufbereitet.

2.4.1 Puffer und Lösungen für die Herstellung von Proteinlysaten

Tab. 4: Puffer und Lösungen für die Herstellung von Proteinlysaten. Aufgeführt ist zusätzlich die Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ripa Puffer	50 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1 % IGEPAL® CA-630, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA ad 100 ml Aqua dest + auf 1 ml Ripa-Puffer kommen je 10µl Protease-Inhibitor und 10µl Phosphatase-Inhibitor

2.4.2 Puffer und Lösungen für Western Blots

Tab. 5: Puffer und Lösungen für Western Blots. Aufgeführt ist zusätzlich die Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
6x Laemmli-Puffer	350 mM Tris pH 6,8, 600 mM SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 216 mM DTT, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Blockier-Lösung	Milchpulver + TBS-T (1 % oder 5 %)

Blotting-Puffer 20x (Tris-Acetat)	40,8 g Bicin, 52,4 g Bis-Tris, 3 g EDTA in 500 ml Aqua dest, 10 % Methanol
Blotting-Puffer 5x (Tris-Glycin)	5x Tris/Glycin (30,3 g Tris, 144 g Glycin auf 2L; auf 1x mit 10% Methanol und Aqua dest ad 1 L verdünnen
Elektrophorese-Puffer	Bio-Rad 10x Tris/Glycin/SDS, Aqua dest; auf 1x Puffer 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3 auf 1 L Aqua dest
Stripping-Puffer (100 ml)	12,5 ml Tris HCl (pH 6,8), 20 ml 10 % SDS, 67,5 ml Aqua dest
TBS-T Puffer (10x)	0,5 M Tris, 1,6 M NaCl, Aqua dest, pH von 7,6 mit HCl eingestellt
TBS-T Puffer (1x)	10 % TBS-T Puffer (10x), 0,1 % Tween 20, Aqua dest

2.4.3 Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen

Tab. 6: Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen. Aufgeführt ist zusätzlich die Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Nicoletti-Puffer	0,1 % Tris, 0,1 % Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid, Aqua dest

2.4.4 Puffer und Lösungen für Annexin-V-PI-Tests

Tab. 7: Puffer und Lösungen für Annexin-V-PI-Tests. Aufgeführt ist zusätzlich die Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Annexin-V-Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 1,6 mM CaCl ₂

2.4.5 Puffer und Lösungen für BCA-Assays

Tab. 8: Puffer und Lösungen für das BCA-Assay. Aufgeführt ist zusätzlich die Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ripa Puffer	50 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % DOC, 0,1 % SDS, 1mM EDTA

2.5 Antikörper für Western Blots

Tab. 9: Aufstellung der verwendeten Antikörper für Western Blots. Aufgeführt sind zusätzlich die Verdünnung, die Cat., der Wirt, sowie der Hersteller und dessen Standort.

Antikörper	Verdünnung	Cat.‘	Wirt	Hersteller	Standort
Bcl-2	1:1000	#15071	Maus	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
Bcl-2	1:1000	#3498	Kaninchen	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
BRG-1	1:5000	#A1518	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
CDK9	1:2000	#A0517	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Cleaved PARP	1:1000	#9541	Kaninchen	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
MYC	1:200	#K1618	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
GAPDH	1:1000	#40818	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Kaninchen-IgG (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	1:2000	PO448	Ziege	Dako	Wiesentheid, Deutschland
Maus-IgG (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	1:1000	P0260	Kaninchen	Dako	Wiesentheid, Deutschland
MCL-1	1:2000	#4572	Kaninchen	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
p21	1:1000	#26616	Maus	Biosciences	Leverkusen, Deutschland
PARP	1:2000	#26619	Kaninchen	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
Phospho Rpb CTD	1:1000	#13499	Kaninchen	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main, Deutschland
RNA-Polymerase-total	1:1000	A300-653-M	Kaninchen	abcam	Cambridge, UK
Vinculin	1:1000	05-386	Maus	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
α -Tubulin	1:10.000	#ab4074	Kaninchen	abcam	Cambridge, UK

					Material
β-Aktin	1:30.000	A5441	Maus	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 10: Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien. Aufgeführt sind zusätzlich der Hersteller und dessen Standort.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Ort
Advanced Zellkulturflasche Cellstar® (25 cm ²)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Advanced Zellkulturplatte Cellstar® (96-Well)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Combitips advanced® (Mehrfachdispenser-Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Costar Stripette® (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning	Wiesbaden, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
FACS-Reaktionsgefäße Cellstar®	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Greiner Zentrifugenröhrchen	Merck	Darmstadt, Deutschland
Handschuhe	Abena classic	Aabenraa, Dänemark
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF-Membran)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Mini Gel	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt, Deutschland
Mini Gel Tank	Thermo Fisher Scientific	Darmstadt, Deutschland
Mini POTEAN Short Plates	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Mini PROTEAN Glass Plates	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Cellstar®	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Polyacrylamid (PAA), Rotiphoresegel® 30	Roth	Karlsruhe, Deutschland
PVDF Membran	Merck	Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße Cellstar®	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

Tris-Acetat Mini-Protein-Gel (NuPAGE™ 3 bis 8 %)	Invitrogen	Waltham, Massachusetts, USA
Whatman Gel Blot Papier	GE Healthcare Life Sciences	Buckinghamshire, UK
Zellkulturflasche Cellstar® (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte Cellstar® (6-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

2.7 Geräte

Tab. 11: Aufstellung der verwendeten Geräte. Aufgeführt sind zusätzlich der Hersteller und dessen Standort.

Geräte	Hersteller	Ort
Allegra™ 2IR Zentrifuge (Kühlzentrifuge)	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CAT M. Zipperer Schüttelgerät (Wippschüttler)	neoLab®	Heidelberg, Deutschland
ChemiDoc™ Imaging System (Lumineszenz-Detektionsgerät)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
FluoStar Otima (Microplate Reader)	BMG Labtech	Ortenberg, Deutschland
Inkubator	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse Ts2	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant®X, Miltenyi (FACS)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mini PROTEAN Tetra System (Gelkammer)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Multipette® stream (Mehrfachdispenser-Pipette)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nano Drop 2000	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
NuPAGE™ Tris-Acetat Kammersystem	Invitrogen	Waltham, Massachusetts, USA
pH-Meter 537	WTW	Weilheim, Deutschland
Pipetus® (Pipettiergerät)	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Power Pac Basic™	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Rollschüttler RS-TR05	PHOENIX Instrument	Garbsen, Deutschland
Rotationsmischer	LABINCO BV	Breda, Niederlande

Schüttelwasserbad 1083	GFL	Burgwedel, Deutschland
Sterilbank BSB 4A, Gelaire®	Flow Laboratories	Sunnyvale, USA
Thermomixer 5439 (Heizblock)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5418	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Blotting System)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Zählkammer TC20™ (automatisch)	Bio-Rad laboratories GmbH	München, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.8 Software

Tab. 12: Aufstellung der verwendeten Software. Aufgeführt sind zusätzlich der Hersteller und dessen Standort.

Software	Hersteller	Ort
Citavi	Swiss Academic Software	Wädenswil, Schweiz
DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Maryland, USA
MACSQuantify™ 2.13.0	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Microsoft 365	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Nano Drop 2000/2000c	Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
OPTIMA	BMG LABTECH	Ortenberg, Deutschland
Quest Graph™ IC ₅₀ Calculator	Molecular Devices	San José, Kalifornien, USA
Venny 2.0.2	Spanish National Biotechnology Centre (CNB)-CSIC	Madrid, Spanien

2.9 Datenbanken

Tab. 13: Aufstellung der verwendeten Datenbanken.

Datenbanken
https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator
https://www.genecards.org/
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Zur Kultivierung der UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 wurde DMEM der Firma Gibco genutzt. Dieses Medium wurde mit 10 %igem fetalem Kälberserum der Firma Biochrom AG versetzt und anschließend bei 4 °C gelagert.

3.1.1 Passage humaner Zelllinien

Zur Passage von humanen UCCs wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 12 ml PBS der Firma Sigma-Aldrich gewaschen. Anschließend wurden 2,5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und zum Ablösen der Zellen vom Flaschengrund für einige Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurden der Zellsuspension 9,5 ml Medium zugeführt.

Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Greiner Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 100 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert. Mittels Zellzählung (automatische Zählkammer von Bio-Rad) wurde die Zellanzahl bestimmt und die Zellen der Linien UM-UC-3 und VM-CUB-1 wurden in einem Verhältnis von 1:15 umgesetzt, welche dann unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) inkubiert (Inkubator der Firma Thermo Scientific) wurden.

Die immortalisierte UEC HBLAK wurde in CnT Prime-Medium (CELLnTEC) ebenfalls unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert. Für die Passage der Zellen wurden spezielle T25 Flaschen mit einer besonderen Bodenbeschichtung für HBLAK-Zellen verwendet. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschengrund wurde 1 ml Accutase dazugegeben und im Anschluss für ca. 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert. Mithilfe des Lichtmikroskops (Eclipse Ts2, Nikon) wurde in regelmäßigen Abständen überprüft, inwieweit die Zellen sich vom Boden gelöst hatten. Nach vollständiger Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurden 4 ml Medium zur Suspension dazugegeben. Die 5 ml Suspension wurde in ein Greiner Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 100 g zentrifugiert. Nachfolgend wurde der

Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zelllinie HBLAK wurde in einem Verhältnis 1:5 weitergeführt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zählung der Zellen wurde mit Hilfe der automatischen Zählkammer der Firma Bio-Rad durchgeführt. Hierzu wurden je 10 µl Typanblau und 10 µl der Zellsuspension zusammen in ein 500 µl Eppendorf-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden 10 µl der Suspension auf einen Objektträger mit integrierter Zählkammer aufgegeben und zum Zählen der Zellen in das Gerät gegeben. Dieses detektierte die ungefärbten lebenden Zellen und zeigte die Anzahl auf dem Display an.

3.1.3 Aussaat im Well-Format

Für funktionelle Analysen wurden die Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK in 1,5 ml pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Im Anschluss wurden die bestückten Platten unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) im Inkubator gelagert. Nach 24 h folgte die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren.

3.2 Funktionelle Zellkulturexperimente

3.2.1 Viabilitätsanalysen mittels MTT-Tests

Für die Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 wurden je 2000 Zellen in 50 µl pro Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät. Für die Zelllinie HBLAK waren es 4000 Zellen in 50 µl pro Well. Zur Behandlung der Zellen wurden für die verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe Quadruplikate angelegt. Vier Wells, in denen sich keine Zellen befanden, wurden mit 100 µl DMEM befüllt und dienten als Negativ-Kontrolle für die anschließenden Messungen. Die Wells am Rand der 96-Well-Platte wurden mit je 100 µl PBS aufgefüllt.

Nachfolgend wurden die Platten unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert, sodass die Zellen sich ausreichend vermehren konnten.

Nach 24 h wurden die ausgesäten Zellen mit einer 50 µl Lösung behandelt, welche aus Medium und einem Inhibitor bestand. Die verwendeten Inhibitoren waren der HDAC-Inhibitor Mocetinostat, sowie die beiden CDK9-Inhibitoren MC 180295 und LDC 000067. Die Inhibitoren wurden sowohl als Einzelgabe als auch in Kombination in verschiedenen Durchgängen getestet. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurden entsprechende DMSO-Ansätze als Lösungskontrollen mitgeführt.

Zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Werte) der jeweiligen Wirkstoffe wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe für 48 h behandelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel, sodass sich die Konzentrationen der Inhibitoren ermitteln ließen, bei denen noch ca. 50 % der Zellen vital waren.

Für die Synergieanalysen der Wirkstoffkombination aus CDK9i und HDACi wurden die Zellen jeweils mit einem Vielfachen des IC_{50} beider Wirkstoffe behandelt.

Nach der Behandlung wurden die 96-Well-Platten je nach Fragestellung 48-96 h bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

Des Weiteren wurde diese Methode auch für die Analyse von Auswirkungen der Substanzen auf die Kurzzeitproliferation der Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit den IC_{50} -Werten der Inhibitoren behandelt. Für die Wirkstoffkombinationen wurde die Konzentration erneut angepasst und aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde der 0,75-fache IC_{50} für die Analyse der Wirkung für alle weiteren Experimente festgelegt. Die Messungen erfolgten über 96 h im Abstand von 24 h.

Für die Auswertung wurde 5 mg/ml MTT-Reagenz in PBS gelöst und steril filtriert. Dann wurde in jedes zuvor behandelte Well, inklusive der Negativ-Kontrollen, 10 µl MTT-Reagenz gegeben und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, um die Färbung der Zellen zu beurteilen. Bei ausreichender Färbung der Zellen wurde die Flüssigkeit in den Wells abgekippt und die entstandenen Farbkristalle mit 50 µl DMSO (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Nach leichtem Schwenken konnten die Platten mit Hilfe des FluoStar

Optima der Firma BMG Labtech ausgelesen werden. Die Werte wurden in Excel-Tabellen übertragen.

Die grafische Auswertung der relativen Zellviabilität in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration des Inhibitors bildete die Grundlage der IC_{50} -Bestimmung. Zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration wurde der Quest Graph™ IC_{50} -Calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) verwendet. Dazu wurden die Rohdaten online in eine Eingabemaske eingegeben. Das Online-Tool erstellte aus den eingetragenen Werten eine Regressionskurve. Anhand dieser Kurve berechnete das Online-Tool die IC_{50} -Werte.

3.2.2 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse des Zellzyklus erfolgte eine Behandlung der in 6-Wells ausgesäten Zellen mit den Inhibitoren entsprechend ihrer IC_{50} -Werte. Für die Wirkstoffkombinationen wurde der 0,75-fache IC_{50} des jeweiligen Inhibitors entsprechend der ausgewählten Zelllinie verwendet.

Die Zellzyklusanalyse wurde nach 24 h und nach 48 h durchgeführt. Vorbereitend wurde der Nicoletti-Puffer angesetzt. Die Stocklösung des Propidiumiodids hatte eine Konzentration von 2 mg/ml und wurde somit in einem Verhältnis von 1:40 im Nicoletti-Puffer verdünnt.

Zur Vorbereitung der Proben für die Zellzyklusanalyse wurde der Überstand aus den 6-Wells in beschrifteten Greiner-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Im Anschluss wurden die Zellen abtrypsiert und zum Überstand dazugegeben. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl Nicoletti-Puffer resuspendiert, sodass keine Klumpen zurückblieben. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in die FACS-Röhrchen überführt und abgedunkelt, entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder für eine Stunde bei 4 °C gelagert.

Die Proben wurden mittels MACSQuant®-Analyser gemessen und anschließend mit der MACS-Quantify-Software, sowie Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.3 Annexin-V-PI-Test

Zur genaueren Analyse des Zelltods der Zelllinien nach Behandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen, wie zuvor bereits beschrieben, in 6-Well-Platten ausgesät. Die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte entsprechend ihrer IC_{50} -Werte. Für die Wirkstoffkombinationen wurde der 0,75-fache IC_{50} der jeweiligen Ziellinie verwendet.

Der Annexin-V-PI-Test wurde nach 24 h, sowie nach 48 h, durchgeführt. Vorbereitend wurde der Annexin-V-Puffer mit 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCL, 5 mM $MgCl_2$ und 1,6 mM $CaCl_2$ angesetzt. Anschließend wurde der Überstand in Greiner-Zentrifugenröhrchen gesammelt und die abtrypsinierten Zellen zum Überstand dazugegeben. Das Zellgemisch wurde abzentrifugiert und der erneut entstandene Überstand entsorgt. Folgend wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das dadurch neu entstandene Zellpellet wurde anschließend in 70 μ l Annexin-V-Puffer resuspendiert. Die Zelllösung wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 5 μ l Annexin sowie 7,5 μ l Propidiumiodid (Stock 2 mg/ml) versetzt. Nachfolgend wurden die Zellen im Dunkeln bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Vor Beginn der Messungen wurden je 500 μ l Annexin-V-Puffer in die Röhrchen gegeben und gevortext.

3.2.4 Klonogenitätstest

Zur Beurteilung des Langzeitwachstums der UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Inhibitorbehandlung, wurde ein Klonogenitätstest durchgeführt.

Die Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat, den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 sowie der Lösungskontrolle DMSO erfolgte mit den Dosierungen der IC_{50} -Werte bzw. dem 0,75-fachen des IC_{50} für die Kombinationstherapie. Nach 48-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Medium der 6-Well-Platten abgesaugt und jedes Well mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, wie oben beschrieben, vom Untergrund abgelöst. Die Suspension wurde 5 min bei 100 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert.

Mittels Zellzählung wurde die Zellzahl der jeweiligen DMSO-Kontrollen ermittelt, sodass das benötigte Suspensionsvolumen für die Aussaat von 500 Zellen pro 6-Well-Platte berechnet werden konnte. Diese wurden in jeweils neue Wells überführt und auf 2 ml mit Medium aufgefüllt. Bei den behandelten Ansätzen wurde die Zellzahl nicht bestimmt, sondern das Suspensionsvolumen der jeweiligen DMSO-Kontrolle für 500 Zellen ausgesät. Die Platten wurden anschließend für 1-2 Wochen unter Standardbedingungen inkubiert. Das Heranwachsen der Kolonien wurde in regelmäßigen Abständen überwacht.

Mittels Giemsa-Färbung konnten die gewachsenen Zellkulturen nach 1-2 Wochen gefärbt werden. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS gründlich abgesaugt worden war, konnten die Zellen zunächst mit einer 2 ml Mischung bestehend aus PBS und Methanol (Verhältnis 1:1) gewaschen werden. Anschließend wurde jedes Well für 10 min mit 2 ml Methanol zur Fixierung der Zellen befüllt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Methanol sorgfältig abgeschüttet und die Zellen wurden mit Hilfe einer Einmalpipette mit Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) bedeckt, geschwenkt und für ca. 2 min inkubiert. Die HBLAK-Zellen wurden für 4 h mit Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) bedeckt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Farblösung mit einer Einmalpipette abgenommen, Millipore-Wasser mit Hilfe einer Spritzflasche auf die Platte gegeben und sofort wieder abgeschüttet. Abschließend wurden die Platten > 10 min mit Leitungswasser bedeckt. Danach wurden die Platten mit den Kolonien getrocknet und eingescannt.

3.3 Analyse der Proteinexpression

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden zunächst 100.000 Zellen der Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C mit dem IC₅₀ der Wirkstoffe Mocetinostat, MC 180295, LDC 000067 sowie mit einer Kombination bestehend aus Mocetinostat und MC 180295 bzw. Mocetinostat und LDC 000067 für 24 h bzw. 48 h behandelt. Zur Herstellung der Extrakte wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit je 2 ml PBS gewaschen. Die 6-Well-Platte wurde auf Eis gelegt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1ml RIPA-

Puffer, 10 µl Protease-Inhibitor und 10 µl Phosphatase-Inhibitor hergestellt und die einzelnen Wells mit 50 µl beträufelt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und die Suspension mit einer Pipette in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Diese wurden gevortext und anschließend für 30 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wurden die Lysate für 5 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein vollständig beschriftetes Mikroreaktionsgefäß überführt.

3.3.2 BCA-Proteinbestimmung

Für die quantitative Proteinbestimmung musste zunächst eine Standardreihe hergestellt werden. Die für die Verdünnungsreihe benötigten Reagenzien BSA und RIPA-Puffer wurden immer wieder in einem gleichbleibenden Verhältnis weiterverdünnt, sodass sieben Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen entstanden (2000 µg, 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 63 µg, 32 µg). Zur Herstellung des BCA-Mixes wurden Reagenz B und A in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Pro Ansatz 4 µl Reagenz B und 196 µl Reagenz A.

Zu Beginn wurden von jeder Standardkonzentration Duplikate mit je 10 µl auf der 96-Well-Platte angelegt. Die Proteinproben wurden in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:5 mit RIPA-Puffer verdünnt und auf die 96-Well-Platte pipettiert. Hier wurden ebenfalls für jede Kondition Doppelwerte angelegt. Für das Anlegen der Nullwerte als Quadruplikate wurden 10 µl RIPA-Puffer pro Well verwendet. Im Anschluss wurde in jedes zuvor befüllte Well 200 µl des BCA-Mixes pipettiert. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde mit Hilfe des FluoStar OPTIMA der Firma BMG Labtech gemessen.

3.3.3 Western Blot

Die Durchführung eines Western Blots dient dem Nachweis von spezifischen Proteinen aus einem Proteingemisch. Dazu werden die Proteine entsprechend dem Molekulargewicht in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und lassen sich im weiteren Verlauf durch eine Antikörperdetektion nachweisen (*Burnette, 1980*).

Zur Vorbereitung der Proben war die Proteinkonzentration, welche zuvor mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurde, notwendig. Die Proben wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentrationen eingestellt, sodass ein Vergleich der später entstehenden Banden möglich war.

Im weiteren Verlauf wurden zwei verschiedene Gele für die Durchführung von Western Blots genutzt, um entsprechend kleine oder große Proteine ideal darstellen zu können. Die Tris-Glycin-Gele wurden zur Darstellung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 kDa genutzt. Hingegen wurden die Tris-Acetat-Gele der Firma Invitrogen für die Detektion von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 200 kDa verwendet.

3.3.3.1 Zusammensetzung der Tris-Glycin-Gele

Für die durchgeführten Western Blots wurden 6 %ige, 10 %ige und 12 %ige Polyacrylamid-Trenngele und ein Polyacrylamid-Sammelgel genutzt. Die Ansätze in den folgenden Tabellen ermöglichen die Herstellung zweier Gele (Tab. 14 und 15).

Tab. 14: Darstellung der Zusammensetzung der Trenngele. Die Zusammensetzung wird für das 6 %ige, 10 %ige und 12 %ige Trenngel in ml dargestellt. Herstellung zweier Gele aus einem Ansatz.

Komponenten	6 %iges Trenngel (ml)	10 %iges Trenngel (ml)	12 %iges Trenngel (ml)
H₂O	5,3	4	3,3
Acrylamide 30 %	2	3,3	4
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5
10 % SDS pH 7,2	0,1	0,1	0,1
10 % APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,005	0,005

Tab. 15: Darstellung der Zusammensetzung des Sammelgels.

Die Zusammensetzung wird in ml angegeben.

Komponenten	Volumen (ml)
H ₂ O	3,4
Acrylamide 30 %	0,83
1 M Tris pH 8,8	0,63
10 % SDS pH 7,2	0,05
10 % APS	0,05
TEMED	0,005

3.3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tris-Glycin-Gelen

Für die Gelelektrophorese wurden die zuvor hergestellten Gele mit Proteinproben mit einem Gesamtvolumen von 28 µl beladen. Die Proben bestanden aus 7 µl vierfachem Lämmli-Puffer, 12 µg der Proteinprobe und RIPA-Puffer, welcher verwendet wurde, um das Gesamtvolumen der Probe auf insgesamt 28 µl zu erhöhen. Somit wies jede Probe bei gleichem Gesamtvolumen dieselbe Konzentration an Protein auf. Anschließend wurden die Proteinproben bei 95 °C für 5 min denaturiert, und danach 10 s abzentrifugiert. Kurzzeitig wurden diese dann auf Eis gelagert, bevor jede Geltaschen mit je 28 µl befüllt wurde. Nachfolgend wurde die Elektrophoresekommer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Als Marker wurden, abhängig vom Gel, zwei verschiedene vorgefärbte Proteinleitern (Prestained Protein Marker, Thermo Scientific) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde auf Eis für ca. 30 min bei 100 V durchgeführt.

3.3.3.3 Proteintransfer (Tris-Glycin-Gel)

Für den Elektrotransfer wurde das Semi-Dry-Blot-System der Firma Bio-Rad verwendet. Vorbereitend wurden vier Whatman-Papiere (GE Healthcare Life Sciences) pro Membran in Blotting-Puffer geschwenkt. Die Membran wurde zugeschnitten, dann für 15 s in Methanol zur Aktivierung geschwenkt, anschließend für 2 min in Millipore-Wasser gewaschen und schließlich in Blotting-Puffer aufbewahrt. Für den Transfer wurden folgende Materialien in festgelegter Reihenfolge in die Schubladen des Semi-Dry-Blot-Systems gelegt. Zunächst wurden zwei Whatman-Papiere in eine Schale mit Blotting-

Puffer übertragen. Dann folgte die PVDF-Membran, das Gel und letztlich erneut zwei Whatman-Papiere. Anschließend wurde diese Schichtung in die Schublade des Semi-Dry-Blotting-Gerätes übertragen und von Luftblasen befreit. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde bei 800 mA für 15 bzw. 20 min durchgeführt.

3.3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Tris-Acetat-Gelen

Für die Auftrennung von großen Proteinen (> 200 kDa) wurden fertige 3-8 %ige Tris-Acetat-Gele und das NuPAGE™ Tris-Acetat-Kammersystem der Firma Invitrogen verwendet.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Proteinlysate auf Eis aufgetaut und entsprechend ihrer Konzentrationen mit vierfach LDS-Sample-Puffer und zehnfach Reducing-Puffer versetzt, sodass jede Probe 12 µg Protein und einfach vorliegende Puffer enthielt. Die Probe wurde mit RIPA-Puffer aufgefüllt, sodass jede dieser Proben ein Gesamtvolumen von 20 µl aufwies. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 10 min bei 70 °C erhitzt, anschließend kurz zentrifugiert und letztlich auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung des Kammersystems wurden die Geltaschen der fertigen Tris-Acetat-Gele dreimal mit 1x SDS-Running-Puffer gewaschen und die Kammer mit 1x SDS Running Puffer aufgefüllt. Als vorgefärbter Größenmarker wurden 15 µl des HiMark Pre-stained Protein Standards der Firma Invitrogen verwendet. Die Gelelektrophorese dauerte ca. 1,5 h bei konstanten 130 V.

3.3.3.5 Proteintransfer (Tris-Acetat-Gel)

Vorbereitend für den Nasstransfer wurde der 20-fach konzentrierte Blotting-Puffer der Firma Invitrogen einfach verdünnt und mit 10 % Methanol versetzt. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde zur Aktivierung 15 s in Methanol geschwenkt. Anschließend wurde diese für 2 min in Millipore-Wasser gewaschen und letztlich für weitere 5 min in Invitrogen-Blotting-Puffer aufbewahrt. Zeitgleich wurden vier Whatman-Papiere pro Membran in Blotting-Puffer der Firma Invitrogen geschwenkt. Die Nasstransfer-Kassette bestand aus einer weißen und einer schwarzen Seite. Die Kassette wurde wie folgt in einer

Schale, gefüllt mit Invitrogen-Blotting-Puffer, beladen: Auf die untenliegende schwarze Seite wurde zunächst ein Schwamm platziert. Anschließend wurden zwei Whatman-Papiere, dann das Gel und schließlich die Membran positioniert. Auf die Membran folgten noch zwei weitere Whatman-Papiere, sowie ein weiterer Schwamm auf der weißen Seite. Die final beladene Kassette wurde in eine Kammer der Firma Bio-Rad eingesetzt, die mit Invitrogen Blotting-Puffer befüllt war. Die Proteinübertragung erfolgte über ca. 2 h bei 180 mA.

3.3.3.6 Proteindetektion

Für die Blockierung der PVDF-Membran wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung, bestehend aus 5 %igem Milchpulver, gelöst in TBST, inkubiert. Der primäre Antikörper und die Membran wurden in eine Lösung, bestehend aus 1 % Milchpulver, gelöst in TBST, gegeben und zur Inkubation über Nacht im Kühlschrank rolliert. Nach 24 h wurde die Membran viermal für jeweils 10 min in TBST gewaschen und in einer entsprechenden Sekundärantikörperlösung (1 %iges Milchpulver in TBST) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde vor Beginn der Detektion weitere viermal für je 10 min in TBST gewaschen.

Zur Detektion der Proteine wurden die entsprechenden Membranen mit Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad) vollständig beträufelt und für 5 min bei Dunkelheit inkubiert. Die anschließende Detektion wurde mit Hilfe des Lumineszenz-Detektionsgerätes ChemiDoc der Firma Bio-Rad durchgeführt.

3.3.3.7 Stripping-Protokoll

Zu Beginn wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. Zur Lösung der Antikörper von der Membran wurde diese in einem Wasserbecken bei 50 °C für 30 min in einer Lösung aus 140 µl β-Mercaptoethanol und 20 ml Stripping-Puffer geschwenkt. Danach wurde die Membran zweimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und konnte im Anschluss im Kühlschrank bei 4° C in TBS-T gelagert werden.

3.4 RNA-Analyse

3.4.1 RNA-Extraktion

Die Isolation von RNA aus den UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1, die mit zwei verschiedenen CDK9i sowie mit DMSO behandelt wurden, erfolgte zur anschließenden Analyse mittels RNA-Sequenzierung.

Zunächst wurden 100.000 Zellen pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät und je vier technische Replikate pro Ansatz angelegt. Die Behandlung der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO und den CDK9i erfolgte nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach weiteren 48 h Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Extraktion der RNA mittels RNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA konnte bei -80°C gelagert werden. Unter Verwendung des Nano Drop 2000 der Firma Thermo Scientific konnte mittels Absorptionsspektroskopie die Konzentration der Proben bestimmt werden.

3.4.2 RNA-Sequenzierung

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit RNase freiem Wasser verdünnt, sodass jede Probe eine Konzentration von 250 ng/µl bei einem Volumen von 20 µl aufwies. Die Proben wurden dann zur Durchführung der RNA-Sequenzierung an das Biologisch-Medizinische Forschungslabor (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verschickt.

3.4.3 Auswertung der RNA-Sequenzierung

Im Anschluss wurden die Daten der RNA-Sequenzierung mit Hilfe des Programmes DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery der National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)) ausgewertet. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Venn-Diagramme und GO-Gruppen-Analysen verwendet.

Der Fold Change wurde zur Messung des Unterschieds in der Expression zwischen zwei verschiedenen Genen herangezogen. Dies war notwendig, um die Expression eines Gens genauer zu untersuchen, und berechnete sich, indem der Messwert einer Probe durch den des Referenzwertes geteilt wurde. Der berechnete Wert legte fest, ob ein Gen hoch- oder herunterreguliert wurde. Es ist auch eine logarithmische Angabe des Fold Change möglich (*Mariani et al., 2002; Schena et al., 1995*). Für die Auswertung der Ergebnisse wurden nur Gene eingebzogen, die mindestens einen Fold Change von 1,5 aufwiesen.

Die Bonferroni-Korrektur diente der Minimierung von Fehlern (vor allem Fehler 1. Art), wenn verschiedene statistische Tests gleichzeitig durchgeführt wurden. Um Fehler 1. Art zu vermeiden, teilte man das gewünschte Signifikanzniveau durch die Anzahl der Tests. Dies verminderte die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse (*Curtin & Schulz, 1998*). Für die Auswertung der Ergebnisse wurden nur Gene eingebzogen, die nach Bonferroni-Korrektur einen p-Wert von $\leq 0,05$ hatten.

3.5 Statistik

3.5.1 Dosis-Wirkungs-Kurven

Für die Auswertung der MTT-Tests sowie anderer Assays wurden Methoden der deskriptiven Statistik (Erstellung von Diagrammen und Tabellen, Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichung) verwendet. IC_{50} -Werte wurden mittels nicht-linearer logistischer Regressionsanalyse von Dosis-Wirkungs-Kurven mithilfe des Programms Quest Graph™ bestimmt.

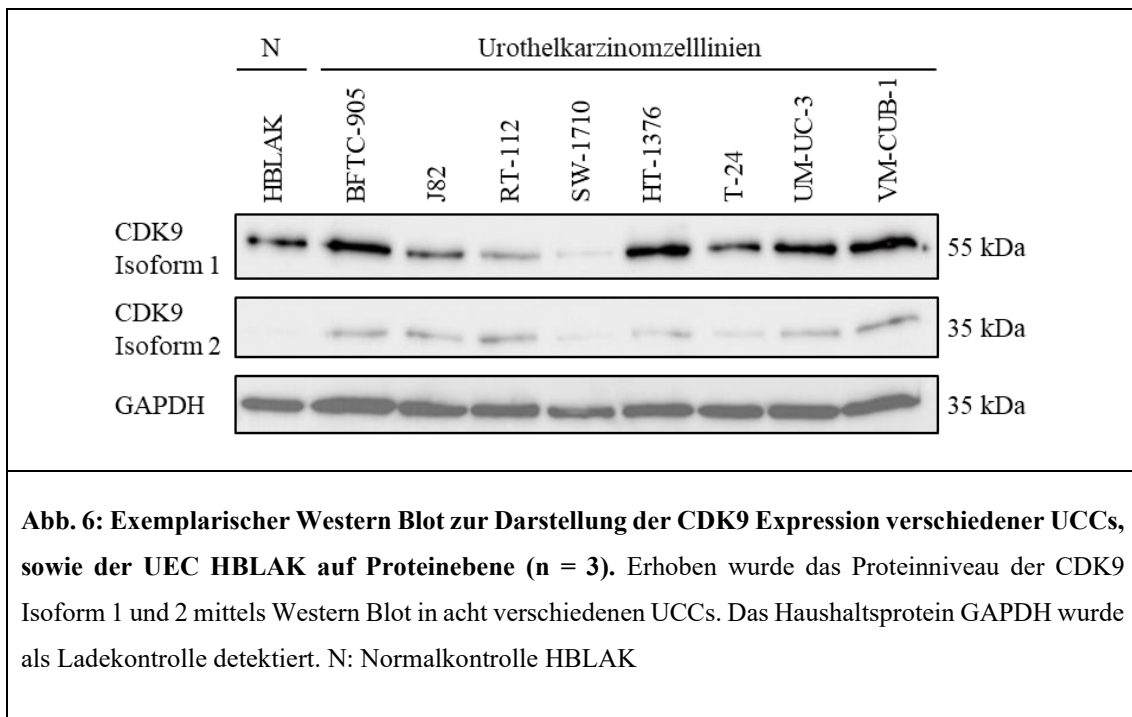
4 Ergebnisse

4.1 Expression von CDK9 in verschiedenen Urothelkarzinomzelllinien

Die zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen gehörende CDK9 begünstigt die mRNA-Transkription durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II. Zusätzlich ist CDK9 über die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren BRG1/SMARCA4, Komponenten des SWI/SNF-Chromatin-Umbau-Komplexes, an epigenetischen Regulationsmechanismen beteiligt. Der Einsatz von CDK9i hemmt also nicht nur die Transkription durch eine verminderte Aktivierung der RNA-Polymerase II, sondern greift auch in den Chromatin-Umbau ein (*Zhang et al., 2018*).

Da das generelle Expressionslevel von CDK9 für die Interpretation der Wirkung von CDK9i wichtig war, wurde dies zunächst in verschiedenen UCCs gemessen. Für die Analyse der Proteinexpression wurden die UCCs BFTC-905, J82, RT-112, SW-1710, HT-1376, T-24, UM-UC-3 und VM-CUB1 verwendet. Als Kontrollzelllinie wurde die immortalisierte UEC HBLAK mitgeführt.

Wie erwartet, konnte CDK9 in allen Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich starke Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Auffallend war, dass das Expressionsniveau der Isoform 1 durchgehend höher war als das der Isoform 2. Lediglich bei den Zelllinien RT-112 und SW-1710 schien kein Expressionsunterschied zwischen den Isoformen zu bestehen. Gleichzeitig zeigten diese beiden Zelllinien die niedrigste CDK9-Expression im Vergleich zur Kontrollzelllinie HBLAK. Auffallend war, dass die UEC HBLAK hauptsächlich eine Expression der CDK9-Isoform 1 zeigte. Eine Verstärkung der CDK9-Expression gegenüber J82, RT-112, HT-1376 ließ sich bei den UCCs BFTC-905, HT-1376, UM-UC-3 und VM-CUB-1 erkennen (Abb. 6). Aufgrund des hohen Expressionslevels beider Isoformen gegenüber den anderen UCCs wurden die UCCs VM-CUB-1 und die UCC UM-UC-3 für die weiteren Versuche verwendet. Die UEC HBLAK wurde als Kontrollzelllinie weiterverwendet. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet, welches in fast allen Geweben auf hohem Niveau exprimiert wurde und sich auch in diesem Western Blot sehr gleichmäßig exprimiert zeigte (Abb. 6).



4.2 Behandlung der UCCs und der UEC mit zwei CDK9i und einem HDACi

Die ausgewählten UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 sowie die Kontrollzelllinie HBLAK wurden im weiteren Verlauf mit den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 sowie dem HDACi Mocetinostat behandelt. Anschließend wurden die Inhibitoren in Hinblick auf ihre Auswirkungen auf die Zellen verglichen.

4.2.1 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50})

Die Bestimmung des IC_{50} stellt die Basis aller nachfolgenden Experimente dar. Die Zelllinien wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der unterschiedlichen Inhibitoren behandelt und für 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte ein MTT-Viabilitätstest. Aus den Ergebnissen des Tests konnten dann die IC_{50} -Werte bestimmt werden.

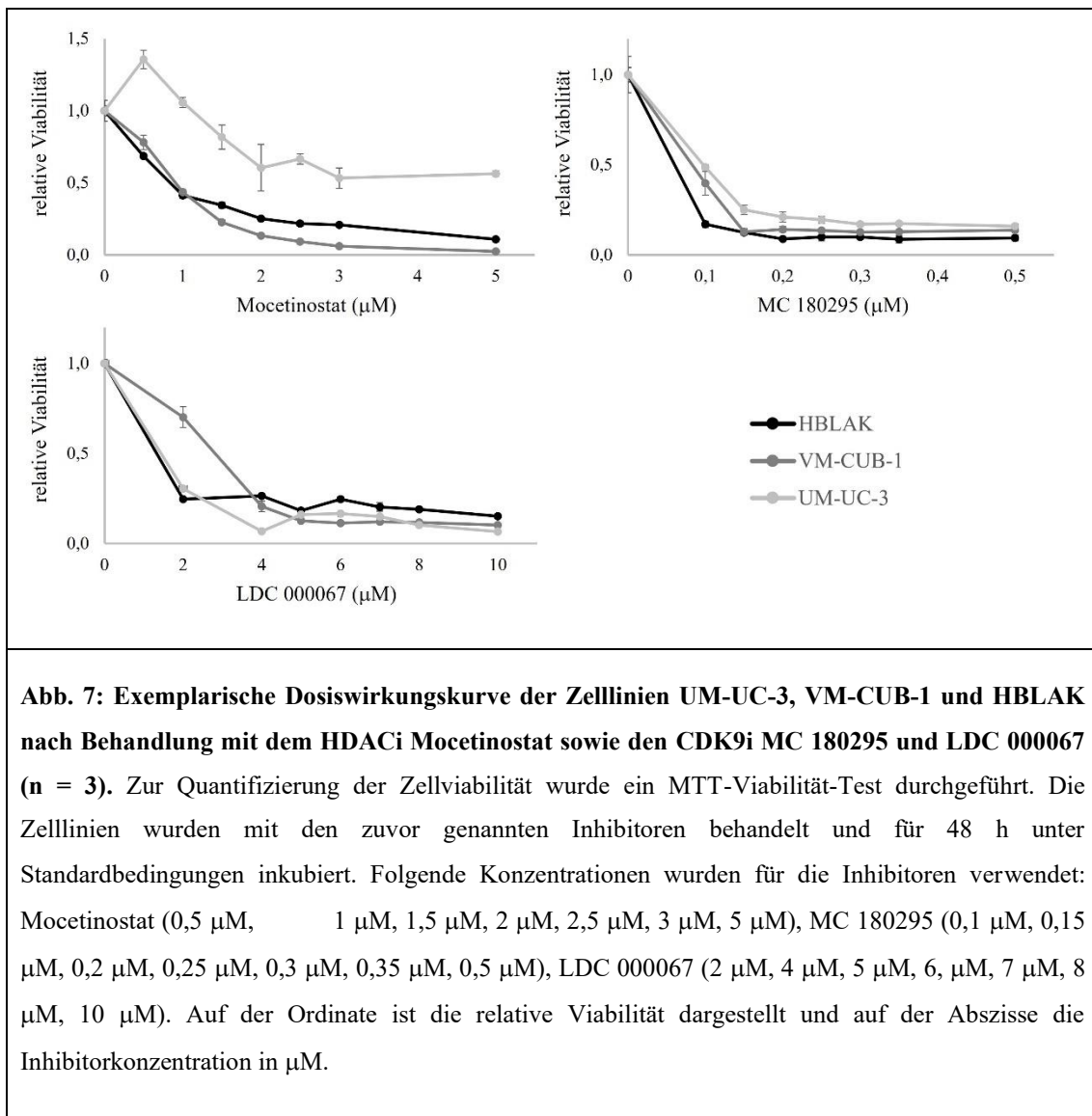
Ersichtlich wird, dass die unterschiedlichen Inhibitoren in allen drei Zelllinien die Viabilität beeinflussten. Mit steigender Konzentration der Inhibitoren nahm diese ab. Unterschiedlich war jedoch der Grad sowie die Dynamik dieser Viabilitätsveränderungen. Die Behandlung der Zelllinie UM-UC-3 mit dem HDACi Mocetinostat führte bei einer Konzentration von 0,5 μ M zunächst zu einer Viabilitätsverbesserung der Zellen um 36 % erkennen. Jedoch sank die relative Viabilität dieser Zellen mit steigender Konzentration der Substanz dann deutlich unter das Ausgangsniveau. Ihr Minimum erreichte die Dosis-Wirkungs-Kurve bei einer Konzentration von 3 μ M bei der noch 53 % der Zellen vital waren. Dieser Wert entspricht in etwa der mittleren inhibitorischen Konzentration. Trotz steigender Konzentration blieb die Viabilität konstant bei 50 %. Vergleichend zu UM-UC-3 zeigten die Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK schon bei niedrigeren Konzentrationen ein deutlich stärkeres Ansprechen auf Mocetinostat (Abb. 7).

Im Gegensatz zur UM-UC-3 ließ sich bei VM-CUB-1 zunächst kein Anstieg der Viabilität erkennen. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Viabilität mit Anstieg der Dosis (Abb. 7).

Die Kurve der Kontrollzelllinie HBLAK zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die von VM-CUB-1. Auch hier zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Viabilität mit dem Anstieg der Dosis (Abb. 7).

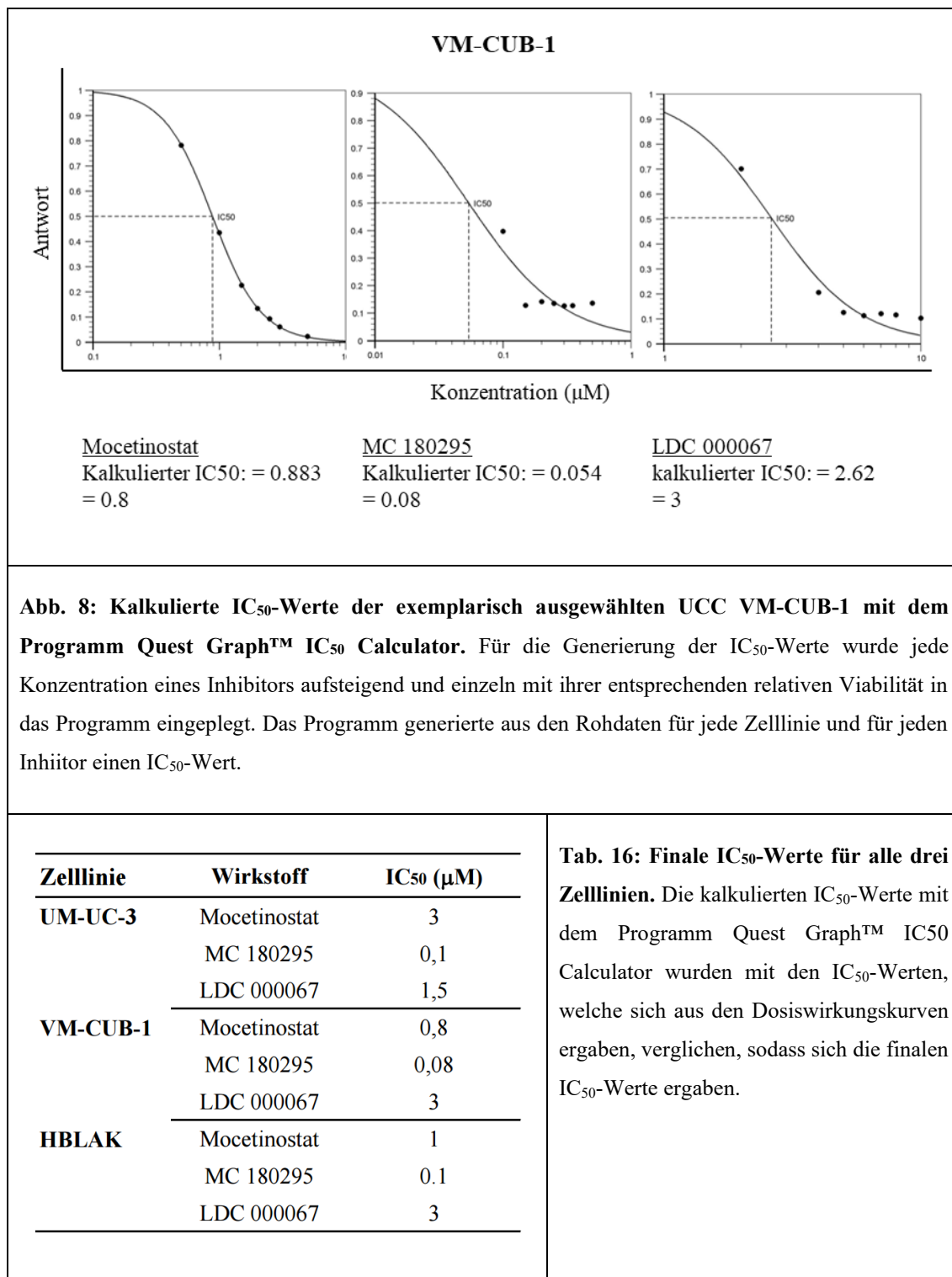
Die Behandlung der UCCs UM-UC-3 sowie VM-CUB-1 mit dem CDK9i MC 180295 führte schon bei sehr geringen Konzentrationen zu einer starken Abnahme der relativen Zellviabilität. Bei einer Konzentration von 0,1 μM waren noch 49 % der Zellen der UCC UM-UC-3 vital. Bei der UCC VM-CUB-1 hingegen waren bei 0,1 μM nur noch 40 % der Zellen vital. Ein stärkeres Ansprechen des Inhibitors ließ sich bei der Kontrollzelllinie HBLAK erkennen, denn bei einer Konzentration von 0,1 μM wies diese nur noch 17 % vitale Zellen auf. Auffallend war, dass eine weitere Steigerung der Konzentration von MC 180295 auf 0,15 μM die Viabilität der Zelllinie UM-UC-3 um weitere 24 % reduzierte. Anschließend sank die prozentuale Anzahl vitaler Zellen mit steigender Konzentration nur noch mäßig, sodass bei einer Konzentration von 0,3 μM ein Minimum von 17% vitaler Zellen erreicht wurde. Bei der Zelllinie VM-CUB-1 führte die Steigerung der Konzentration auf 0,15 μM zur Senkung der Viabilität auf 13 % (Abb. 7).

Bei der Behandlung der Zellen mit dem CDK9i LDC 000067 waren deutlich höhere Konzentrationen des Inhibitors notwendig, um ein Ansprechen auf die Zellen erkennen zu können. Es zeigte sich, dass die UCC UM-UC-3 weniger stark auf den Inhibitor reagierte und dass für einen ähnlichen Abfall der Viabilität im Vergleich zu VM-CUB-1 und HBLAK höhere Dosierungen notwendig waren. Insgesamt erschien die Kontrollzelllinie HBLAK weniger sensitiv im Vergleich zu den UCCs (Abb. 7).



Die Abbildung 8 zeigt beispielhaft die generierten Graphen für die UCC VM-CUB-1 nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat sowie nach Behandlung mit den CDK9i MC 180295 und LDC 000067. Die kalkulierten Werte wurden, mit denen aus der Dosis-Wirkungs-Kurve, verglichen. Je nachdem, wie gut die einzelnen Messwerte auf der Regressionskurve zu liegen kamen, waren die Werte mehr oder weniger exakt und übereinstimmend mit den extrapolierten Werten aus der MTT-Messung. Bei stärkerer Abweichung wie z.B. bei MC 180295 mussten die kalkulierten Werte an jene aus der Dosis-Wirkungs-Kurve angepasst werden. Die Tabelle 16 zeigt daher auch die final definierten IC_{50} -Werte, die für alle weiteren Experimente verwendet wurden. Erkennen ließ sich, dass MC 180295 schon in einem geringen Dosisbereich einen stärkeren Effekt auf die Vitalität der Zellen zeigte. Der andere CDK9i LDC 000067 benötigte für

denselben Effekt deutlich höhere Konzentrationen. Auffallend war, dass der HDACi Mocetinostat bei den Zelllinien HBLAK und VM-CUB-1 schon bei niedrigen Konzentrationen die Zellviabilität massiv beeinflusste, hingegen bei der Zelllinie UM-UC-3 deutlich höhere Konzentrationen für einen Effekt notwendig waren.



4.2.2 Synergistische Effekte durch die gleichzeitige Inhibition von CDK9 und HDAC-Enzymen der Klasse I

Basierend auf der Annahme, dass die Kombination des HDACi Mocetinostat in Kombination mit einem CDK9i (MC 180295 oder LDC 000067) zu einem synergistischen Effekt auf die Reduktion der Viabilität führen könnte, wurde ein MTT-Viabilitätstest über 48 h durchgeführt. Die UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 sowie die Kontrollzelllinie HBLAK wurden sowohl einzeln mit je einem der drei Inhibitoren als auch mit der Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 sowie Mocetinostat und LDC 000067 behandelt. Für die Kombinationen wurde immer ein Vielfaches des IC_{50} -Wertes verwendet. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden auch die Zellen, welche nur mit einem einzelnen Inhibitor behandelt wurden, mit dem entsprechenden Vielfachen des IC_{50} -Wertes behandelt.

Wie man der Abbildung 9 entnehmen kann, sprach die UCC UM-UC-3 bei den gewählten Dosierungen auf die Behandlung mit einem Inhibitor nur wenig an. Unter alleiniger Behandlung mit Mocetinostat wurde bei einem 0,75-fachen des IC_{50} -Wertes eine relative Zellviabilität von etwa 95 % erreicht. Schaute man sich die relative Zellviabilität für die beiden CDK9i isoliert an, war festzustellen, dass bei dem 0,75-fachen des IC_{50} -Wertes MC 180295 eine relative Viabilität von 110 % erreichte, es also zu einer Proliferation der Zellen kam. Auch LDC 000067 erreichte bei einem 0,75-fachen IC_{50} -Wert eine relative Zellviabilität von etwa 120 %. Die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 führte dagegen zu einer deutlich sichtbaren Abnahme der vitalen Zellen ab einer Kombination des 0,5-fachen des jeweiligen IC_{50} -Wertes. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Kurve bei der Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 (Abb. 9).

Die zweite UCC VM-CUB-1 zeigte einen ähnlichen Effekt auf die Kombinationsbehandlung wie UM-UC-3. Die HDAC- und die CDK9-Inhibition allein zeigten einen geringeren Effekt auf die Zellen als die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 bzw. Mocetinostat und LDC 000067. Die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 zeigte unter Verwendung des einfachen des IC_{50} -Wertes eine relative Zellviabilität von 30 %. Bei dieser Zelllinie war also die Kombination des HDACi mit LDC 000067 der mit MC 180295 überlegen (Abb. 9).

Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte auch unter der Kombinationsbehandlung die höchste Senkung der relativen Viabilität. Jedoch sank diese bei der Kombination aus Mocetinostat

und LDC 000067 nicht unter 65 %. Die Kombination mit MC 180295 war noch weniger effektiv, offensichtlich reagierten normale Uroepithelzellen weniger stark auf diese Kombination als Tumorzellen. Auffallend war, dass der HDACi Mocetinostat allein in allen drei Zelllinien den markantesten Effekt zeigte. Die CDK9i zeigten nur in Kombination mit dem HDACi einen ausreichenden Effekt auf die relative Viabilität der Zellen (Abb. 9).

Auf Basis dieses MTT-Tests wurde für alle folgenden Experimente mit Kombination aus HDACi und CDK9i der 0,75-fache IC_{50} verwendet. Für die Inhibitor-Monobehandlung wurde der einfache IC_{50} verwendet.

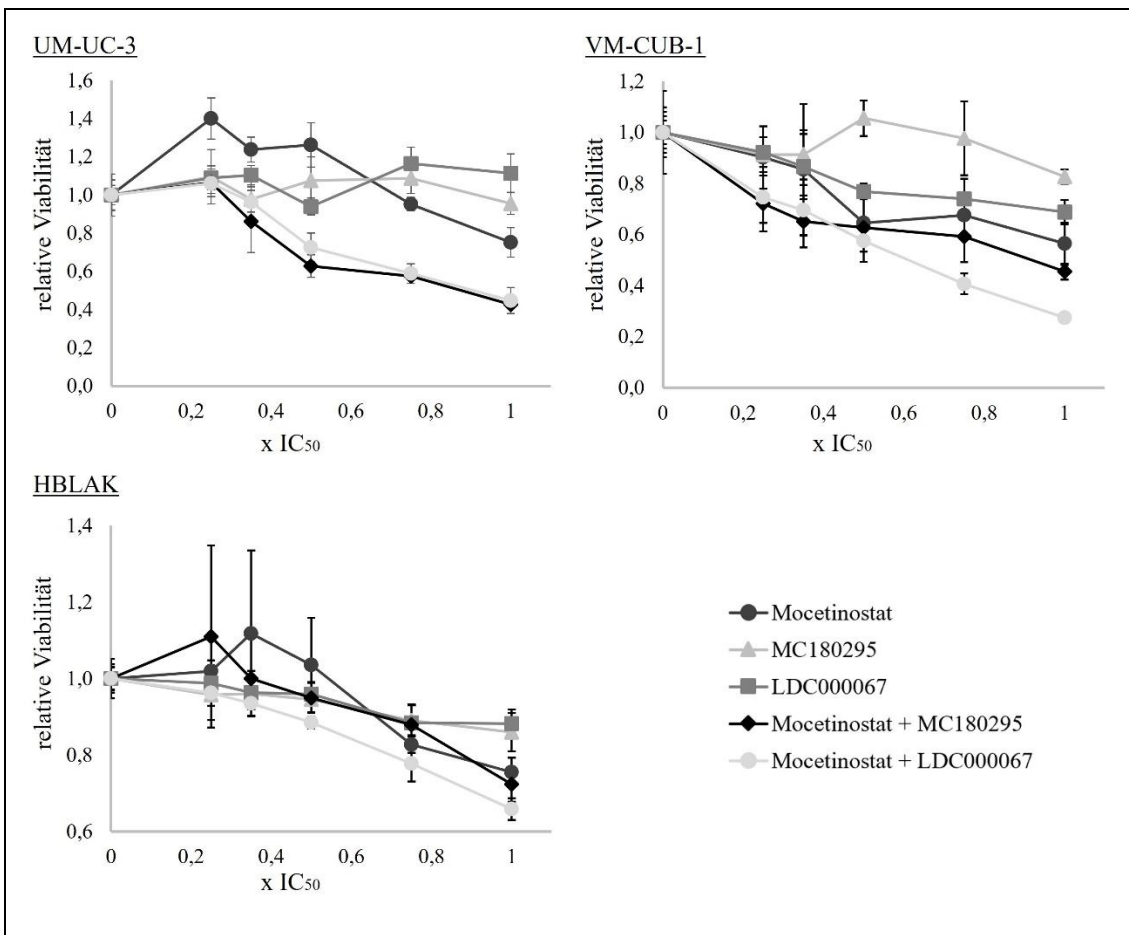


Abb. 9: Exemplarische Untersuchung der Kombinationen aus HDACi und einem der beiden CDK9i in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK (n = 3). Zur Feststellung der notwendigen Kombinationsdosis wurde ein MTT-Viabilität-Test durchgeführt. Die Zelllinien wurden mit den zuvor genannten Inhibitoren behandelt und für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Konzentration entsprach dem 0,25-, 0,35-, 0,5-, 0,75-, 1-fachen des zuvor bestimmten IC₅₀-Wertes der drei Inhibitoren. IC₅₀-Werte für UM-UC-3: Mocetinostat 3 µM, MC 180295 0,1 µM, LDC 000067 1,5 µM. IC₅₀-Werte für VM-CUB-1: Mocetinostat 0,8 µM, MC 180295 0,08 µM, LDC 000067 3 µM. IC₅₀-Werte für HBLAK: Mocetinostat 1 µM, MC180295 0,1 µM, LDC 000067 3 µM. Auf der Ordinate ist die relative Viabilität dargestellt und auf der Abszisse der x-fache IC₅₀-Wert des Inhibitors.

4.3 Quantifizierung kombinatorischer Effekte auf die Proliferation der Zellen

4.3.1 Auswirkungen der Kombination auf die Kurzzeitproliferation der Zellen

Zur weiteren Exploration eines synergistischen Effekts der Wirkstoffkombination aus einem HDAC-Inhibitor und einem CDK9-Inhibitor wurde eine Wachstumskurve erstellt. Diese wurde über 96 h für die UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 sowie für die UEC HBLAK mithilfe eines MTT-Viabilitätstests erstellt. Für die Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat sowie den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 wurde der einfache IC_{50} der jeweiligen Substanz verwendet. Für die Kombinationen aus Mocetinostat und MC 180295 sowie Mocetinostat und LDC 000067 wurde der 0,75-fache IC_{50} des jeweiligen Inhibitors verwendet.

Erkennen ließ sich, dass die drei Inhibitoren ein stark unterschiedliches Wirkungsprofil über einen Zeitraum von 96 h zeigten. Betrachtete man die Zeitkurven der Zelllinie UM-UC-3 fiel auf, dass die CDK9i MC 180295 und LDC 000067 kaum die Zellviabilität beeinflussten und die Zellen anfangs sogar besser proliferierten. Der HDACi Mocetinostat beeinflusste die Zellproliferation am stärksten und reduzierte nach 48 h die relative Zellviabilität um 50 %. Nach 72 h sank diese auf 2 %, sodass nach 96 h keine Zellen mehr vital waren. Es fiel auf, dass die CDK9i nur in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat eine Wirkung auf die Zellproliferation zeigten. Bereits nach 24 h zeigte sich ein Abfall der Viabilität um 34 % (Mocetinostat und MC 180295) bzw. um 22 % (Mocetinostat und LDC 000067). Die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 reduzierte die Anzahl der vitalen Zellen nach 48 h auf nur noch 29 %. Mit fortlaufender Zeit sank die Anzahl der vitalen Zellen weiter. Nach 72 h wurde eine Abnahme der Viabilität auf 4 % erreicht bzw. nach 96 h konnten keine vitalen Zellen mehr detektiert werden. Ähnlich verhielt es sich nach der Behandlung mit Mocetinostat und LDC 000067. Die relative Zellviabilität nahm nach 48 h um etwa 62 % ab. Im weiteren Verlauf sank diese weiter ab, sodass nach 96 h auch hier keine vitalen Zellen mehr aufzufinden waren (Abb. 10).

Die Zelllinie VM-CUB-1 zeigte sich weniger sensitiv auf die Inhibitorkombinationen. Die Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat ergab einen Verlust der Viabilität um 50 % nach 48 h und sank im Verlauf auf ein Minimum von 21 % (96 h). Die CDK9i zeigten ein stärkeres Ansprechen als bei der Zelllinie UM-UC-3, senkten die Zellviabilität jedoch nicht signifikant. Die relative Zellviabilität verringerte sich nach der Behandlung

mit MC 180295 innerhalb von 96 h auf ungefähr 80 %. Die Behandlung mit LDC 000067 ergab nach 96 h noch 56 % vitale Zellen. In der Zelllinie VM-CUB-1 war die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 der Monotherapie mit Mocetinostat zunächst nicht überlegen. Nach 96 h sank die Anzahl vitaler Zellen nach Kombinationsbehandlung auf 25 % und näherte sich dem Effekt der Monotherapie mit Mocetinostat an. Eine stärkere Abnahme der Zellviabilität auf 14 % wurde durch die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 nach 96 h erreicht (Abb. 10).

In der Kontrollzelllinie HBLAK fiel auf, dass unabhängig vom Inhibitor die Zellviabilität über 72 h sank, die Zellen dann jedoch wieder proliferierten. Die Monotherapie mit Mocetinostat führte innerhalb von 72 h zu einer Reduzierung der Zellviabilität auf ca. 37 %. Eine Abnahme der Zellviabilität konnte auch durch die Behandlung mit LDC 000067 erreicht werden. Nach 72 h sank die Anzahl lebensfähiger Zellen auf ungefähr 43 %. Die Behandlung mit MC 180295 hingegen reduzierte die Viabilität nur um 30 % nach vergangenen 72 h. Eine stärkere Abnahme der relativen Zellviabilität konnte durch die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 erreicht werden. Nach 72 h nahm die Anzahl der vitalen Zellen auf ca. 29 % ab und lag somit signifikant unter der relativen Lebensfähigkeit, die allein durch Mocetinostat erreicht werden konnte. Die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 führte zu keinem zusätzlichen Viabilitätsverlust und reduzierte diese nach 72 h lediglich auf etwa 45 % (Abb. 10).

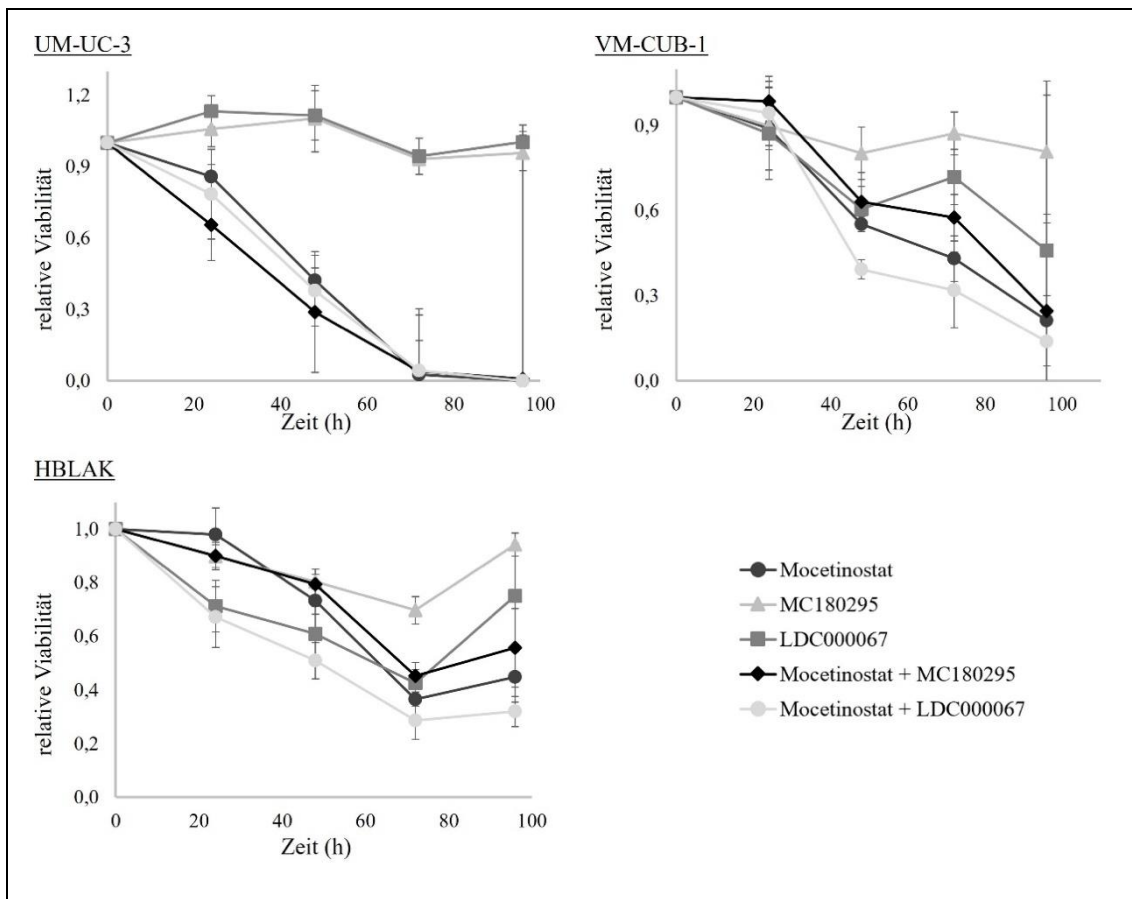


Abb. 10: Exemplarische Quantifizierung des Effektes der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf die Kurzzeitproliferation der Zelllinien UM-UC-1, VM-CUB-1 und HBLAK mit Hilfe eines MTT-Viabilitäts-Tests über 96 h (n = 3). Die Zelllinien wurden jeweils mit dem HDACi Mocetinostat, den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 sowie der Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 bzw. LDC 000067 behandelt. Für die Monobehandlung wurde der zuvor bestimmte einfache IC_{50} -Wert verwendet. Für die Kombinationsbehandlung wurde der 0,75-fache IC_{50} -Wert eines jeden Inhibitors verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Lösungsmittelkontrolle enthielt DMSO. Auf der Ordinate ist die relative Viabilität dargestellt, auf der Abszisse die Zeit in Stunden (h).

4.3.2 Auswirkung der Kombination auf die Langzeitproliferation der Zellen

Zur qualitativen Kontrolle des Effektes der verschiedenen Inhibitoren auf die Langzeitproliferation wurde ein Klonogenitäts-Test durchgeführt.

Die langfristige Proliferationsfähigkeit der Zelllinie UM-UC-3 wurde am stärksten durch den HDACi Mocetinostat beeinflusst. Nach ein bis zwei Wochen konnte unter der Behandlung mit Mocetinostat keine Proliferation mehr festgestellt werden. Unter der Behandlung mit dem CDK9i MC 180295 bzw. LDC 000067 war die Langzeitproliferation nur wenig bis gar nicht eingeschränkt (Abb. 11). Nach der kombinierten Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat und einem der beiden CDK9i war auch keine Koloniebildung festzustellen.

Die Zelllinie VM-CUB-1 zeigte unter Monobehandlung mit Mocetinostat oder MC 180295 keinen signifikanten Einfluss auf die Langzeitproliferation. Lediglich nach der Behandlung mit LDC 000067 nahm die Proliferation der Kolonien etwas ab. Die Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 bzw. LDC 000067 zeigte den stärksten Effekt auf die Langzeitproliferation und schränkte die Koloniebildung besonders stark ein (Abb. 11). Hier lässt sich ein synergistischer Effekt durch die Inhibitorkombination vermuten.

In der Kontrollzelllinie HBALK zeigte sich keine signifikante Veränderung der langfristigen Proliferation. Lediglich nach Behandlung mit Mocetinostat und LDC 000067 ließ sich eine mäßig eingeschränkte Proliferation erkennen (Abb. 11). Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum von normalen Zellen durch die Kombinationsbehandlung weniger stark beeinträchtigt wurde. Mit Hinblick auf die Normaltoxizität war dies ein positiver Befund.

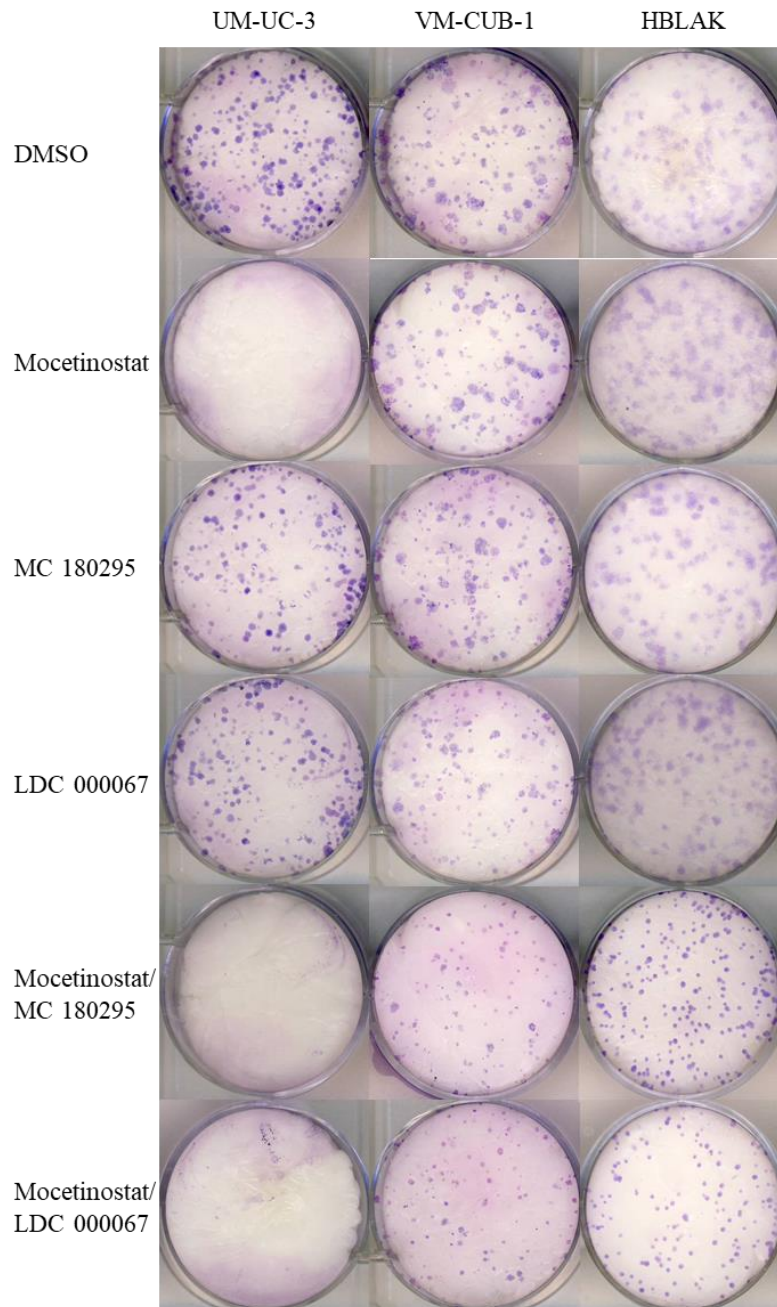
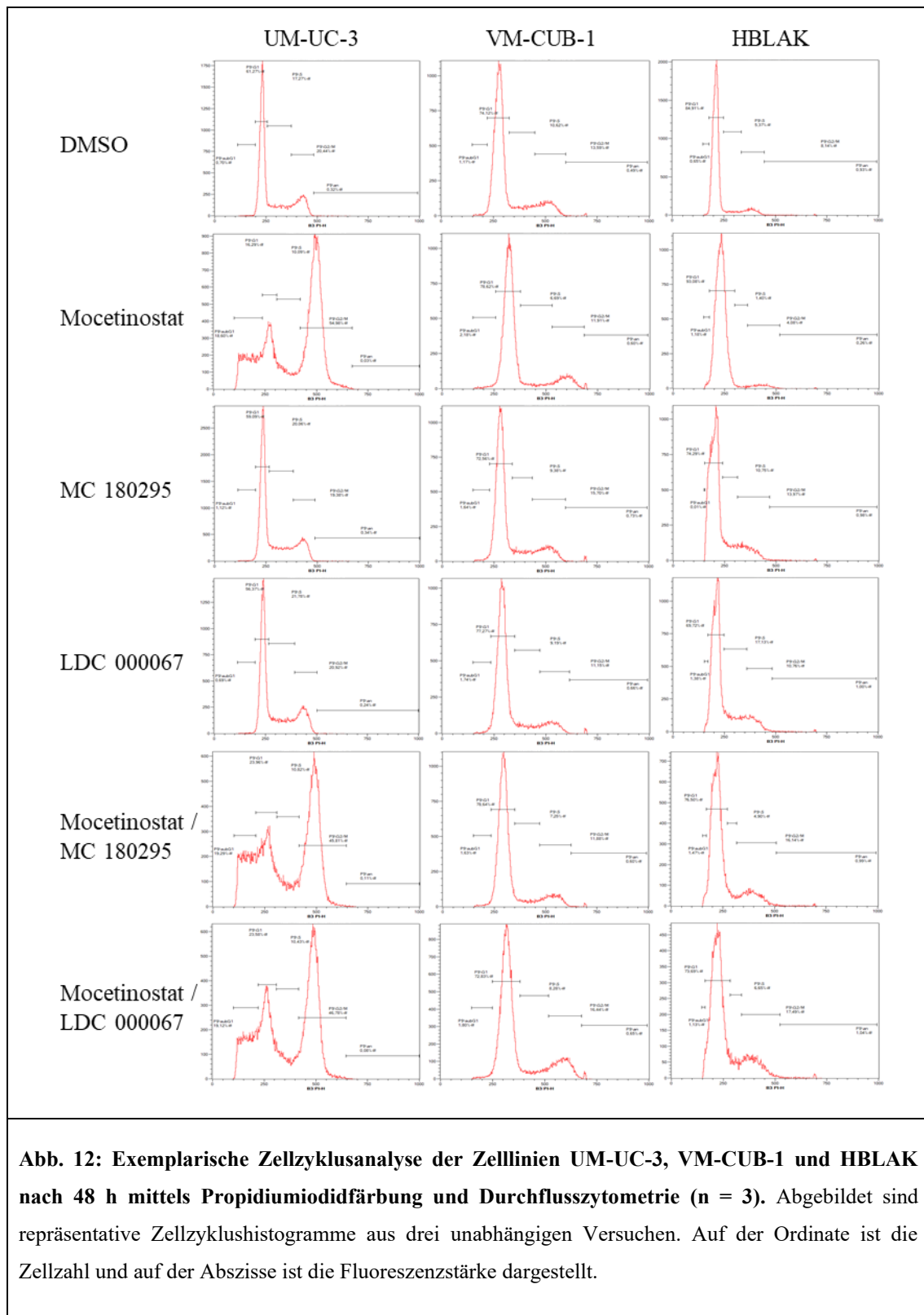


Abb. 11: Exemplarische Exploration der langfristigen Proliferationsfähigkeit der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat und den CDK9i MC 180295 bzw. LDC 000067 mittels Klonogenitäts-Tests (n = 3). Für die Monobehandlung der Zellen wurde der einfache IC₅₀-Wert und für die Kombination wurde der 0,75-fache IC₅₀-Wert verwendet. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen für 48 h inkubiert. Die Zellzahl der jeweiligen DMSO-Kontrollen wurde benötigt, um das Suspensionsvolumen für die Aussaat von 500 Zellen pro 6-Well-Platte zu berechnen. Für die behandelten Ansätze wurde das gleiche Suspensionsvolumen, entsprechend der jeweiligen DMSO-Kontrolle für 500 Zellen, ausgesät. Die Platten wurden für ein bis zwei Wochen inkubiert. Dargestellt sind Fotos der Kolonien nach Fixierung und Färbung mittels Giemsa-Färbung.

4.4 Einfluss des HDACi und der CDK9i auf den Zellzyklus

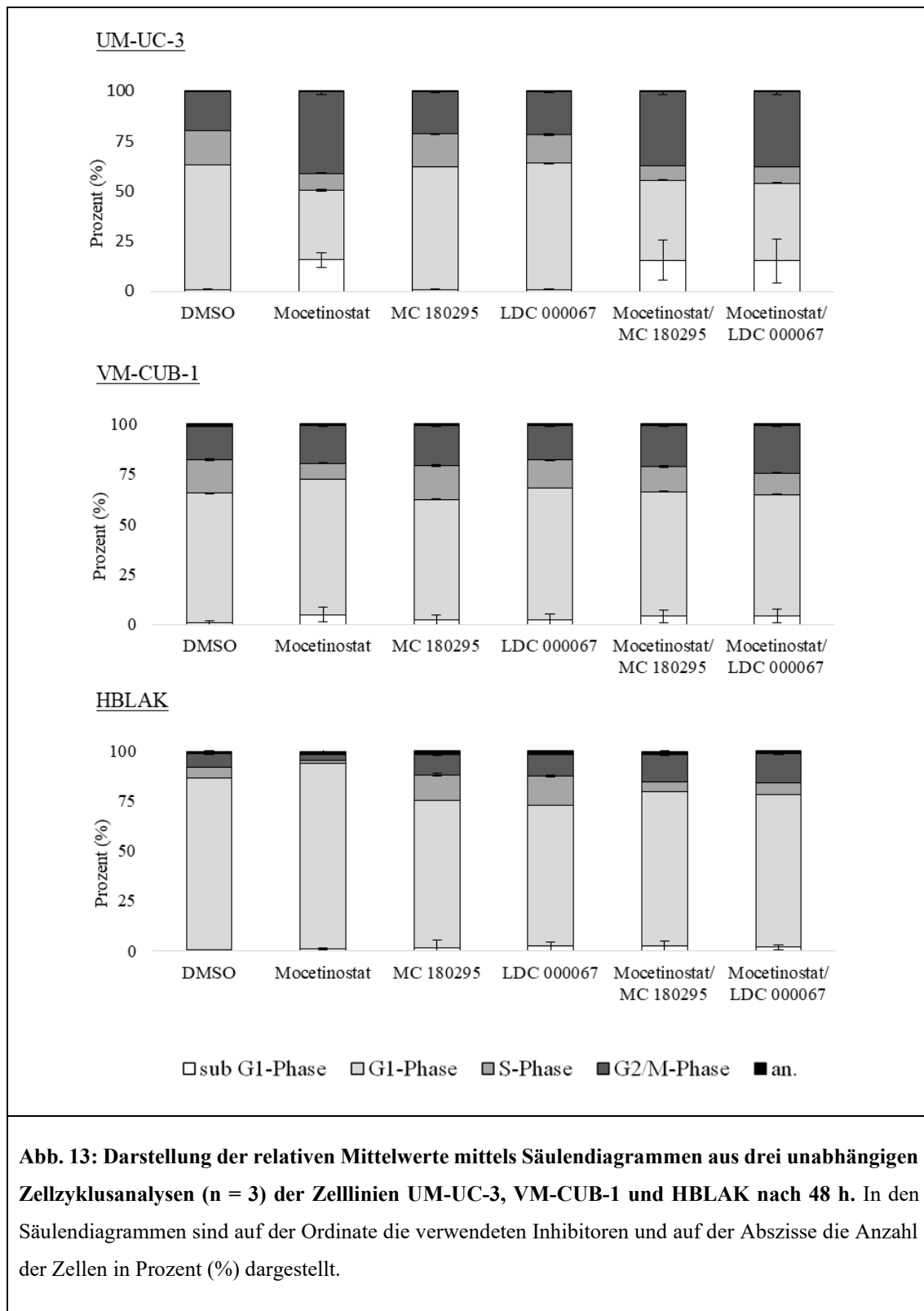
Zur Quantifizierung der Effekte durch die verwendeten Inhibitoren auf den Zellzyklus wurde ein Durchflusszytometrieverfahren angewandt. Anhand der Verteilung der Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphase ließen sich genauere Aussagen beispielsweise über die Ursache einer veränderten Langzeitproliferation treffen.

In der Zellzyklusanalyse der UCC UM-UC-3 konnte nach 48 h unter Behandlung mit Mocetinostat eine deutliche Anreicherung der Zellen in der sub-G1-Phase sowie G2/M-Phase, vergleichend zur DMSO-Kontrolle, festgestellt werden. Dies präsentierte sich in einem unregelmäßigen Zellzyklusprofil (Abb. 12 und 13). Die Behandlung mit den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 führte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu keinem signifikanten Zellzyklusarrest. Im direkten Vergleich der beiden CDK9i fiel eine Zunahme um 2 % in der G1-Phase unter dem Inhibitor LDC 000067 auf (Abb. 12 und 13). Die Zellzyklusprofile nach Behandlung mit der Kombination aus HDACi und CDK9i ähnelten dem Profil nach Mocetinostat-Behandlung. Lediglich die prozentuale Verteilung der Zellen in der G1-Phase und der G2/M-Phase unterschied sich. Während unter alleiniger HDAC-Inhibition 35 % der UCC UM-UC-3 sich im G1-Arrest befanden, reicherten sich 41 % der Zellen in der G2/M-Phase an. Die Behandlung mit Mocetinostat und MC 180295 führte zu 5 % mehr Zellen in der G1-Phase und zeigte eine leichte Reduzierung der Zellzahl in der G2/M-Phase (37 %). Eine ähnliche Zellzyklusverteilung ergab auch die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 (Abb. 12 und 13). Die Zellzyklusprofile der Zelllinie VM-CUB-1 zeigten nach einer Inkubationszeit von 48 h im Vergleich zur DMSO und zur Zelllinie UM-UC-3 keine signifikanten Unregelmäßigkeiten (Abb. 12 und 13). Nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat ließ sich eine deutliche Erhöhung der G1-Fraktion feststellen. Außerdem stieg der prozentuale Anteil der sub-G1-Fraktion unter jedem Inhibitor im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht an. Die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 führte zu einer relativen Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase (Abb. 12 und 13). Die Zellzyklusanalyse der Kontrollzelllinie HBLAK ergab nach Behandlung mit Mocetinostat eine Anreicherung der Zellen in der G1-Phase. Die beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 führten hingegen zu einem Zellanstieg in der S-Phase sowie zu einem relativen Zuwachs in der G2/M-Phase. Die Kombination aus dem HDACi Mocetinostat und einem der beiden CDK9i führte in beiden Fällen zu einer leichten Erhöhung der G2/M-Fraktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 12 und 13).



Die gemittelten Werte der drei unabhängig durchgeführten Zellzyklusanalysen wurden nachfolgend als gestapelte Balkendiagramme dargestellt (Abb. 13). Ersichtlich war, dass

in den UCCs im Wesentlichen der Effekt des HDACi Mocetinostat überwog, da bei der kombinierten Inhibition aus HDACi und CDK9i keine weitreichenden zusätzlichen Zykluseffekte sichtbar wurden (Abb. 13).



4.5 Einfluss der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf die Apoptose-Induktion

4.5.1 Darstellung der Apoptose-Induktion mittels Annexin-V-PI-Test

Um die zugrunde liegenden Mechanismen für die Reduktion der Zellviabilität sowie die Auswirkung auf die Kurz- bzw. Langzeitproliferation durch die Inhibitoren genauer zu bestimmen, wurde zusätzlich die Induktion der Apoptose mit Hilfe eines Annexin-V-PI-Tests analysiert. Die Methode ließ eine Unterscheidung in vitale, nekrotische sowie früh- und spät-apoptotische Zellen zu.

Die UCC UM-UC-3 zeigte unter Mocetinostat eine signifikante Reduktion der vitalen Zellpopulationen um 22 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Vorwiegend zeigte sich eine Anreicherung frühapoptotischer Zellen (18 %), aber auch der Anteil spätapoptotischer Zellen stieg um 5 % im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle (Abb. 14 und 15). Der CDK9i MC 180295 erreichte eine mäßige Reduktion der vitalen Zellpopulationen auf etwa 89 % im Vergleich zu Mocetinostat und der DMSO-Kontrolle. MC 180295 führte zu einer stärkeren Zunahme der spät-apoptotischen Zellen im Vergleich zu Mocetinostat. Hingegen blieb der Anteil der früh-apoptotischen Zellen niedrig. Der zweite CDK9i LDC 000067 zeigte keine relevanten Auswirkungen auf die Apoptoseinduktion. (Abb. 14 und 15). Die Kombination aus Mocetinostat und einem der beiden CDK9i führte nicht zu einer gesteigerten Induktion der Apoptose. Die Punktdiagramme der Kombinationstherapie ähnelten dem der Monotherapie mit Mocetinostat (Abb. 14).

Die zweite UCC VM-CUB-1 zeigte im Gegensatz zur UM-UC-3 ein weniger zufriedenstellendes Ansprechen auf den HDACi Mocetinostat, jedoch ein deutlich besseres Ansprechen auf die Behandlung mit den CDK9i MC 180295 und LDC 000067. Unter Behandlung mit Mocetinostat sank der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Vor allem der Anteil früh-apoptotischer Zellen stieg (Abb. 14 und 15). Die CDK9i MC 180295 und LDC 000067 führten auch zu einer Abnahme vitaler Zellen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und Mocetinostat kam es unter CDK9-Inhibition vor allem zum Anstieg spät-apoptotischer Zellen (Abb. 14 und 15). Im Vergleich zur UCC UM-UC-3 ließ sich nach Behandlung mit LDC 000067 in der UCC VM-CUB-1 eine stärkere Apoptoseinduktion erkennen (Abb. 14 und 15). Nach kombinierter Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat und dem CDK9i MC 180295 konnte eine zusätzliche

Reduktion der vitalen Zellen im Vergleich zur Monobehandlung nachgewiesen werden. Diese Kombination zeigte in der UCC VM-CUB-1 im Vergleich zur UCC UM-UC-3 und zur UEC HBLAK die prägnanteste Induktion der Apoptose (Abb. 14 und 15). Auch die kombinierte Behandlung aus Mocetinostat und LDC 000067 ließ im Vergleich zur Monobehandlung einen positiven synergistischen Effekt auf die Reduktion vitaler Zellen in der UCC VM-CUB-1 erkennen. Im Vergleich zur UCC UM-UC-3 ist hier eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen zu erkennen (Abb. 14 und 15).

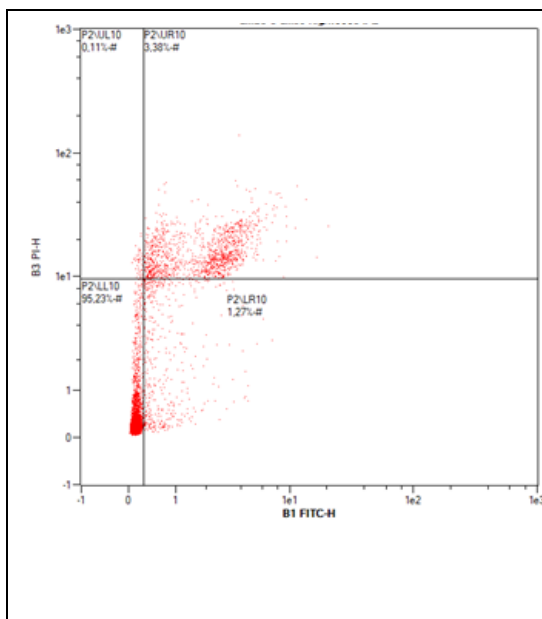
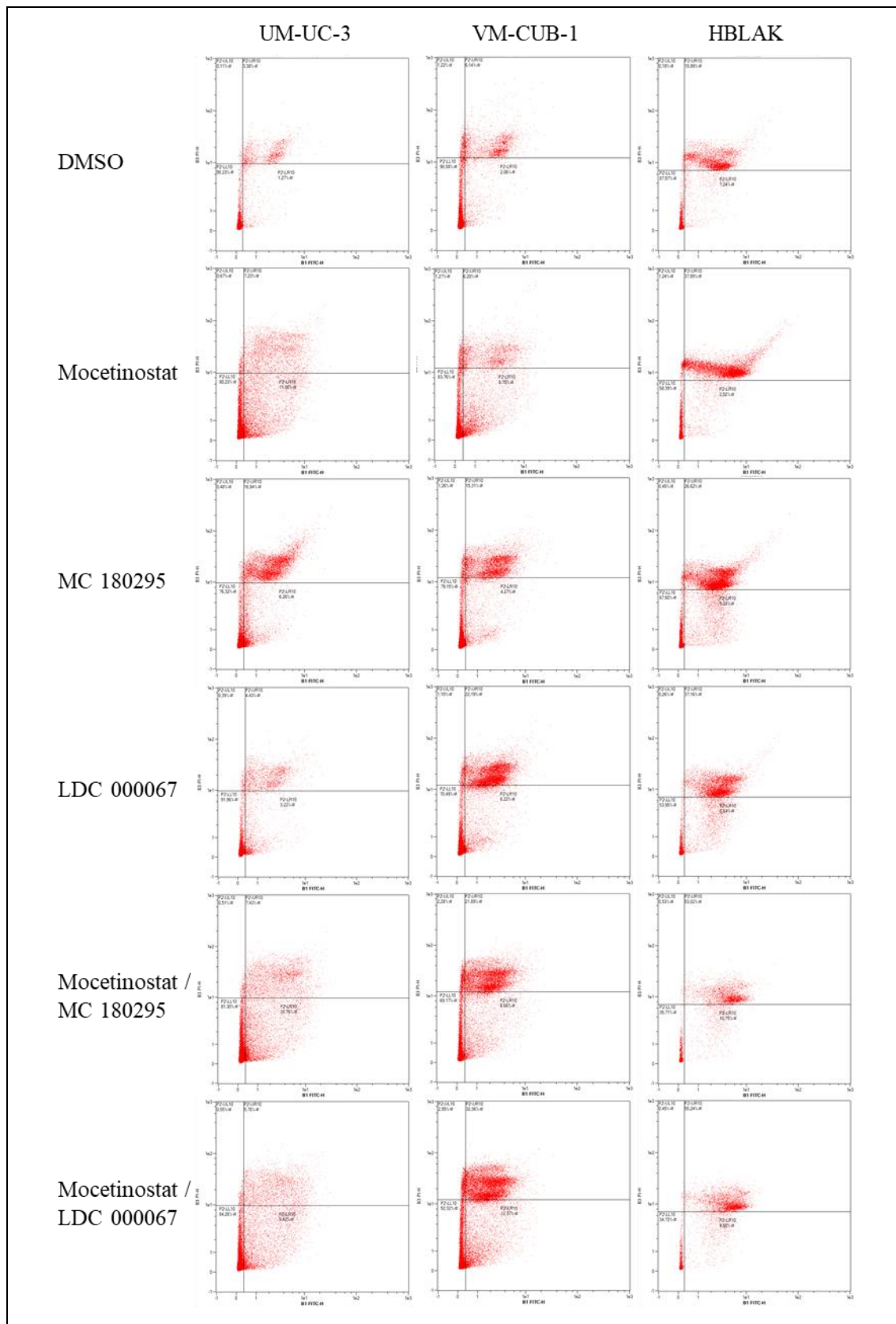


Abb. 14: Exemplarischer Annexin-V-PI-Test der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Annexin-V- und Propidiumiodid-Färbung. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (n = 3). Abgebildet sind repräsentative Punktdiagramme aus drei unabhängigen Versuchen. Auf der Ordinate ist die PI Fluoreszenz und auf der Abszisse ist die Annexin Fluoreszenz dargestellt. Unten links: vitale Zellen, unten rechts: früh-apoptotische Zellen, oben rechts: spät-apoptotische Zellen, oben links: nekrotische Zellen.



Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte im Vergleich zu den UCCs bereits in der DMSO-Kontrolle einen Anstieg der Apoptose-Induktion. Nach 48-stündiger Inkubation konnten noch 75 % vitale Zellen nachgewiesen werden. Der quantitativ größte Anstieg konnte im Bereich der spät-apoptotischen Zellen verzeichnet werden. Dieser Effekt ließ sich signifikant durch die Behandlung mit den Inhibitoren verstärken. Die Behandlung mit Mocetinostat führte zu einem weiteren Anstieg der spät-apoptotischen Fraktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 14 und 15). Im Vergleich zu den mit Mocetinostat behandelten UCCs ließ sich in der Kontrollzelllinie eine deutliche Reduktion der vitalen Zellen erkennen. Auch die Behandlung mit den CDK9i MC 180295 sowie LDC 000067 führte zu einer weiteren Abnahme der vitalen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Hier zeigte sich nach Behandlung mit MC 180295 ein deutlich stärkerer Effekt auf die Apoptoseinduktion als nach Behandlung mit LDC 000067. Die CDK9i führten, genauso wie der HDACi Mocetinostat, hauptsächlich zu einer Zunahme der spät-apoptotischen Zellen. Bei der kombinierten Behandlung aus HDCAi und CDK9i konnte auch in der Kontrollzelllinie HBLAK eine leichte Zunahme der Apoptoseinduktion festgestellt werden. Die Behandlungskombination aus Mocetinostat und MC 180295 bzw. LDC 000067 bildete eine stärkere Abnahme vitaler Zellen als nach Monotherapie ab. Auch hier zeigte sich hauptsächlich ein Anstieg im Bereich der spät-apoptotischen Fraktion. Im direkten Vergleich zu den UCCs war ein signifikanter Anstieg der Apoptose-Induktion, sowohl nach Monotherapie als auch nach Kombination der Inhibitoren, zu erkennen. Zudem ließ unter Kombinationsbehandlung mit HDACi und CDK9i eine leichte Zunahme der Apoptoseinduktion erkennen (Abb. 14 und 15).

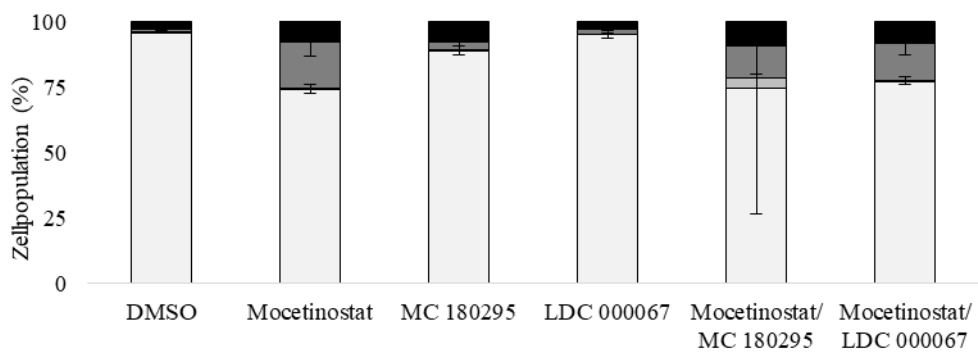
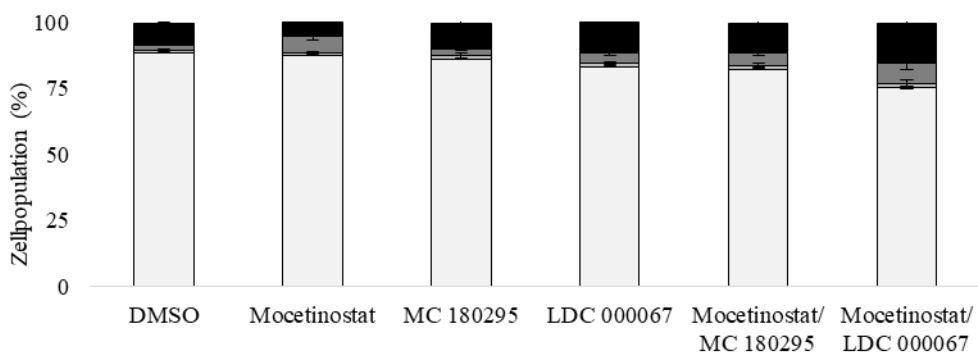
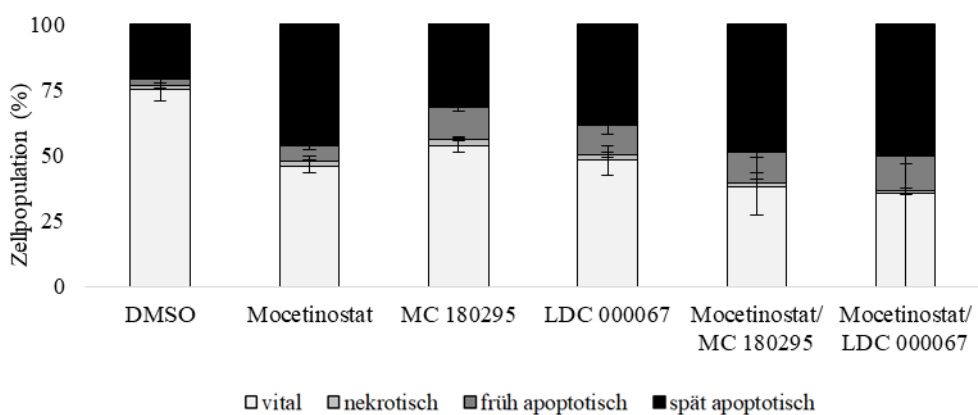
UM-UC-3VM-CUB-1HBLAK

Abb. 15: Darstellung der relativen Mittelwerte mittels Säulendiagrammen aus drei unabhängigen Annexin-V-PI-Tests ($n = 3$) der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h. In den Säulendiagrammen sind auf der Ordinate die verwendeten Inhibitoren und auf der Abszisse die Anzahl der Zellen in Prozent (%) dargestellt.

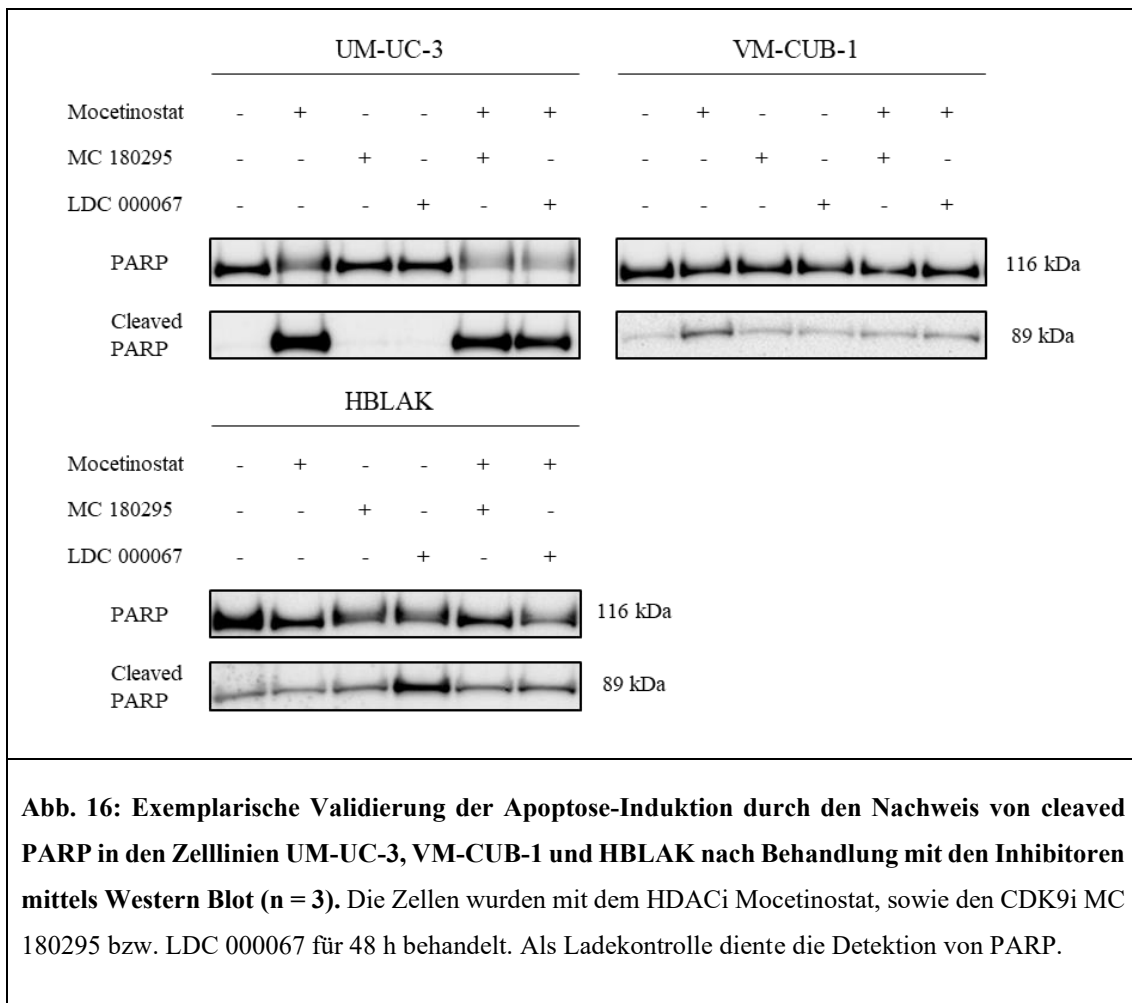
4.5.2 Validierung der Apoptose-Induktion mittels PARP-Spaltung

Zur Validierung der Apoptose-Induktion wurde das Vorkommen der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP) bzw. des nach PARP-Spaltung erzeugten C-terminalen Fragments (cleaved PARP) mittels Western Blot bestimmt. Cleaved PARP gilt als prominenter Marker für die Apoptose. PARP ist ein bedeutender Bestandteil in der Reparatur von DNA-Schäden und wird in apoptotischen Zellen durch verschiedene Caspasen in inaktive Untereinheiten fragmentiert (*Soldani & Scovassi, 2002*).

In den Zellen der UCC UM-UC-3 konnte 48 h nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltung festgestellt werden. Auch bei der kombinierten Behandlung aus Mocetinostat und einem CDK9i (MC 190295 oder LDC 000067) konnte cleaved PARP nachgewiesen werden. Nach alleiniger CDK9-Inhibition konnte kein cleaved PARP detektiert werden (Abb. 16).

Die Behandlung der UCC VM-CUB-1 mit Mocetinostat zeigte auch einen signifikanten Nachweis zunehmender PARP-Spaltung. Allerdings war hier der Effekt merklich geringer als in der UCC UM-UC-3. Hingegen erbrachte die Behandlung mit CDK9i allein bzw. die Kombination aus HDACi und CDK9i eine nur mäßige Steigerung der Apoptose-Induktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 16).

Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch in den behandelten Reihen eine Induktion der Apoptose. Eine Zunahme der PARP-Spaltung ließ sich vor allem nach Behandlung mit LDC 000067 erkennen (Abb. 16).



4.5.3 Regulation antiapoptotischer Proteine nach HDAC- und CDK9-Inhibition

Zur weiteren Klärung der bisher nachgewiesenen Apoptoseinduktion wurden im Anschluss Expressionsveränderungen in verschiedenen Apoptoseregulatoren untersucht. Dazu wurde die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 mittels Western Blot nachgewiesen. Bcl-2 ist in malignen Tumoren häufig überexprimiert und schützt die Zellen vor dem programmierten Zelltod (*Dietrich, 2008*).

In allen drei Zelllinien ließ sich die Expression des antiapoptotischen Proteins nachweisen. Lediglich in der UCC UM-UC-3 ließ sich nach kombinierter Behandlung mit Mocetinostat und LDC 000067 eine Reduktion der Expression von Bcl-2 erkennen. Insgesamt zeigte sich, dass weder die Behandlung der Zellen mit einem HDACi bzw. einem CDK9i allein noch die Kombination aus beiden eine signifikante Reduktion der Bcl-2-Expression zur Folge hatte (Abb. 17).

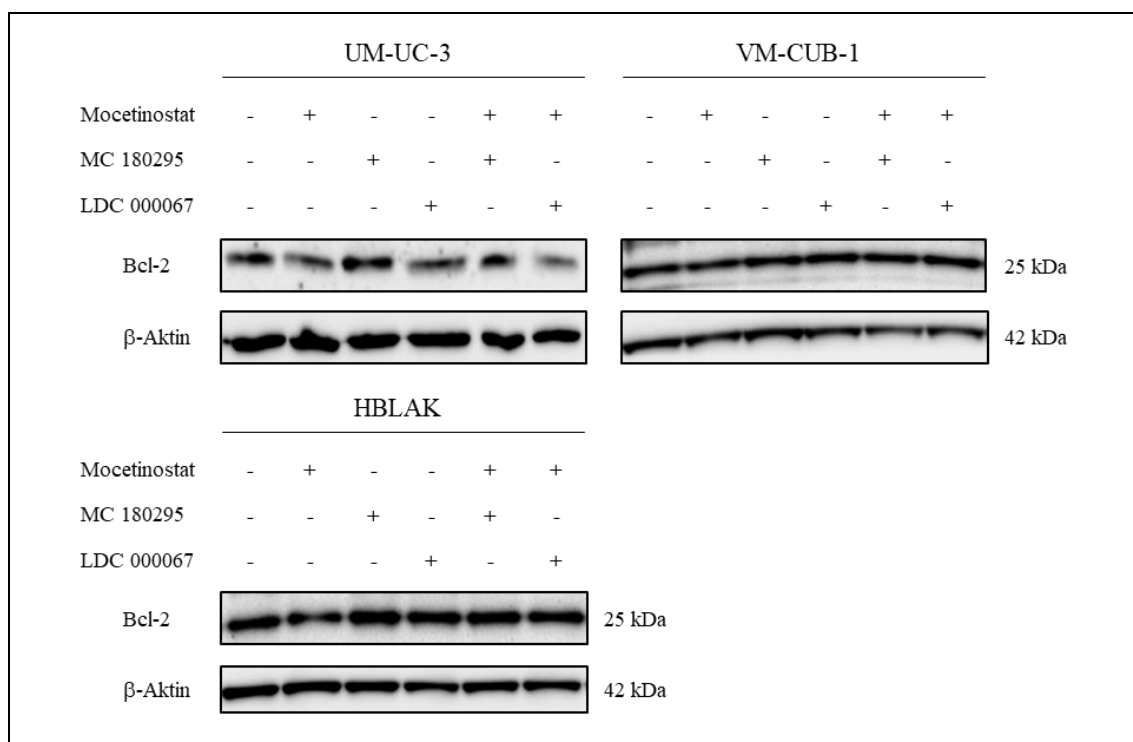


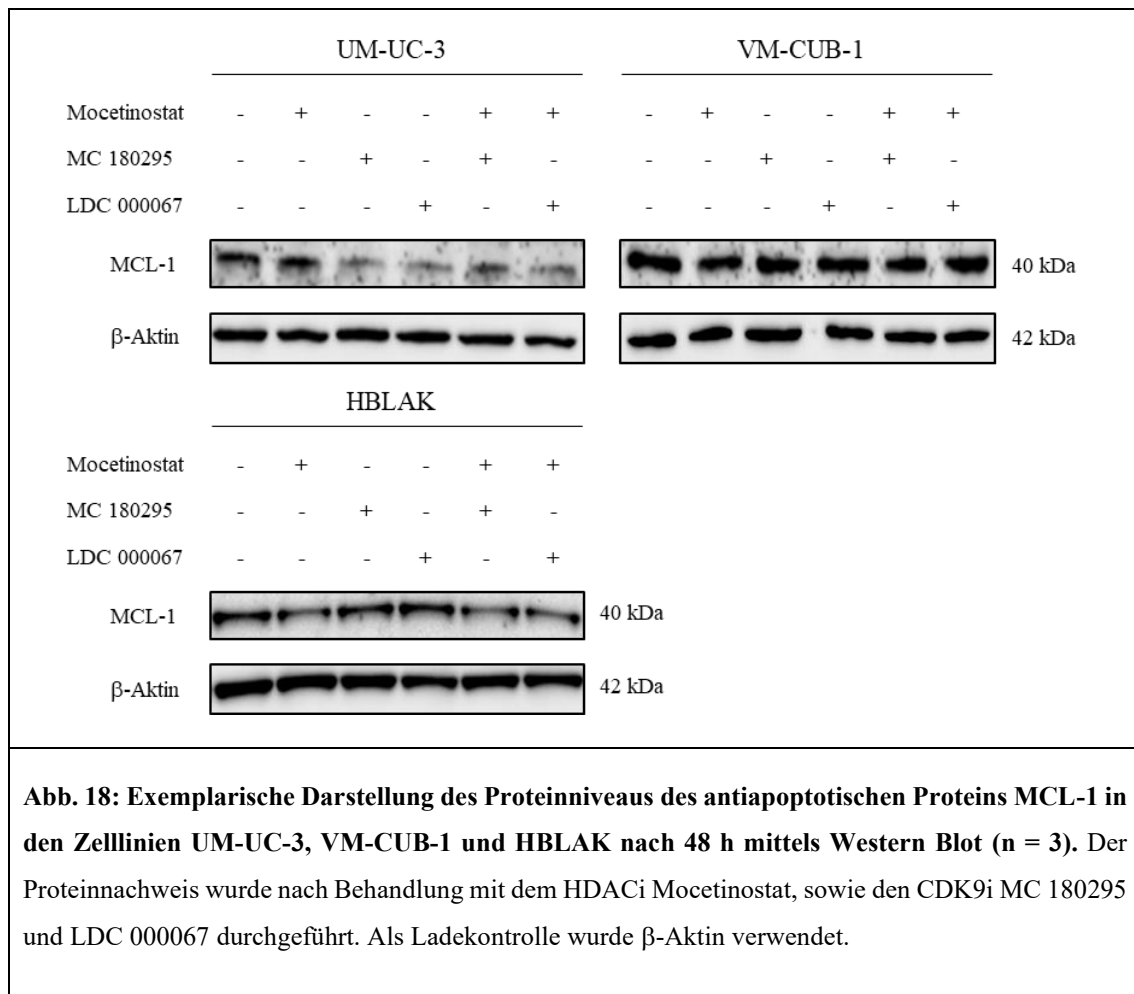
Abb. 17: Exemplarische Darstellung des Proteinniveaus des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot (n = 3). Der Proteinnachweis wurde nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat, sowie den CDK9i MC 180295 und LDC 000067 durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Das Protein MCL-1 gehört ebenfalls zur Bcl-2-Familie und ist somit ein weiteres antiapoptotisches Protein, welches an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Nachgewiesen ist, dass MCL-1 in Krebszellen häufig überexprimiert wird und aufgrund des erhöhten Spiegels zur Tumorentstehung beiträgt (*Fletcher, 2019*).

Das antiapoptotische Protein MCL-1 konnte in allen drei Zelllinien mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen werden. Durch die Behandlung der Zellen mit dem HDACi Mocetinostat sowie den CDK9i MC 180295 und LDC 000067 konnte teilweise eine Veränderung des Proteinniveaus von MCL-1 erzielt werden. Unter der Behandlung mit Mocetinostat konnte keine signifikante Verminderung von MCL-1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in der UCC UM-UC-3 erreicht werden (Abb. 18). Im Gegensatz dazu ließ sich nach Behandlung mit MC 180295 eine deutliche Abnahme feststellen. Auch unter der Behandlung mit LDC 000067 konnte eine Reduktion des MCL-1-Niveaus dargestellt werden. Die kombinierte Behandlung aus Mocetinostat und MC 180295 zeigte eine nur geringgradige Reduktion. Hingegen konnte durch die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 eine deutlich stärkere Abnahme von MCL-1 erreicht werden (Abb. 18).

In der Zelllinie VM-CUB-1 konnte nach Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren keine Veränderung der MCL-1-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt werden (Abb. 18).

Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte lediglich unter alleiniger Mocetinostat-Behandlung eine leichte MCL-1-Regression. Die Zellbehandlung mit den CDK9i führte nicht zu Veränderung des Proteingehalts. Auch die kombinierte Behandlung ergab keinen zusätzlichen Nutzen in Bezug auf die Unterdrückung von MCL-1 (Abb. 18).



4.6 Proteinniveaus des Onkogens MYC

Das Onkoprotein MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription über die Regulation der RNA-Polymerasen steuert. In Krebszellen ist dieser Marker häufig vermehrt exprimiert und zielt auf die Verstärkung bzw. Unterdrückung der Expression verschiedener Zielgene ab. Beispielsweise ist MYC verantwortlich für die Expression von Proteinen, die das Wachstum von Krebszellen fördern (*Baluapuri et al., 2020*). Des Weiteren wurde publiziert, dass die zielgerichtete Inhibition von CDK9 durch MC 180295 (1 μ M bzw. 5 μ M) die Expression von MYC unterdrückt (*Zhang et al., 2018*). Daher wurde in dieser Arbeit geprüft, ob es nach Behandlung mit dem HDACi sowie den CDK9i, sowohl einzeln als auch in Kombination, zu einer Reduktion der Expression von MYC kommt. Die Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat bzw. den CDK9i MC 180295 und LDC 000067 einzeln sowie in Kombination führte in keiner der drei Zelllinien zu einer Verminderung des Proteinniveaus (Abb. 19). In der UCC UM-UC-3 deutete sich sogar eine Verstärkung unter Verwendung der Inhibitoren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle an.

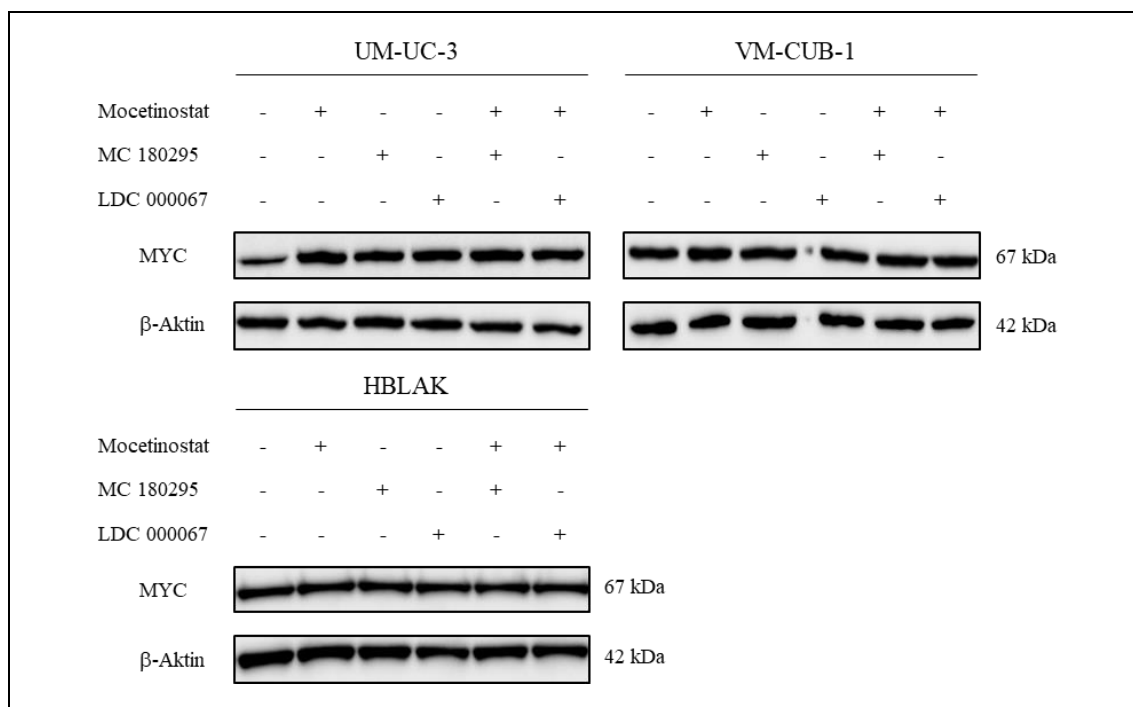


Abb. 19: Exemplarische Darstellung des Proteinexpression des Onkoproteins MYC in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot (n = 3). Der Proteinnachweis wurde nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat, sowie den CDK9i MC 180295 und LDC 000067 durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

4.7 Einfluss der Inhibitor Kombination auf das Proteinniveau und die Aktivierung der RNA-Polymerase

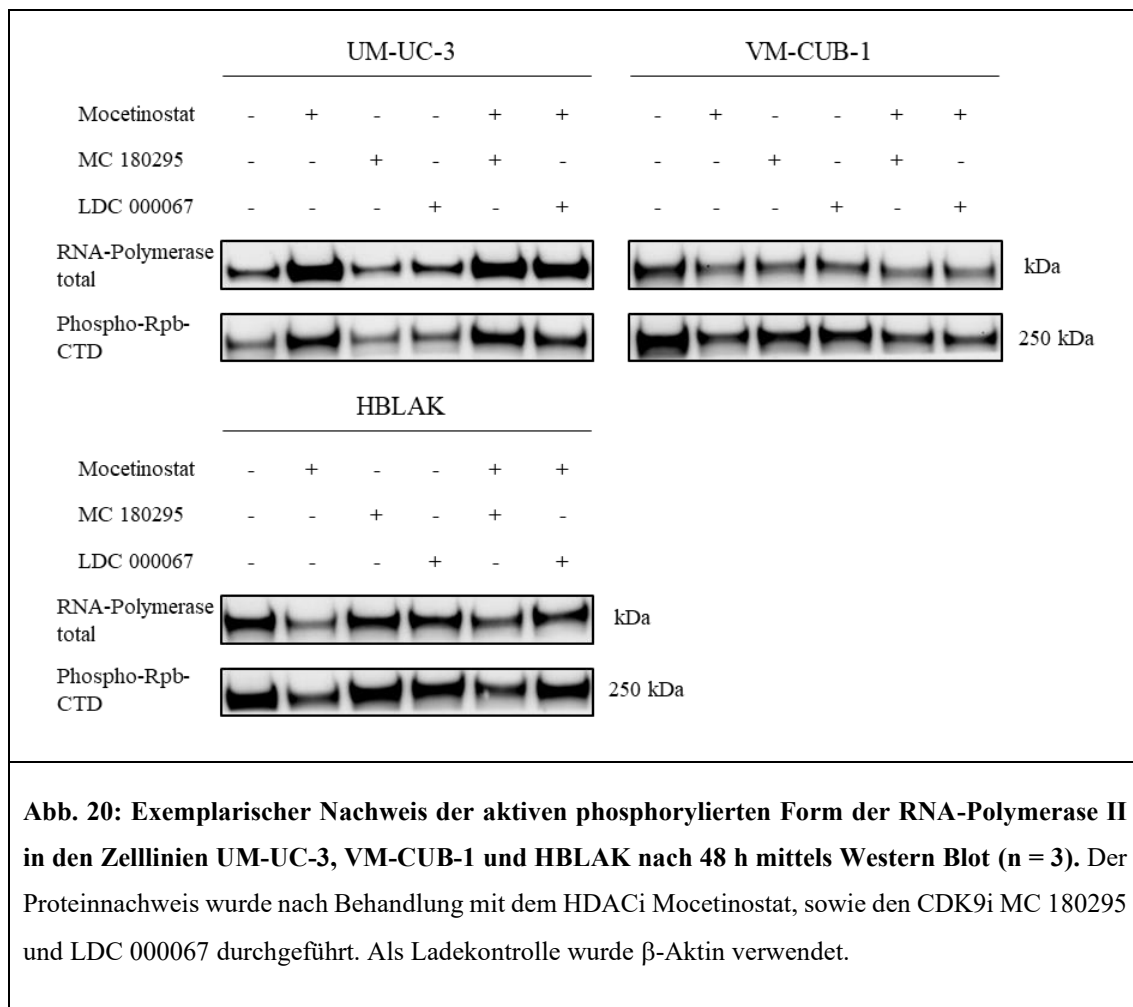
Das zu Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen gehörende CDK9 ist Teil des P-TEFb-Komplexes, welcher durch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II die Transkription von spezifischen Genen fördert. Diese Gene sind zuständig für die Proliferation und Entwicklung von Zellen (*Zhang et al., 2018*). Die Inhibition von CDK9 führt demnach zu einer Abnahme der phosphorylierten Variante der RNA-Polymerase II und folglich zur Reduktion proliferativer Gene in Krebszellen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich die Inhibition von CDK9 einzeln und in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat auf die Aktivität der RNA-Polymerase II auswirkt. Mit Hilfe des Western Blots ist die größte Untereinheit der RNA-Polymerase, RNAPII-Untereinheit B1 (Rpb1), in ihrer phosphorylierten Form nachweisbar und somit ein Marker für den Aktivitätszustand der RNA-Polymerase II.

In der UCC UM-UC-3 kam es nach Behandlung mit Mocetinostat zu einer signifikanten Zunahme der aktiven phosphorylierten Untereinheit der RNA-Polymerase II im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Zudem lag nach Mocetinostat-Behandlung die RNA-Polymerase II in nicht phosphorylierter Form deutlich gehäuft vor. Die Behandlung mit dem CDK9i MC 180295 führte zu einer leichten Abnahme der aktiven Form im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Vergleich man diese mit der totalen Form der RNA-Polymerase II nach Behandlung mit MC 180295, war zu erkennen, dass dieses Expressionsniveau erhöht war. Hingegen ließ sich unter LDC 000067 Behandlung keine Veränderung der Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erkennen. Auch nach kombinierter Behandlung mit dem HDACi und dem CDK9i wurde eine Steigerung der phosphorylierten Variante im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle festgestellt. Unter Kombinationsbehandlung war das Proteinniveau der totalen RNA-Polymerase II höher als das der phosphorylierten Untereinheit. (Abb. 20).

Die Behandlung der UCC VM-CUB-1 mit Mocetinostat führte zur Abnahme der phosphorylierten Untereinheit Rpb1 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Hingegen führte die Behandlung mit den CDK9i MC 180295 und LDC 000067 lediglich zu einer leichten Reduktion der aktiven Form. Zudem zeigte auch die Kombinationsbehandlung eine Reduktion des Proteinniveaus der phosphorylierten Untereinheit. Jedoch ließ sich

erkennen, dass das Proteinniveau der totalen Form unter der Behandlung mit dem HDACi und den beiden CDK9i in etwa gleichbleibt (Abb. 20).

In der Kontrollzelllinie HBLAK konnte lediglich unter Mocetinostat-Behandlung eine Reduktion der phosphorylierten Untereinheit im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Gleichzeitig führte jedoch die Behandlung mit Mocetinostat zu einer Abnahme der totalen RNA-Polymerase II. Die CDK9-Inhibition führte zu keiner eindeutigen Reduktion der Phospho-Rpb-CTD. Lediglich nach Kombination aus Mocetinostat und MC 180295 war eine leichte Abnahme der phosphorylierten Form im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erkennen (Abb. 20).



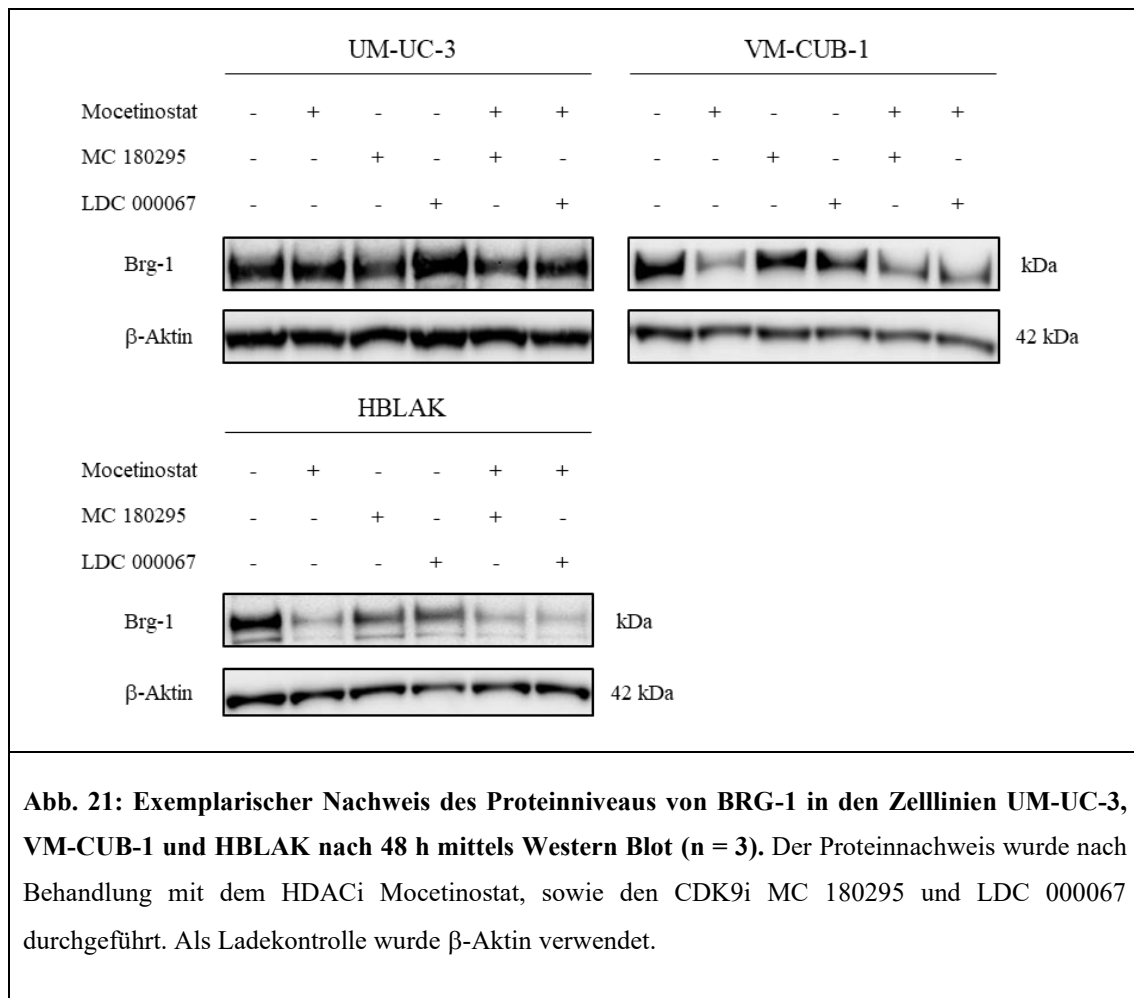
4.8 Reaktivierung epigenetisch reprimierter Gene durch die Dephosphorylierung von BRG-1

Das Protein BRG-1, auch bekannt als SMARCA-4, ist Teil des SWI/SNF-Komplexes und unterliegt als direktes Phosphorylierungssubstrat dem Protein CDK9 (*Zhang et al., 2018*). BRG-1 ist eine ATP-abhängige Helikase, welche die Struktur des Chromatins regulieren kann. Untersuchungen ergaben, dass die CDK9-Inhibition dem Protein BRG-1 den Umbau des Chromatins sowie die Veränderung der Genexpression ermöglicht (*Zhang et al., 2018*). Daher wurde hier geprüft, ob die Kombination aus HDACi und CDK9i einen zusätzlichen Effekt auf die Expression des BRG-1 hatte.

In der UCC UM-UC-3 konnte die Expression von BRG-1 nach Behandlung mit den drei Inhibitoren nachgewiesen werden. Nach Monobehandlung mit LDC 000067 nahm das Proteinniveau von BRG-1 im Vergleich zu den anderen Konditionen zu. Nach der Behandlung mit Mocetinostat und MC 180295 sowie MC 180295 einzeln war eine minimale Reduktion zu erkennen (Abb. 21).

Die UCC VM-CUB-1 wies nach Mocetinostat-Behandlung und nach beiden Kombinationsbehandlungen eine Reduktion von BRG-1 auf. Das Niveau nach der jeweiligen CKD9-Inhibition wies keine Veränderung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf.

Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte sowohl nach HDAC- als auch nach CDK9-Inhibition eine Reduktion von BRG-1 (Abb. 21).



4.9 RNA-Sequenzierung und Identifizierung von Veränderungen in der Regulation von Genen durch die Behandlung mit einem CDK9i

Die Arbeitsgruppe Zhang et al. veröffentlichte 2018, dass durch die Behandlung mit dem CDK9i MC 180295 bestimmte Gene nach kurzer Zeit herunterreguliert und weitere Gene nach einem längeren Zeitraum hochreguliert wurden. Dies wurde mittels RNA-Sequenzierung festgestellt (*Zhang et al., 2018*). Dieser Ansatz war für diese Forschungsreihe von erheblichem Interesse. Es erfolgte eine Monobehandlung der UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 mit den CDK9i MC 180295 und LDC 000067. Anschließend erfolgte eine eigenständige RNA-Sequenzierung mit Hilfe der Core Facility BMFZ. Von besonderem Interesse war dabei, inwiefern sich die Hoch- bzw. Herunterregulation bestimmter Gene zwischen den beiden Zellreihen und den beiden CDK9i unterschied.

Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ausgewertet, um die identifizierten differentiell exprimierten Gene zellulären Prozessen zuordnen zu können. Anschließend erfolgte eine Darstellung der Daten mit Hilfe von Venn-Diagrammen und GO-Gruppen-Analysen.

Im Rahmen der Bearbeitung der Rohdaten wurden zunächst differentiell exprimierte Gene zwischen der Behandlung der Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 mit dem Lösungsmittel DMSO oder einem der beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 gesucht. Es wurden nur Gene einbezogen, die mindestens einen Fold Change von 1,5 aufwiesen und nach Bonferroni-Korrektur einen p-Wert $\leq 0,05$ hatten. In der UCC UM-UC-3 konnten nach der Behandlung mit dem CDK9i MC 180295 153 differentiell exprimierte Gene festgestellt werden. Davon wurden 18 Gene hochreguliert und 135 herunterreguliert. Die Behandlung der gleichen Zelllinie mit dem zweiten CDK9i LDC 000067 wies eine deutlich höhere Anzahl differentiell exprimierter Gene auf. Von den insgesamt 1117 identifizierten Genen wurden durch die Behandlung im Vergleich zur Lösungskontrolle mit DMSO 364 Gene hoch- und 753 Gene herunterreguliert. In der zweiten UCC (VM-Cub-1) zeigten beide CDK9i einen ähnlichen Einfluss auf die Expression der Gene. MC 180295 führte in der Zelllinie VM-CUB-1 zu 242 differentiell exprimierten Genen, davon 96 hochregulierten und 146 herunterregulierten Genen. Die Behandlung der Zellen mit LDC 000067 wies 242 differentiell exprimierte Gene auf. 84 Gene davon waren hochreguliert und 170 herunterreguliert. Insgesamt konnte festgehalten werden, dass die Behandlung beider Harnblasenkarzinom-Zelllinien mit

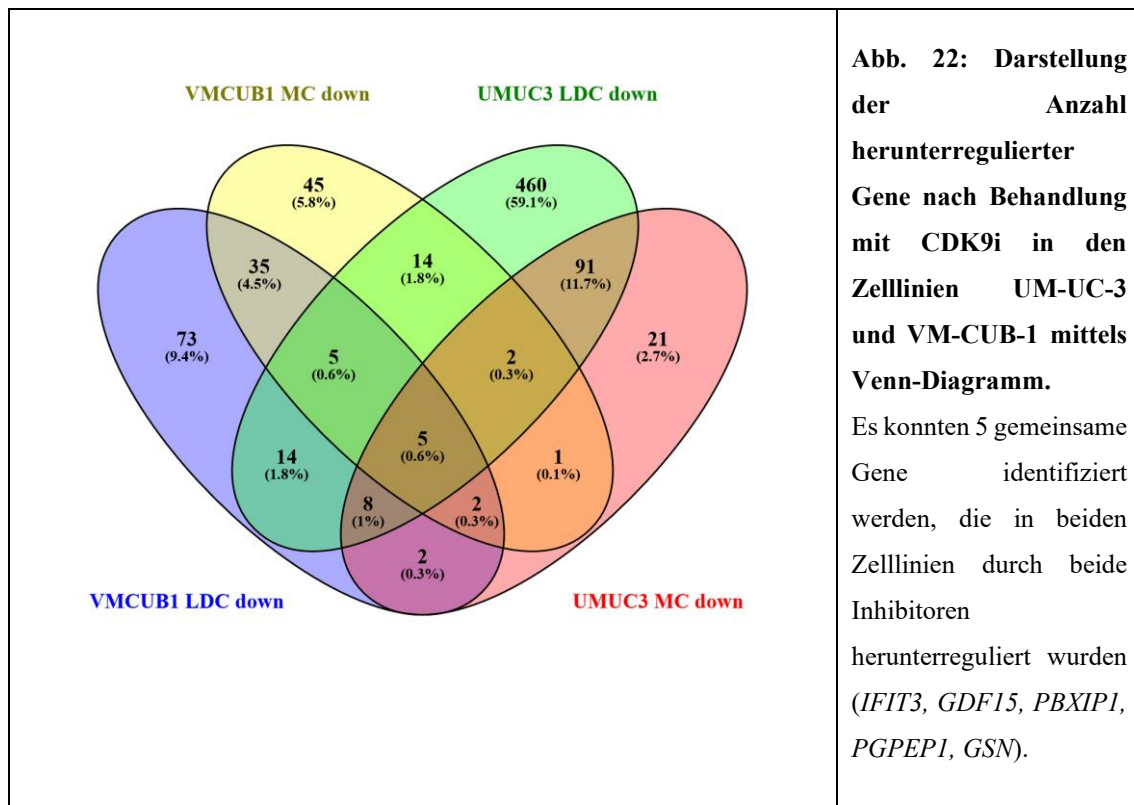
CDK9i zu multiplen Veränderungen der Genexpression führte. Im weiteren Verlauf wird diese genauer dargestellt.

Tab. 17: Differenziell exprimierte Gene der Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 im Vergleich DMSO Lösungsmittel und CDK9-Inhibition (n = 1). Nach Bonferoni-Korrektur mit $p \leq 0,05$. Es wurden nur Gene als verändert exprimiert eingeschlossen, die mindestens einen Fold Change von 1,5 aufwiesen ($FC \geq 1,5$).

Zelllinie DMSO vs. Medikament	Gene	Anzahl hochregulierter Gene	Anzahl herunterregulierter Gene
UM-UC-3 DMSO vs. MC 180295	153	18	135
UM-UC-3 DMSO vs. LDC 000067	1117	364	753
VM-CUB-1 DMSO vs. MC 180295	242	96	146
VM-CUB-1 DMSO vs. LDC 000067	254	84	170

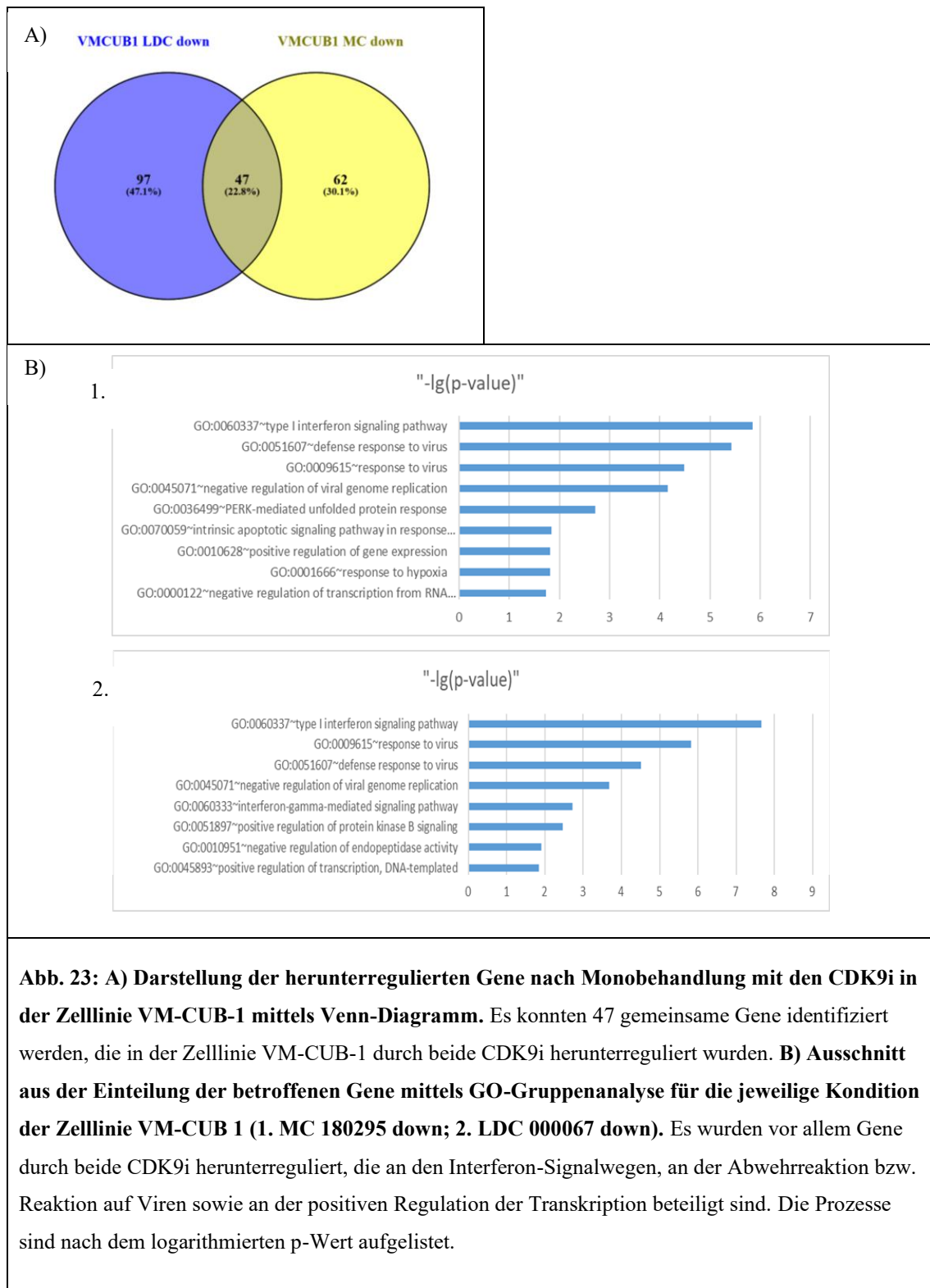
Im nächsten Schritt erfolgte eine detaillierte Aufarbeitung der hoch- bzw. herunterregulierten Gene mit Hilfe von Venn-Diagrammen.

In der Abbildung 22 sind die Gene dargestellt, die durch die CDK9i MC 180295 und LDC 000067 in den beiden Harnblasenkarzinom-Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 herunterreguliert wurden. In der Zelllinie VM-CUB -1 gab es 45 Gene, die lediglich durch MC 180295 beeinflusst wurden. Durch LDC 00067 hingegen wurden 73 Gene herunterreguliert, welche MC 180295 nicht beeinflusste. Überlappend ließen sich 35 Gene festlegen, die sowohl durch MC 180295 als LDC 000067 herunterreguliert wurden. In der Zelllinie UM-UC-3 führte MC 180295 zur verminderten Expression von 21 Genen, welche hingegen von MC 180295 nicht beeinflusst wurden. Der CDK9i MC 180295 sorgte in 460 Genen für eine Herunterregulation. Auch hier konnten 91 Gene festgelegt werden, welche sowohl durch MC 180295 als auch durch LDC 000067 herunterreguliert wurden. Im direkten Vergleich der Zelllinien nach der jeweiligen Behandlung mit MC 180295 ließen sich nur wenige Gene finden, die in beiden Zellreihen gleichermaßen herunterreguliert wurden (Abb. 22). Trotzdem ließen sich 5 Gene festlegen, die in beiden UCCs sowohl durch MC 180295 als auch durch LDC 000067 herunterreguliert wurden.



Bei diesen 5 gemeinsamen Genen handelte es sich um *IFIT3*, *GDF15*, *PBXIP1*, *PGPEP1* und *GSN*. *IFIT3* ist ein Gen, welches für ein Interferon-induzierbares Protein kodiert.

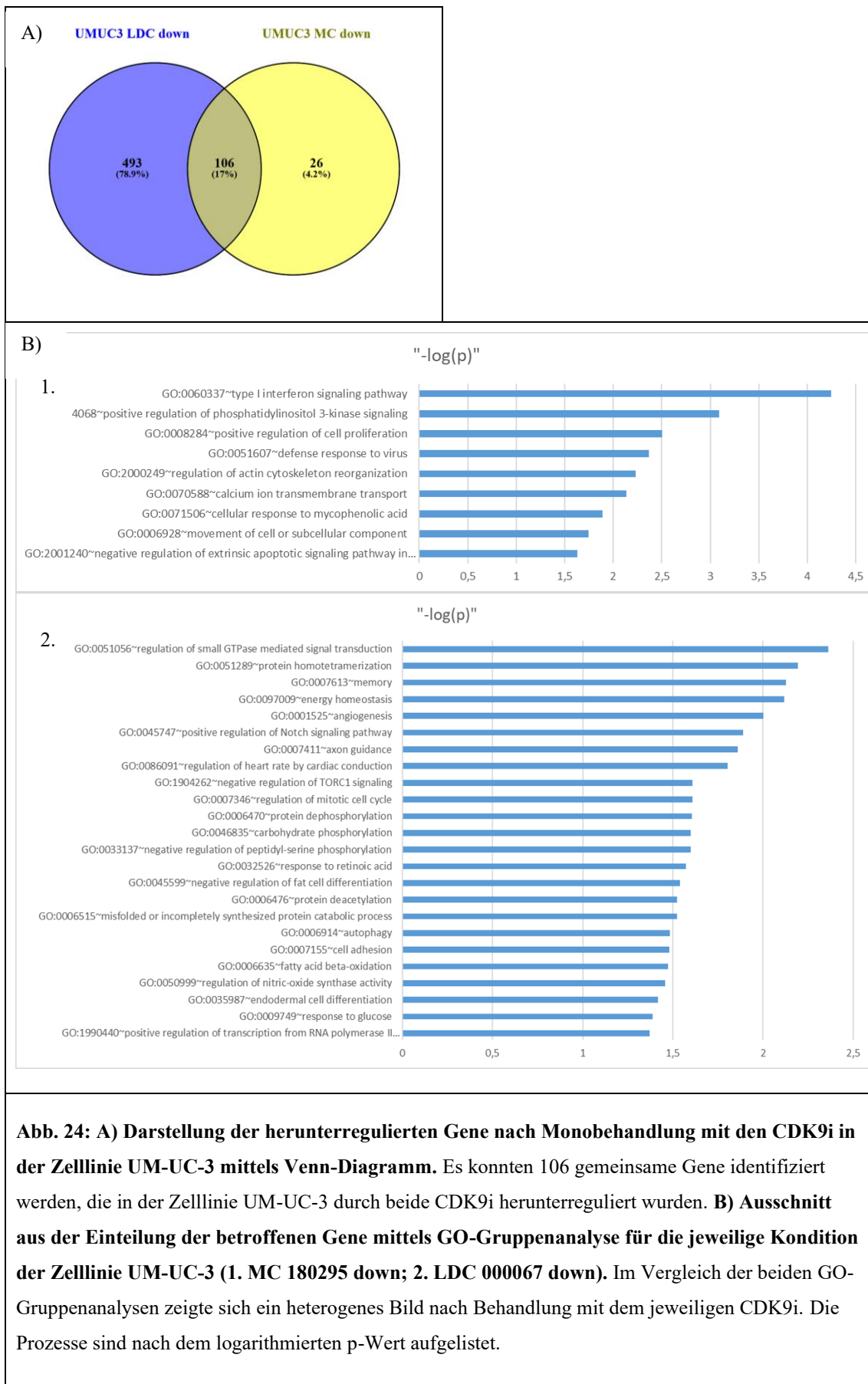
Im nächsten Schritt wurden lediglich die negativ beeinflussten Gene, die sich in der UCC VM-CUB-1 durch die jeweilige Monotherapie mit den beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 reduzierten, dargestellt. Dies war von besonderem Interesse, um die Angriffspunkte der beiden CDK9i in verschiedenen Zelllinien zu verstehen und einordnen zu können. Für die Zelllinie VM-CUB-1 ließen sich 47 überlappende Gene festlegen, die negativ beeinflusst wurden (Abb. 23 A).



Zusätzlich erfolgte eine GO-Gruppenanalyse für jede Kondition (1. VM-CUB-1 MC 180295 down; 2. VM-CUB-1 LDC 000067 down). Die zugehörige Analyse spiegelte die bereits zuvor aufgestellte Annahme wider. Durch die Behandlung der Zelllinie VM-CUB-1 mit dem CDK9i MC 180295 wurden vor allem Gene herunterreguliert, die an den

Interferon-Signalwegen, an der Abwehrreaktion bzw. Reaktion auf Viren, an intrinsischen apoptotischen Signalwegen, an der positiven Regulation der Genexpression, an der Reaktion auf Hypoxie und an der negativen Regulation der RNA-Transkription beteiligt sind (Abb. 23, B, 1.). Die Monotherapie mit dem CDK9i LDC 000067 sorgte für eine Herunterregulation von Genen, die auch an Interferon-Signalwegen, an der Abwehrreaktion bzw. Reaktion auf Viren, an der negativen Regulation der Genom-Replikation sowie an der positiven Regulation der Transkription beteiligt sind. Zwischen den beiden CDK9i konnten viele Überschneidungen in den Funktionen der herunterregulierten Gene feststellen werden (Abb. 23, B, 2).

Anschließend wurden auch die Gene betrachtet, die in der Zelllinie UM-UC-3 durch die Monobehandlung mit einem der beiden CDK9i, MC 180295 bzw. LDC 000067, herunterreguliert wurden. Insgesamt konnten 106 überlappende Gene gefunden werden, die sowohl durch die Behandlung mit MC 180295 als auch durch die mit LDC 000067 negativ beeinflusst wurden (Abb. 24, A). Deutlich mehr Gene wurden nur durch die Behandlung mit LDC 000067 negativ beeinflusst. Hier konnten 493 Gene detektiert werden. Durch die Monotherapie mit MC 180295 konnten neben den 106 überlappenden Genen 26 weitere Gene detektiert werden, die ausschließlich durch MC 180295 in der Zelllinie UM-UC-3 herunterreguliert wurden. Schaute man sich die 106 gemeinsamen Gene genauer an, fiel auch hier auf, dass unter anderem Gene betroffen waren, die Tumorsuppressoren (*H19*) oder Transkriptions-Cofaktoren (*CITED4*) kodieren. Aber auch Gene, deren Produkte die Zellproliferation, etwa die Entwicklung des hämatopoetischen Systems, steuerten (*CRLF2*), konnten detektiert werden. Zudem wurden einige Gene identifiziert, die eine wichtige Rolle in der Steuerung des Immunsystems spielen, beispielsweise als Regulatoren der angeborenen Immunantwort auf virale oder bakterielle Infektionen fungieren (*TMEM173*) (<https://www.genecards.org/>) (Abb. 24, A).



Schaute man sich nun im Vergleich die GO-Gruppenanalysen der Zelllinie UM-UC-3 nach der jeweiligen Behandlung mit einem der beiden CDK9i an, stellte man Folgendes fest. Unter MC 180295 wurden vor allem Gene, die auf den Interferon-Signalweg einwirken, negativ beeinflusst. Des Weiteren wurden auch die positive Regulierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalübertragung, die positive Regulation der Zellproliferation, die Abwehrreaktion auf Viren sowie die Herunterregulation der Inhibitoren extrinsischer Apoptosesignalwege beeinflusst (Abb. 24, B, 1). Im Vergleich dazu wurden durch die alleinige Behandlung mit LDC 000067 sehr viel mehr Gene negativ beeinflusst. In der unten aufgeführten GO-Gruppenanalyse waren die am häufigsten auftretenden Gen-Gruppen zusammengefasst. Unter anderem wurde die Regulierung der durch die kleine GPTase vermittelten Signaltransduktion negativ beeinflusst. Dies gilt auch für die Regulation der Mitose sowie die positive Regulierung der Transkription des RNA-Polymerase-II-Promotors als Reaktion auf Stress im endoplasmatischen Retikulum (Abb. 24, B, 2).

In der Abbildung 25 sind die Gene mittels Venn-Diagramm dargestellt, die durch die CDK9i MC 180295 und LDC 000067 in den beiden Harnblasenkarzinom-Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 hochreguliert wurden. In der Zelllinie VM-CUB-1 konnten 61 Gene identifiziert werden, die nach Behandlung mit dem Inhibitor MC 180295 hochreguliert wurden, jedoch weder durch den zweiten CDK9i noch in der Zelllinie UM-UC-3 hochreguliert wurden. Unter Monotherapie mit LDC 000067 konnten 53 individuelle Gene detektiert werden, die unique für diese Kombination waren. 21 überlappende Gene konnten in der Zelllinie VM-CUB-1 nach der jeweiligen Monotherapie mit MC 180295 und LDC 000067 identifiziert werden, welche durch die CDK9-Inhibition positiv beeinflusst wurden. In der Zelllinie UM-UC-3 konnten 340 Gene detektiert werden, die nach einer Monotherapie mit LDC 000067 hochreguliert wurden. Nach Monotherapie mit MC 180295 waren es nur 4 Gene. Zudem konnten auch in der Zelllinie UM-UC-3 12 überlappende Gene identifiziert werden, welche sowohl nach der Monotherapie mit MC 180295 als auch nach der Monotherapie mit LDC 000067 positiv beeinflusst wurden. Es wurde kein überlappendes Gen identifiziert, welches sowohl in beiden UCCs als auch nach jeweiliger Monotherapie mit einem der beiden CDK9i hochreguliert vorlag (Abb. 25).

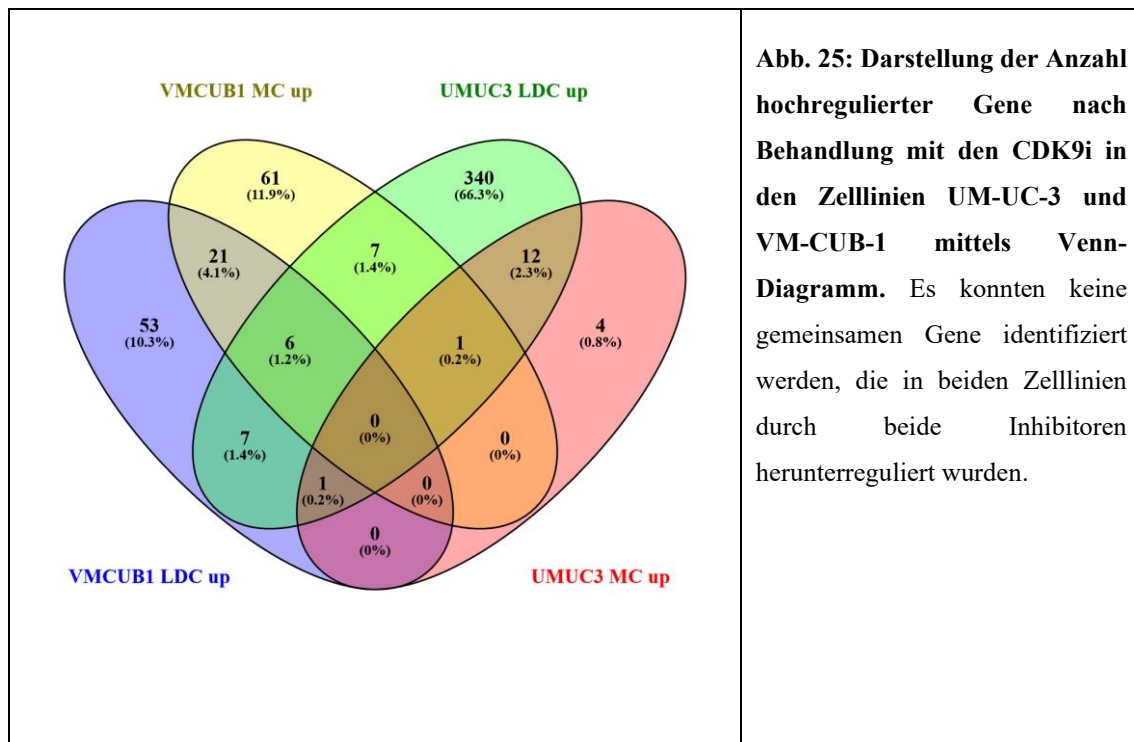
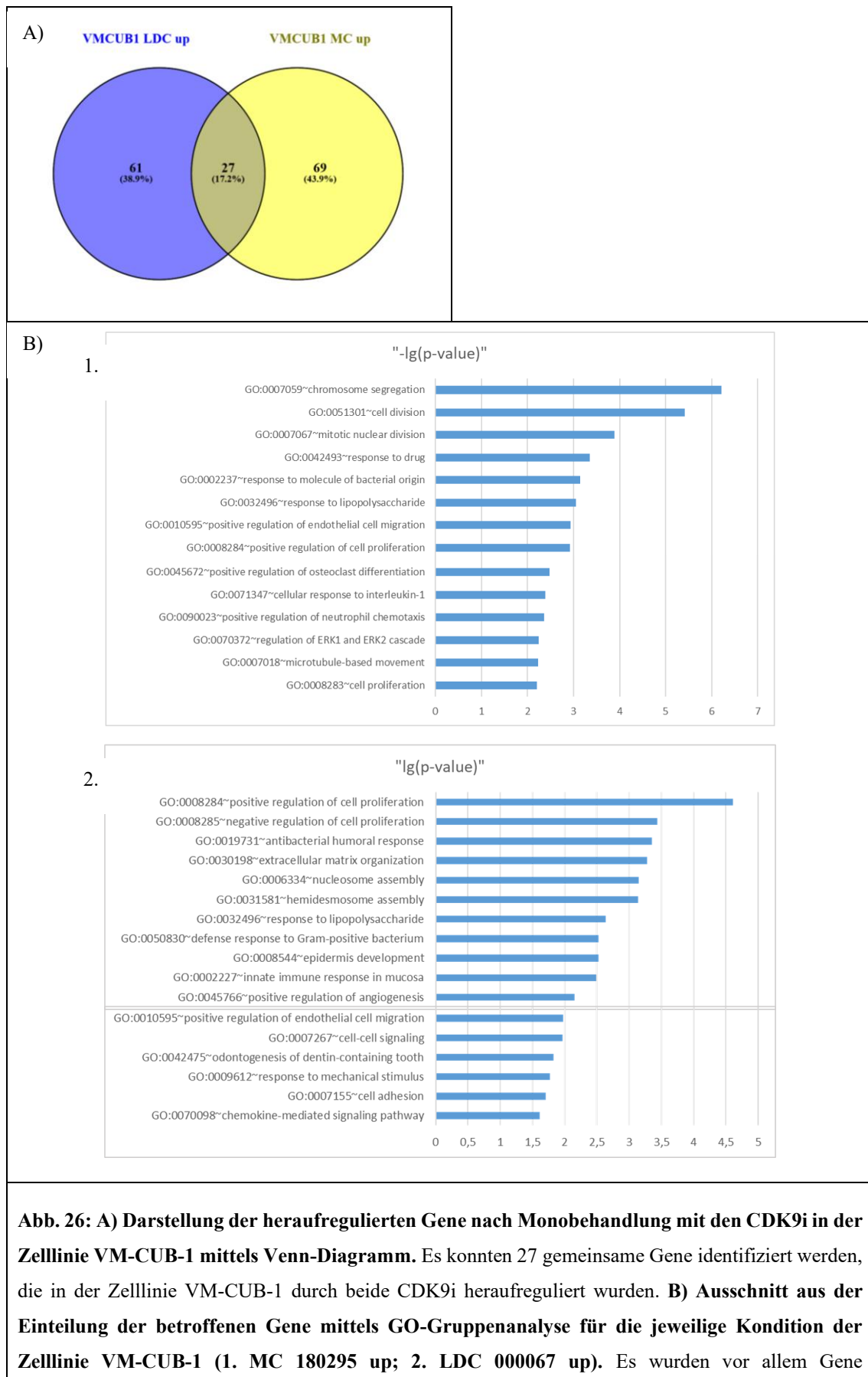


Abb. 25: Darstellung der Anzahl hochregulierter Gene nach Behandlung mit den CDK9i in den Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 mittels Venn-Diagramm. Es konnten keine gemeinsamen Gene identifiziert werden, die in beiden Zelllinien durch beide Inhibitoren herunterreguliert wurden.

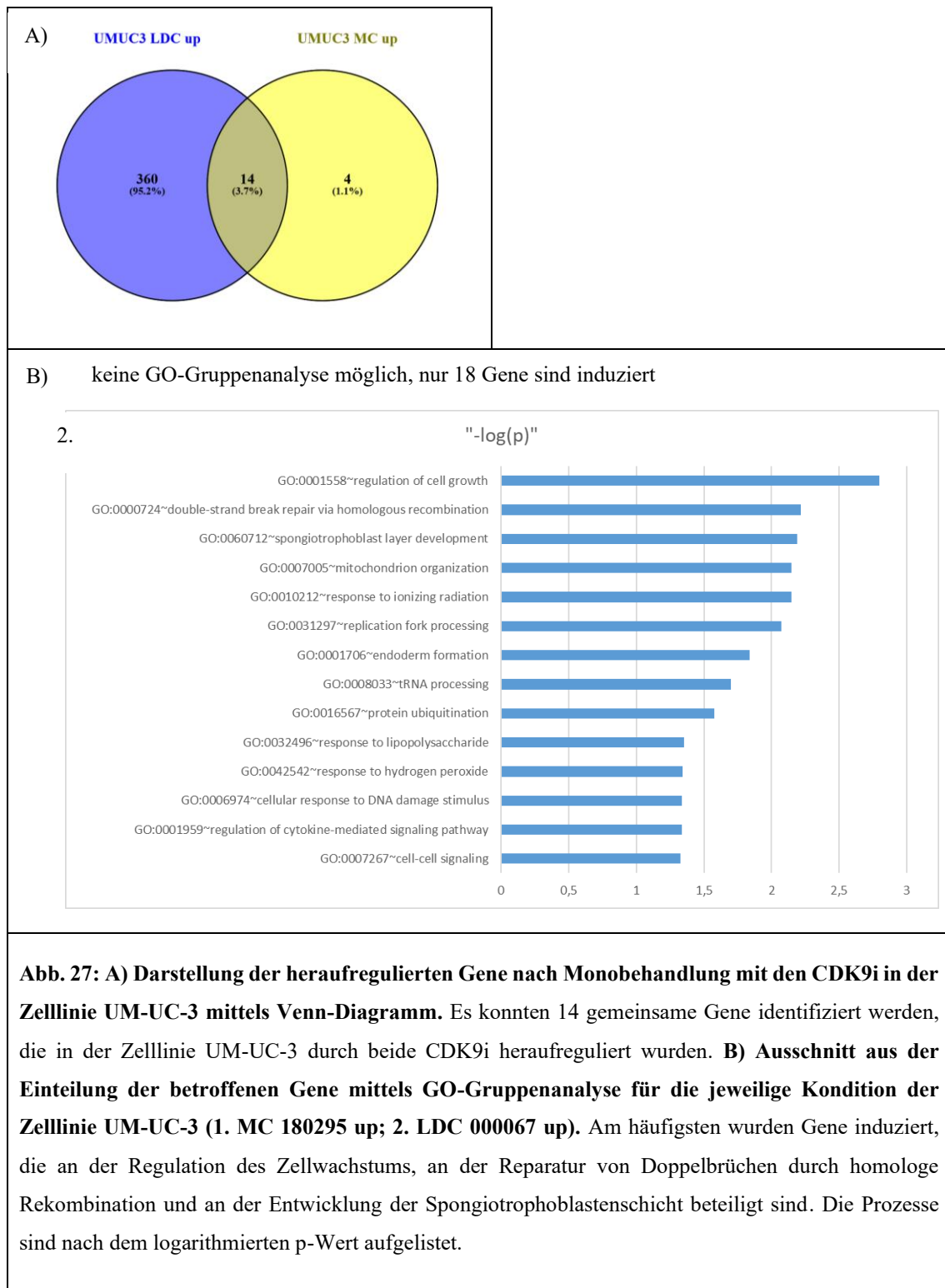
Zur Veranschaulichung der Gene, die sowohl durch den CDK9i MC 180295 als auch durch LDC 000067 in der Zelllinie VM-CUB-1 hochreguliert wurden, erfolgte eine erneute Darstellung mittels Venn-Diagramm (Abb. 26, A). Es konnten 27 Gene detektiert werden, die sowohl nach der Behandlung mit MC 180295 als auch nach der mit LDC 000067 positiv beeinflusst wurden. Darunter etwa das Gen *S100A3*, welches ein Protein, gehörend zur S100-Familie, kodiert. S100-Proteine sind im Zytoplasma und/oder im Zellkern einer Vielzahl von Zellen lokalisiert und an der Regulierung einer Reihe von zellulären Prozessen, wie der Zellzyklusprogression und -differenzierung, beteiligt. Zudem konnten auch Gene detektiert werden, deren Transkripte als Transkriptionsaktivator und Tumorsuppressoren fungieren, wie beispielsweise das Gen *KLF6*. Auch Gene, deren kodierte Proteine die Zellproliferation und -differenzierung negativ beeinflussen, wie *DUSP4*, wurden nachgewiesen. Das kodierte Protein reguliert die Mitglieder der Superfamilie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38) herunter, welche mit der Zellproliferation und -differenzierung in Verbindung stehen. All diese Gene wurden durch die beiden CDK9i heraufreguliert (<https://www.genecards.org/>) (Abb. 26, A).



heraufreguliert, die an den Zellproliferation positiv oder negativ beteiligt waren. Die Prozesse sind nach dem logarithmierten p-Wert aufgelistet.

Mit Hilfe der GO-Gruppenanalyse erfolgte eine Darstellung der übergeordneten Funktionen, unter denen die Gene zusammengefasst werden konnten. So konnte auch für die in VM-CUB-1 positiv beeinflussten Gene bzw. deren Funktion eine übersichtliche Darstellung erfolgen. Unter MC 180295 Behandlung wurden am häufigsten Gene positiv beeinflusst, die Transkripte produzieren und die an der Chromosomentrennung beteiligt sind. Zudem waren Gene, die an der Zellteilung, an der Reaktion auf Medikamente, an der positiven Regulation der Zellproliferation sowie an der zellulären Reaktion auf Interleukin-1 beteiligt sind, vermehrt heraufreguliert (Abb. 26, B, 1). Im Vergleich zu dem CDK9i LDC 000067 ergaben sich teils ähnliche Gruppen, die durch die alleinige Behandlung der Zellen heraufreguliert wurden. Auch hier war die positive, aber auch die negative Regulierung der Zellproliferation positiv beeinflusst. Zusätzlich zeigte sich auch eine Heraufregulation der Chemokin-vermittelten Signalwege (Abb. 26, B, 2).

Als Nächstes erfolgte eine Darstellung der heraufregulierten Gene durch den jeweiligen CDK9i in der Urothelkarzinomzelllinie UM-UC-3. Mit Hilfe eines Venn-Diagramms konnte dargestellt werden, dass es 14 Gene gab, die sowohl durch die Monobehandlung mit MC 180295 als auch durch die Behandlung mit dem CDK9i LDC 000067 positiv beeinflusst wurden (Abb. 27, A). Die alleinige Behandlung der Zelllinie UM-UC-3 mit MC 180295 führte zusätzlich zur Induktion von 4 Genen, die sich durch LDC 000067 nicht positiv beeinflussen ließen. Wiederum führte die Monotherapie mit LDC 000067 zur Heraufregulierung von 360 weiteren Genen, die wiederum durch MC 180295 nicht beeinflusst wurden (Abb. 27, A).



Eine GO-Gruppenanalyse war für die Behandlung mit MC 180295 nicht möglich, da nur insgesamt 18 Gene induziert wurden. Die induzierten Gene nach MC 180295 Behandlung gehören beispielsweise in die GO-Gruppen „Regulation des Zellwachstums“ sowie „Zell-Zell-Signalübertragung“ und entsprechen damit den GO-Gruppen für LDC 000067

(Abb. 27, B, 1). Für die heraufregulierten Gene nach LDC-000067-Behandlung erfolgte eine GO-Gruppenanalyse. Am häufigsten wurden Gene induziert, die an der Regulation des Zellwachstums, an der Reparatur von Doppelbrüchen durch homologe Rekombination und an der Entwicklung der Spongiotrophoblastenschicht beteiligt sind. Zudem wurden Gene zusammengefasst, die an der tRNA-Verarbeitung, an der zellulären Reaktion auf DNA-Schadensreize sowie an der Zell-Zell-Signalübertragung beteiligt sind (Abb. 27, B, 2).

5 Diskussion

5.1 CDK9i–neuer epigenetischer Therapieansatz einzeln bzw. in Kombination mit dem bereits erprobten HDACi Mocetinostat?

2018 wurde eine Phase-II-Studie zur Erprobung des HDACi Mocetinostat, der Klasse I- und Klasse IV-HDACs inhibiert, bei multipel vorbehandelten Patienten mit einem fortgeschrittenen/metastasierten Urothelkarzinom und ungünstigen Prognosefaktoren durchgeführt (*Grivas et al., 2018*). Zusätzlich mussten die Patienten eine inaktivierende Mutation oder Deletion von CREBBP und/oder EP300 aufweisen. Erwartet wurde, dass es bei diesen Patienten durch inaktivierende Mutationen und/oder Deletionen dieser beiden Histon-Acetyltransferasen, welche sich häufig bei urothelialen Karzinomen finden lassen, zu einer vermehrten, onkogen wirksamen Histondeacetylierung kam (*Duex et al., 2018; Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Robertson & Kim et al., 2017*). Diese sollte wiederum durch den Einsatz von Mocetinostat revertiert werden. Es ist beschrieben, dass nur wenige Patienten die vorgesehene Dosis von 90 mg TIW aufgrund erheblicher Toxizität erhalten hatten. Die Studie wurde im Verlauf aufgrund erhöhter Nebenwirkungen beendet (*Grivas et al., 2018*). Es bleibt zu diskutieren, ob die Dosisreduktion aufgrund erhöhter Toxizität das Outcome der Patienten negativ beeinflusst hat. Es ist davon auszugehen, dass dadurch nur eine begrenzte Wirksamkeit des Inhibitors im Organismus zu erwarten ist. Es kann folgendes festgestellt werden. (1) In Urothelkarzinomen kommt es zu einer Hochregulierung der Klasse I- HDACs. (2) Durch inaktivierende Mutationen bzw. Deletionen von Histon-Acetyltransferasen wie CREBBP und/oder EP300 kommt es zu einer relativen Überfunktion der HDACs. Zudem steht dies mit der Tumordifferenzierung sowie einer gesteigerten Proliferationsrate in Verbindung. Daher bleiben Inhibitoren wie Mocetinostat weiterhin vielversprechende Ansatzpunkte der Krebsforschung weltweit (*Povet et al., 2014*).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich bereits seit vielen Jahren mit epigenetisch wirksamen Inhibitoren und deren Auswirkungen auf molekularer Ebene. Einen Schwerpunkt bilden dabei die HDACi, welche vielversprechende Inhibitoren bei der zukünftigen Behandlung von Urothelzellkarzinomen darstellen. Wie bereits zuvor beschrieben, zeigen HDACi allein eine ausgeprägte Toxizität. Deswegen wird seit einiger Zeit nach möglichen Kombinationen aus einem HDACi und einem weiteren inhibitorischen Wirkstoff gesucht, um so die Toxizität des HDACi bei gleichem

antiproliferativem Effekt auf die Karzinomzellen zu reduzieren. Die Arbeitsgruppe Zhang et al. veröffentlichte 2018 die Entwicklung eines neuen CDK9-Inhibitors, welcher nachweislich auch eine epigenetische Wirkung zeigte. Über die Phosphorylierung von BRG-1 kommt es zu Genaktivierung in verschiedenen Krebszellen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass der neu synthetisierte CDK9i MC 180295 auch die Proliferation von Krebszellen reduzierte (Zhang et al., 2018). Zudem ergab sich daraus die Möglichkeit, bereits bekannte CDK9i, wie beispielsweise den 2014 beschriebenen CDK9i LDC 000067, auf eine epigenetische Wirksamkeit hin zu untersuchen und als mögliches Kombinationstherapeutikum einzusetzen (Albert et al., 2014). Ziel der Dissertation war die Erprobung zweier CDK9i, einzeln und in Kombination mit dem bereits bekannten HDACi Mocetinostat. Durch die Wirkstoffkombination und die damit verbundene Dosisreduktion von Mocetinostat wurde ein synergistischer Effekt der beiden epigenetisch wirksamen Medikamente vermutet. Zudem sollte untersucht werden, ob die Behandlung eine antiproliferative Wirkung auf die UCCs bei geringerer Toxizität auf gesunde Urothelzellen erzielen konnte.

Voraussetzung für die Forschungsreihe war zunächst der Nachweis von CDK9 in UCCs, sowie die Auswahl repräsentativer UCCs. Es wurden mittels Western-Blot beide CDK9-Isoformen in acht verschiedenen UCCs nachgewiesen. Hierbei unterscheidet sich die häufiger vorkommende 42 kDa-Isoform von der seltenen 55 kDa-Isoform, welche unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen aufweisen. Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen sind bislang nicht bekannt (Morales & Giodarno, 2016). Das Expressionsniveau unterschied sich zwischen den Zellreihen. Die Isoform 1 schien stärker exprimiert zu sein als die zweite vorliegende Isoform. Auch in der Kontrollzelllinie HBLAK konnten beide Isoformen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der UEC HBLAK war eine Zunahme der Expression der CDK9-Isoform in den UCCs BFTC-905, HAT-1376, UM-UC-3 und VM-CUB-1 zu erkennen. Anzunehmen ist, dass CDK9 eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der karzinogenen Eigenschaften in den UCCs spielt. Dies bekräftigt unsere aufgestellte These, dass CDK9 neben den HDACs eine mögliche Zielstruktur darstellt, um dem Tumorwachstum entgegenzuwirken und die Apoptoseinduktion zu fördern. Für weitere Experimente wurden die UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 sowie die Kontrollzelllinie HBLAK festgelegt. Auch die Publikation der Arbeitsgruppe Zhang et al. aus dem Jahr 2024 bestätigt diese Annahme. Hier wurde eine deutliche CDK9-Überexpression bei AML-Patienten festgestellt. Die hohe CDK9-Expression ist mit einer erhöhten Leukozytenzahl, einem schlechteren

Ansprechen auf die Behandlung und einer ungünstigeren Prognose im Vergleich zu Patienten mit niedrigen Expressionsleveln assoziiert. CDK9 erweist sich hier als unabhängiger Risikofaktor, der die Prognose beeinflusst (*Zhang et al., 2024*).

5.2 Die Kombination aus CDK9i und dem HDACi Mocetinostat senkt die Viabilität der UCCs über die Zeit

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Dosierung über einen bestimmten Zeitraum notwendig war, um eine toxische Wirkung durch die Inhibitoren auf die drei Zelllinien festzustellen. Zudem waren die Darstellung eines synergistischen Effektes der Kombination aus CDK9i und HDACi sowie die Auswirkung dieser je nach Dosierung von Interesse. Es kann festgestellt werden, dass in allen drei Zelllinien die Viabilität nach der Monobehandlung mit einem der beiden CDK9i bzw. dem HDACi Mocetinostat abnahm. Der IC_{50} -Wert für MC 180295 in der UCC UM-UC-3 war mit $0,1 \mu M$ der niedrigste im Vergleich zu LDC 000067 mit $1,5 \mu M$ und Mocetinostat mit $3 \mu M$. Für die UCC VM-CUB-1 ergaben sich andere Werte. Auch hier war der IC_{50} -Wert für MC 180295 mit $0,08 \mu M$ deutlich niedriger als für LDC 000067 mit $3 \mu M$ und Mocetinostat mit $0,8 \mu M$. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass der CDK9i MC 180295 die geringste Dosis zur Reduktion der Zellviabilität benötigte. In vitro wurde 2023 ein weiterer selektiver CDK9i (AZD4573) erprobt. Hier zeigten sich in verschiedenen Zellreihen eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms eine Abnahme der Proliferation mit steigender Konzentration des Inhibitors. Es konnten IC_{50} -Werte für jede der neun Lymphomzelllinien festgelegt werden. Bei sieben der neun Zelllinien lagen die IC_{50} -Werte relativ nah beieinander ($6,49 \text{ nM}$ bis $10,6 \text{ nM}$). Zwei Zelllinien wiesen jedoch stark abweichende IC_{50} -Werte auf (30 nM , $2,8 \text{ nM}$) (*Thieme, Bruss & Sun et al., 2023*). Diese stark variierenden IC_{50} -Werte werfen eine Fragestellung auf, die auch für die Ergebnisse relevant ist und kritisch hinterfragt werden muss. Beispielsweise fiel bei den Ergebnissen auf, dass MC 180295 bereits in einem geringen Dosisbereich einen stärkeren Effekt auf die Vitalität der Zellen zeigte. Der zweite CDK9i LDC 000067 benötigte jedoch eine viel höhere Dosierung, um exakt den identischen Effekt zu erzielen. Dieser Unterschied war auch zu erkennen, wenn man das Ansprechen der drei Inhibitoren in den drei Zelllinien verglich. Die Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK sprachen deutlich besser auf geringe Mengen von MC 180295 und Mocetinostat an als UM-UC-3. Hingegen fiel auf, dass für

LDC 000067 in den Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK deutlich höhere Dosen notwendig waren als in UM-UC-3. Es kann festgehalten werden, dass MC 180295 im Vergleich zu LDC 000067 der deutlich potentere Wirkstoff war. Dies geht unter Umständen auch mit einer geringeren Normotoxizität einher, muss jedoch in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden. Zusätzlich lässt sich sagen, dass ein heterogenes Ansprechen der UCCs auf die CDK9-Inhibition festgestellt werden konnte. Die UCC UM-UC-3 scheint weniger empfindlich gegenüber einer CDK9-Inhibition zu sein.

Im weiteren Verlauf wurde erstmals der Effekt der Wirkstoffkombinationen aus einem der beiden CDK9-Inhibitoren und Mocetinostat auf die Viabilität der Zellen über 48 h getestet. Dabei wurde immer ein Vielfaches des IC_{50} -Wertes verwendet, um festzustellen, ab welcher Dosiskombination der gewünschte Effekt eintrat. In der Zelllinie UM-UC-3 ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen der einzelnen und der kombinierten Therapie erkennen. In beiden Fällen erreichte die Kombinationstherapie bereits mit der 0,5-fachen des IC_{50} -Wertes eine relative Viabilität von etwa 50 %. In der Zelllinie VM-CUB-1 war ein vergleichbarer Effekt feststellbar, allerdings nicht in der gleichen Intensität wie in UM-UC-3. Ein synergistischer Effekt durch die Kombinationsbehandlung ist anzunehmen. In der Kontrollzelllinie HBLAK zeigte sich auch nach Behandlung mit der Kombination aus CDK9i und HDACi das stärkste Ansprechen. Jedoch waren höhere Dosen notwendig, um einen vergleichbaren Effekt wie in den UCCs zu erzielen. Daraus lässt sich ableiten, dass normale Uroepithelzellen (HBLAK) weniger empfindlich auf die Kombination reagieren als die Karzinomzellen. Es ist auch weniger wahrscheinlich, dass es zu Toxizität in den benignen Uroepithelzellen kommt, auch wenn die Dosis gleich ist. Es fällt auf, dass die Monotherapie mit Mocetinostat bei einem einfachen IC_{50} einen ähnlich starken Effekt auf die Uroepithelzellen hat wie die Kombination mit MC 180295. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass CDK9 in der Kontrollzelllinie HBLAK nicht über die Norm exprimiert ist, wie beispielsweise in den UCCs. So könnte sich ggf. durch die Kombinationsbehandlung mit einem CDK9i ein protektiver Effekt für Uroepithelzellen ergeben. Die Arbeitsgruppe Borowczak et al. beschäftigte sich 2022 genauer mit der Überexpression von CDK9 in Blasenkarzinomen und der Fragestellung nach der prognostischen Rolle von CDK9. Es wurde festgestellt, dass die Expression in Karzinomzellen höher als in normalem Uroepithelgewebe ist. Das Expressionsniveau korreliert mit dem Grad, dem Stadium und der Invasivität des Tumors. Zudem kann man

festhalten, dass Patienten mit einer hohen CDK9-Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger CDK9-Expression länger leben (*Borowczak et al., 2022*). Wiederum zeigt sich in anderen Tumorentitäten, beispielsweise kolorektalen Karzinomzellen oder myeloischen Leukämiezellen, dass ein hohes Expressionsniveau und die selektive Inhibition von CDK9 zu einer langsameren Proliferation und einem längeren Überleben *in vitro* und *in vivo* (Mausmodelle) führen (*Zhang & Huang et al., 2024*).

5.3 Zellulärer Effekt von CDK9i einzeln und in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat auf UCCs

5.3.1 Einfluss auf die Kurz- und Langzeitproliferation

Weitergehend wurden mittels MTT-Viabilitätstest über 96 h und mittels Klonogenitätstest die Kurz- und Langzeitproliferation nach Behandlung mit den beiden CDK9i einzeln und in Kombination mit dem HDACi Mocetinostat untersucht. In der UCC UM-UC-3 zeigte sich über die 96 h kein signifikanter Effekt durch die CDK9i allein. Die Monobehandlung mit Mocetinostat beeinflusste die Zellproliferation am stärksten. Die Kurve der Kombination mit MC 180295 lag sichtbar unterhalb der Monobehandlung, sodass sich hier eine synergistische Wirkung andeutet. In den Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK zeigte sich keine signifikante Abnahme der Kurzzeitproliferation nach der Kombinationstherapie (MC 180295/Mocetinostat) im Vergleich zu den Monotherapien (Mocetinostat; LDC 000067). Lediglich die Kombination von LDC 000067 und Mocetinostat zeigte eine deutliche Wirkung auf die Kurzzeitproliferation in der UEC HBLAK und der UCC VM-CUB-1, was auf ein synergistisches Zusammenspiel hindeutet. Die Kurve der Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067 verlief unterhalb der Kurve der Monobehandlung mit Mocetinostat. Die Arbeitsgruppe Fournel et al. veröffentlichte im Jahr 2008, dass Mocetinostat, auch bekannt als MGCD0103, in verschiedenen humanen Karzinomzellen die Proliferation der Zellen beeinträchtigt. Unter anderem wurde dies für verschiedene Zellen solider Tumoren als auch für hämatologische Karzinomzellen untersucht. Gleichzeitig zeigt die Arbeitsgruppe, dass sich dieser antiproliferative Effekt nicht in gesunden menschlichen Zellen nachweisen lässt (*Fournel et al., 2008*). Die Arbeitsgruppe Zhang et al. veröffentlichte 2024 Daten zu dem CDK9i MC 180295. Sie untersuchten unter anderem das Zellwachstum verschiedenster Karzinomzellen nach Behandlung mit MC 180295 (medianer IC₅₀: 171 nM) und stellten

fest, dass es in mehreren Zellreihen zu einer Hemmung des Zellwachstums kommt. Unter anderem wurden drei UCCs verwendet (UM-UC-3, UM-UC-6, UM-UC-16). Für die UCC UM-UC-3 wurde ein IC_{50} -Wert von 0,101 μ M festgelegt, was dem IC_{50} -Wert unserer Untersuchungen mit 0,1 μ M für die Kondition UM-UC-3 und MC 180295 entspricht. Wie ausgeprägt sich das Zellwachstum in den UCC änderte, ist nicht beschrieben. Die Proliferation der AML-Zelllinien wurde am stärksten durch den CDK9i MC 180295 gehemmt (*Zhang et al., 2024*). Dass CDK9 im Hinblick auf maligne Erkrankungen wie z.B. die akute myeloische Leukämie oder das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ein relevantes Target darstellt, beschrieben auch die Arbeitsgruppen Cidado et al. (2020) und Thieme et al. (2023). In beiden Fällen wurde der hochselektive CDK9i AZD4573 verwendet und eine Abnahme der Proliferation festgestellt (*Cidado et al., 2020; Thieme, Bruss & Sun et al., 2023*). Die Arbeitsgruppe von Heijkants et al. veröffentlichte 2017 ihre Ergebnisse zur Anwendung der Kombination aus dem HDACi Quisinostat und dem Pan-CDKi Flavopiridol bei Patienten mit kutanem oder uvealem Melanom. Es zeigt sich eine synergistische Reduktion der Zellviabilität in allen getesteten Melanomzelllinien, unabhängig von ihren Treibermutationen. Dies lässt sich vorzugsweise durch die Induktion der Apoptose erklären (*Heijkants et al., 2017*). Auch die Arbeitsgruppe von Bhutkar, Yadav und Dukhande zeigte in vitro, dass die Kombination aus dem Pan-HDACi Panobinostat und dem CDK4/6i Abemaciclib zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen führt (*Bhutkar, Yadav & Dukhande, 2023*).

Schaut man sich vergleichend die Langzeitproliferation mittels Klonogenitätstest an, kann festgestellt werden, dass auch hier die Zelllinie UM-UC-3 am stärksten auf die Behandlung mit Mocetinostat reagierte. Sowohl nach der Monobehandlung mit Mocetinostat als auch nach der Kombinationsbehandlung mit MC 180295 oder LDC 000067 war keine Koloniebildung mehr nachzuweisen. Dies ist am ehesten auf die Wirkung von Mocetinostat zurückzuführen, jedoch ist ein geringer synergistischer Effekt nicht auszuschließen, da für die Kombination auch nur der 0,75-fache IC_{50} -Wert verwendet wurde. Schaut man sich im Vergleich die Langzeitproliferation nach CDK9- bzw. HDAC-Inhibition einzeln und in Kombination in den Zellreihen VM-CUB-1 bzw. HBLAK an, ist Folgendes festzuhalten. Die Koloniebildung nach Monotherapie wurde kaum bis gar nicht beeinflusst. Die Kombinationstherapie führte jedoch in beiden Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Langzeitproliferation. Die Kolonien erschienen im Vergleich deutlich kleiner, sodass hier ein synergistischer Effekt zu vermuten ist. Die

Arbeitsgruppe Sikandar et al. publizierte 2010, dass sich die auf Nährmedium ausgestrichenen Kolonkarzinomzellen nach der Behandlung mit Mocetinostat im Vergleich zur Kontrolle nicht zu neuen Tumorherden organisieren. Es konnten lediglich einzelne Zellen nachgewiesen werden. Morphologisch fanden sich Hinweise dafür, dass diese vereinzelt Zellen sich in Apoptose befanden. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Mocetinostat die Proliferation in Kolonkarzinomzellen hemmt (*Sikander et al., 2010*). Schaut man sich andere Klasse I HDACi und ihre Wirkung auf UCCs an, fällt auf, dass etwa die HDAC 1/2 Inhibitoren Romidepsin und Givinostat zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation führen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass es zu einer Abnahme der Koloniebildung kommt (*Pinkerneil et al., 2016*). Der HDACi Mocetinostat weist Unterschiede in seiner Wirkung auf die UCCs im Vergleich zu den beiden anderen HDAC Klasse I Inhibitoren Romidepsin und Givinostat auf. Jedoch zeigt Mocetinostat ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Langzeitproliferation wie die Klasse I HDACi Romidepsin und Givinostat. Mocetinostat führt, so wie auch die anderen beiden Inhibitoren, zu einer Abnahme der Koloniebildung (*Pinkerneil et al., 2016*).

5.3.2 Dysregulation des Zellzyklus

Ein weiterer wichtiger Teil der Untersuchungen war, inwiefern die Behandlung der Zellen zu einer Veränderung des Zellzyklus führte. In der UCC UM-UC-3 konnte erneut beobachtet werden, dass diese Zellreihe sich vor allem durch den HDACi Mocetinostat beeinflussen ließ. Es ergab sich eine deutliche Zunahme der G2/M-Phase, sowie eine Abnahme der Zellen in der G1- bzw. S-Phase. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Proliferation der Zellen abnahm. Zudem wurden die Karzinomzellen beispielsweise durch die Identifikation von DNA-Schäden oder einer unvollständigen DNA-Replikation zunehmend durch die Kontrollpunkte der G2/M-Phase erkannt und verblieben dort. Die betroffenen Zellen wurden anschließend in Apoptose geschickt (*Wang, Cell-Cycle Synchronization, 2017*). Zudem kam es zu einer deutlichen Zunahme in der sub-G1-Phase. Dies spricht dafür, dass vermehrt Zellen durch Mocetinostat in Apoptose geschickt wurden, welche sich dort ansammelten. Der gleiche Effekt zeigte sich nach der Kombinationsbehandlung mit Mocetinostat und einem der beiden CDK9i MC 180295 bzw. LDC 000067. Diese Ergebnisse spiegelten die bereits zuvor beschriebenen Resultate wider. Erstens hatte Mocetinostat allein einen starken Einfluss auf die UCC UM-UC-3

und zweitens erzielte auch die Kombination in Dosisreduktion das gleiche Ergebnis. In der UCC VM-CUB-1 zeigten sich leichte Veränderungen, sowohl durch Mocetinostat als auch durch die CDK9i allein. In der Kombinationsbehandlung konnte erkannt werden, dass sowohl der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase als auch in der sub-G1-Phase angestiegen war. Dies waren beides Effekte, die bereits zuvor entweder durch die Monobehandlung mit Mocetinostat oder durch einen der beiden CDK9i zu beobachten waren. Jedoch zeigte sich dieser Effekt deutlich weniger stark ausgeprägt in der UCC VM-CUB-1. In der Kontrollzelllinie HBLAK stellten sich durch alle drei Inhibitoren erkennbare Veränderungen im Zellzyklus im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dar. Wenn man sich die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen, etwa dem Klonogenitätstest, ins Gedächtnis ruft, war ein solches Ergebnis nach Monobehandlung der UEC HBLAK nicht zu erwarten. Es lässt sich vermuten, dass es sich bei den Zellzyklusveränderungen um eher marginale Effekte handelte und die Zellen sich bereits nach 10-14 Tagen erholt hatten, sodass dieser Einfluss sich nicht in der Testung der Langzeitproliferation (Klonogenitätstest) abbilden ließ.

Nach Mono-Behandlung mit Mocetinostat zeigte sich in der Zellzyklusanalyse der UEC HBLAK ein deutlicher G1-Arrest der Zellen. Dieses Ergebnis bestätigte, dass Mocetinostat auch die UECs in ihrer Proliferation behinderte. Die beiden CDK9i hingegen führten vermehrt zu einer Zunahme der Zellen in der S- und G2/M-Phase. In den Balkendiagrammen der Zellzyklusanalyse ließen sich einerseits der Effekt des Mocetinostats und andererseits auch der Effekt der CDK9i auf den Zellzyklus erkennen. Die Arbeitsgruppe Liao et al. veröffentlichte 2020, dass Mocetinostat in verschiedenen Leberkarzinomzellen (HepG2, Huh-7) zu einem G2/M-Arrest führt (*Liao et al., 2020*). Jedoch muss bedacht werden, dass der Arrest der Zellen in einer Karzinomzelle davon abhängig war, ob einer der Kontrollpunkte mutiert vorlag. Es ist bekannt, dass viele UCCs über keinen intakten G1-Kontrollpunkt mehr verfügen. In der UEC HBLAK hingegen sind alle Kontrollpunkte vollständig intakt (*Hoffmann et al., 2021; Hoffmann et al., 2016*). Nach der Behandlung der UCC UM-UC-3 mit Mocetinostat zeigte sich eine Zunahme in der sub-G1-Phase. Dieser Effekt ließ sich auch in Kolonkarzinomzellen nach Mocetinostat-Behandlung darstellen. Die Arbeitsgruppe Sikandar et al. zeigte 2010, dass die behandelten Kolonkarzinomzellen sich vor allem in der sub-G1-Phase anhäufen und bestätigte so zusätzlich die Apoptose-Induktion (*Sikandar et al., 2010*). Hingegen führte die Behandlung von Epstein-Barr-Virus-assoziierten Magenkarzinomzelllinien (SNUT719, YCCEL1) mit dem CDK9i MC 180295 zu einer Zunahme der Zellen in der

S-Phase. Auch die Anreicherung der Zellen in der sub-G1-Phase und die damit einhergehende Apoptose-Induktion fielen auf (*Fujii et al., 2022*). Dies ließ sich auch für die UEC HBLAK im Balkendiagramm der Zellzyklusanalyse abbilden. Jedoch war die Zunahme der S-Phase nur schwierig von der G2/M-Phase zu unterscheiden. Dies könnte erklären, warum sich im Klonogenitätstest nach MC-180295-Behandlung nicht weniger Zellen nachweisen ließen.

In der Literatur wurde berichtet, dass der CDK9i LDC 000067 nach der Behandlung dazu führt, dass bestimmte Gene, die zuvor überexprimiert wurden, in Sammelrohrkarzinomen der Niere herunterreguliert werden. Zu den herunterregulierten Genen gehören auch diese, die den Zellzyklus der Tumorzelle beeinflussen. Durch LDC 000067 wird die Zellzyklusprogression unterdrückt (*Guan et al., 2024*).

5.3.3 Induktion der Apoptose und Einfluss auf die Regulation antiapoptotischer Proteine durch CDK9- und HDAC-Inhibition

Von erheblichem Interesse war nach Analyse der Zellzyklusaktivität die Apoptoseinduktion durch die einzelne und kombinierte Behandlung mit Hilfe des Annexin-V-PI-Tests. Der HDACi Mocetinostat führte in allen drei Zelllinien zur Induktion der Apoptose. In der UCC UM-UC-3 zeigte sich diese deutlich ausgeprägter als in der UCC VM-CUB-1. Jedoch ergab sich auch in der UEC HBLAK eine ausgeprägte Zunahme der Apoptoseinduktion nach einzelner Behandlung mit einem der drei Inhibitoren. Es ist festzuhalten, dass eine leichte Induktion der Apoptose bereits in der DMSO-Kontrolle festzustellen war. Die einzelne Behandlung der UCC UM-UC-3 mit MC 180295 zeigte eine deutliche Apoptoseinduktion, während LDC 000067 kaum Effekte auf den Zelltod hatte. In der UCC VM-CUB-1 kam es durch die einzelne CDK9-Inhibition zu einer leichten Zunahme der spätapoptotischen Zellen. Die Kombination des HDACi mit einem CDK9i zeigte in der UCC UM-UC-3 einen Mocetinostat-ähnlichen Effekt. In der Monobehandlung wurde der einfache IC_{50} Wert verwendet, im Rahmen der Kombinationstherapie der 0,75-fache IC_{50} -Wert eines jeden Inhibitors. Es war nicht eindeutig festzustellen, ob der Effekt nach kombinierter Therapie allein dem Mocetinostat zuzuschreiben war oder ob die Kombination einen Synergismus erzielte. In der UCC VM-CUB-1 war zu beobachten, dass die Kombination aus HDACi und CDK9i zu einer Zunahme der Apoptose führte. Die Induktion der Apoptose durch die Kombination aus

Mocetinostat und MC 180295 bzw. LDC 000067 führte in der UEC HBLAK zu einer weiteren Zunahme der Apoptoseinduktion. Diese Zunahme war jedoch eher gering im Vergleich zur Monotherapie mit Mocetinostat. Trotzdem ist hier ein synergistischer Effekt durch die Kombination aus HDACi und CDK9i zu verzeichnen. Andere in vitro Studien zu selektiven CDK9i (AZD4573) beispielsweise in Zellen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms zeigen eine deutliche Induktion der Apoptose mit steigender Dosis des Inhibitors (*Thieme, Bruss & Sun et al., 2023*). Auch für den HDACi Mocetinostat wurde beschrieben, dass dieser in anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom, zur Induktion der Apoptose führe. Mittels Durchflusszytometrie zeigte die Arbeitsgruppe Liao et al. 2019, dass es in den beiden hepatozellulären Karzinomzelllinien hepG2 und Huh7 nach Behandlung mit Mocetinostat zu einer Zunahme der Apoptoseinduktion kommt (*Liao et al., 2019*). Bei genauerer Betrachtung anderer HDACi der Klasse I und ihrer Auswirkungen auf UCCs zeigte sich, dass nach der Behandlung mit Mocetinostat eine Vermehrung frühapoptotischen Zellen stattfindet. Romidepsin und Givinostat hingegen verursachen in verschiedenen UCCs einen nicht apoptotischen Zelltod (*Pinkerneil, 2016*).

Vergleicht man die erhobenen Daten des Annexin-V-PI-Assays mit den der Zellzyklusanalyse, lässt sich für die Zelllinie UM-UC-3 festhalten, dass die erhobenen Daten die jeweiligen Ergebnisse der anderen Untersuchung deckten. Die Zellzyklusanalyse der UCC UM-UC-3 nach Mocetinostat-Behandlung ergab sowohl nach Mono- als auch nach Kombinationstherapie mit einem der beiden CDK9i einen deutlichen Anstieg von Zellen in der Sub-G1-Phase und somit eine Ansammlung apoptotischer Zellen, welche sich in der Zunahme der vor allem früh-, aber auch spätapoptotischen Zellen im Annexin-V-PI-Assay bestätigte. Für die UCC VM-CUB-1 ließ sich dies genauso beschreiben, wenn auch nicht so ausgeprägt wie für die UCC UM-UC-3. Die UEC HBLAK zeigte sowohl nach alleiniger HDAC- bzw. CDK9-Inhibition als auch nach kombinierter Behandlung eine Apoptoseinduktion im Annexin-V-PI-Test. Dieses Ergebnis ließ sich nicht so ausgeprägt durch die Zellzyklusanalyse bestätigen. Mocetinostat allein führte zu einer deutlichen Ansammlung der Zellen in der G1-Phase. Es konnte gemutmaßt werden, dass die Zellen am G1-Kontrollpunkt hängengeblieben waren. Gegebenenfalls wurden diese Zellen im Annexin-V-PI-Assay bereits als frühapoptotische Zellen mit einem sub-G1-DNA-Gehalt erkannt, was die Ergebnisse dieses Experiments widerspiegeln würde.

Zur Validierung der Apoptoseinduktion erfolgte der Nachweis der PARP-Spaltung mittels Western Blot. In der UCC UM-UC-3 wurde nach der Anwendung von Mocetinostat sowie nach der kombinierten Behandlung eine PARP-Spaltung nachgewiesen, jedoch nicht nach alleiniger Behandlung mit CDK9-Inhibitoren. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in dem bereits zuvor diskutierten Annexin-V-PI-Test wider. Auch hier wurde für die Kombination lediglich der 0,75-fache IC_{50} verwendet. Deshalb war nicht eindeutig zu unterscheiden, ob der Effekt allein durch Mocetinostat ausgelöst wurde oder ob die CDK9i nur in Kombination mit Mocetinostat den gleichen Effekt erzielten, trotz Dosisreduktion. In der UCC VM-CUB-1 ließ sich nach jeder festgelegten Behandlungskondition eine Induktion der Apoptose durch den Nachweis der cleaved PARP feststellen. Nach Mocetinostat Monotherapie war eine stärkere Apoptose-Induktion festzustellen. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen des Annexin-V-PI-Tests, wobei sich im Annexin-V-PI-Test mehr apoptotische Zellen nach Kombinationsbehandlung nachweisen ließen als nach Monotherapie. Dies war mit dem Western Blot nicht eindeutig nachzuweisen. Auch für die UEC HBLAK entsprach die PARP-Spaltung den bisherigen Ergebnissen aus dem Annexin-V-PI-Test. Es kam zu einer, im Vergleich zu den UCCs, ausgeprägteren Apoptose-Induktion, welche sich auch quantitativ mit Hilfe des Annexin-V-PI-Tests nachweisen ließ. Hier stach die Induktion der PARP-Spaltung nach Monotherapie mit LDC 000067 besonders hervor. Diese Ergebnisse suggerieren, dass eine CDK9-Inhibition keinen signifikanten zusätzlichen Effekt auf die Induktion der Apoptose in UCCs im Vergleich zum HDACi Mocetinostat hat. Eine Kombinationstherapie zeigte lediglich in der UCC VM-CUB-1 und der UEC HBLAK einen zusätzlichen Effekt im Vergleich zu den Konditionen der Monotherapien. In anderen Tumorentitäten konnte durch die selektive Inhibition der CDK9 eine signifikante Zunahme der Apoptose festgestellt werden. Beispielsweise beschrieb die Arbeitsgruppe von Cidado et al. im Jahre 2020, dass es in einer AML-Zelllinie zu einer Apoptoseinduktion nach Behandlung dieser Zellen mit dem selektiven CDK9i AZD4573 kommt. Dies konnte mittels Caspase-3-Spaltung nachgewiesen werden (Cidado et al., 2020). Daraus ergibt sich die Annahme, dass die Inhibition von CDK9 in Tumoren ein effektiver Ansatzpunkt zur Apoptoseinduktion von Karzinomzellen sein könnte, was jedoch die Frage aufwirft, warum dies für UCCs nicht grundsätzlich der Fall ist. Schaut man sich vergleichend nochmal den HDACi Mocetinostat an, stellt man sowohl für Tumorentitäten wie beispielsweise das hepatozelluläre Karzinom als auch für die UCCs fest, dass es durch die Behandlung mit

Mocetinostat zu einer Apoptoseinduktion, nachgewiesen durch die Spaltung von PARP, kommt (*Liao et al., 2019*).

Aufgrund der bereits unterschiedlich ausgeprägten apoptotischen Aktivität wurden die Regulation antiapoptotischer Proteine (Bcl-2, MCL-1) und die Veränderungen der Expression nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung betrachtet. Der Apoptoseregulator Bcl-2 ist in malignen Tumoren oft überexprimiert. Mittels Western Blot wurde Bcl-2 in allen drei Zelllinien sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch nach jeder anderen Behandlungskondition nachgewiesen. Jedoch ließ sich in der UCC UM-UC-3 nach Kombinationstherapie mit Mocetinostat und LCD 000067 eine leichte Abnahme des Proteinniveaus erkennen. In diesem Fall ist von einem synergistischen Effekt auszugehen, da durch keine andere Behandlungskondition eine Abnahme des Expressionsniveaus erreicht wurde. In den Zelllinien VM-CUB-1 und HBLAK waren keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erkennen. Unter den gleichen Konditionen wurde auch MCL-1, ein weiterer Apoptoseregulator, der zur Bcl-2-Familie gehört, betrachtet. Hier kann festgehalten werden, dass das Proteinniveau in der UCC UM-UC-3 stärker durch die CDK9i beeinflusst wurde. Sowohl nach Monotherapie mit einem CDK9i als auch nach Kombinationstherapie zeigte sich eine Abnahme des Expressionsniveaus. Mocetinostat führte allein zu keiner Abnahme des Expressionsniveaus. Hier ist erneut davon auszugehen, dass der Effekt in der Kombinationstherapie auf die Wirkung des CDK9i zurückzuführen ist. Ein synergistischer Effekt ist jedoch ebenfalls möglich. Auch hier erfolgte im Rahmen der Kombinationstherapie eine Dosisreduktion. Trotz der genannten Dosisreduktion wurde der gleiche Effekt erzielt. In der UCC VM-CUB-1 war keine Veränderung des Proteinniveaus festzustellen. Die Kontrollzelllinie HBLAK wies eine diskrete Reduktion des Proteinniveaus nach Mocetinostat-Behandlung auf. Dieser Effekt konnte auch nach der kombinierten Behandlung mit einem CDK9i beobachtet werden. Dieses Ergebnis der Inhibitoren lässt sich so nicht auf alle Tumorentitäten übertragen. Beispielsweise beschrieb die Arbeitsgruppe Liao et al. (2019), dass es in hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2, Huh7) nach Behandlung mit Mocetinostat zu einer Abnahme des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 kommt. Die Abnahme der Expression zeigt sich zunehmend mit der verwendeten Dosierung (*Liao et al., 2019*). Den gleichen Effekt erzielt Mocetinostat in der Behandlung von Hodgkin-Lymphomzellen. Auch hier kommt es zu einer Herunterregulation von Bcl-2 (*Huang et al., 2018*). Die Arbeitsgruppe Cidado et al. veröffentlichte 2020, dass die Behandlung von biphenotypischen B-

myelomonozytären Leukämiezellen mit dem hochselektiven CDK9i AZD4573 zu einer signifikanten Abnahme des MCL-1-Expressionsniveaus mit steigender Dosierung führt. Hingegen konnte, wie auch bei den Ergebnissen dieser Forschungsreihe, keine Veränderung des Bcl-2-Niveaus festgestellt werden (*Cidado et al., 2020*).

5.3.4 Einfluss der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf das Proteinniveau und die Aktivierung eng verbundener Proteine

Im nächsten Schritt wurden Proteine untersucht, die eng mit den Zielstrukturen der Inhibitoren verbunden sind. Dadurch konnte eine mögliche Beeinflussung dieser Proteine Aufschluss über das Wirkspektrum der Inhibitoren geben.

Das Onkogen MYC ist in verschiedenen Krebszellen häufig überexprimiert und führt zudem zur deren Proliferation (*Baluapuri et al., 2020*). Die Arbeitsgruppe Zhang et al. veröffentlichte 2018, dass der CDK9i MC 180295 die Expression von MYC unterdrückt (*Zhang et al., 2018*). Mit Hilfe eines Western Blots konnte festgestellt werden, dass weder die Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat noch die Behandlung mit einem der CDK9i zu einer Abnahme des Proteinniveaus führte. Auch die Kombination aus HDACi und CDK9i führte nicht zum gewünschten synergistischen Effekt. In-vitro-Experimente an Zellen des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms hingegen zeigten, dass die Inhibition von CDK9 über den neuen selektiven CDK9i AZD4573 zu einer Abnahme des Proteinniveaus verschiedener Proto-Onkogene führt. Neben der verringerten Proteinabundanz von JunB und Pim-3 kann auch MYC in reduzierter Menge nachgewiesen werden (*Thieme, Bruss and Sun et al., 2023*).

Auch die RNA-Polymerase ist ein Protein, welches in engem Zusammenhang mit CDK9 steht. CDK9 ist über den P-TEFb-Komplex an der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II beteiligt. Dadurch fördert es die Transkription spezifischer Gene, die für die Proliferation und Entwicklung von Zellen zuständig sind (*Zhang et al., 2018*). Die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II ist die RNAPII-Untereinheit B1 (Rpb1), welche eine einzigartige Heptapeptidsequenz in der carboxyterminalen Domäne (CTD) enthält (*Li et al., 2007*). In den Ergebnissen zeigten sich für die beiden UCCs und die Kontrollzelllinie HBLAK unterschiedliche Ergebnisse. Nach der Monobehandlung mit Mocetinostat kam es in der Zelllinie UM-UC-3 zu einer

Zunahme des Proteinniveaus der RNA-Polymerase-total sowie der Phospho-Rpb-CTD. Hingegen führte die Behandlung mit dem CDK9i MC 180295 in beiden Fällen zu einer leichten Abnahme des Expressionsniveaus. Die Behandlung mit LDC 000067 in Bezug auf beide Formen erbrachte keine Änderung des Proteinniveaus. Die Kombinationstherapie führte zu einer Zunahme im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle.

Für die UCC UM-UC-3 lässt sich also bestätigen, dass die über MC 180295 vermittelte CDK9-Inhibition zu einer Abnahme der phosphorylierten RNA-Polymerase führt, jedoch auch die totale Form weniger abundant ist. Es fällt auf, dass die Inhibitoren lediglich einen Effekt auf die Proteinabundanz hatten, da sich meist die phosphorylierte und totale Form parallel zueinander vermehrt oder vermindert zeigte. In der UCC VM-CUB-1 konnte nach Monotherapie mit dem HDACi Mocetinostat bzw. den CDK9i MC 180295/ LDC 000067 ein niedrigeres Proteinniveau der Phospho-Rpb-CTD im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Auch nach der Kombinationstherapie wurde ein niedriges Proteinniveau festgestellt. Dasselbe Phänomen ergab sich auch für das Expressionsniveau der RNA-Polymerase-total. Hier können also keine nennenswerten Unterschiede in der Anzahl der vorliegenden Formen durch die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren festgestellt werden. In der Kontrollzelllinie HBLAK konnte durch Mocetinostat eine Abnahme des Proteinniveaus beider Formen beobachtet werden. Auch die Kombination aus MC 180295 und Mocetinostat schien zu einer Abnahme des Proteinlevels zu führen. Die CDK9i wiesen keinen Effekt auf die Proteinmenge der beiden RNA-Polymerase-Formen auf. Es ist ein positives Ergebnis, dass die UCCs deutlich besser auf die neuen Therapiemöglichkeiten ansprechen als die Kontrollzelllinie HBLAK.

Die Arbeitsgruppe Zhang et al. veröffentlichte 2018, dass der ATP-abhängigen Helikase BRG-1 durch die CDK9-Inhibition der Umbau des Chromatins sowie die Veränderung der Genexpression ermöglicht wird (*Zhang et al., 2018*). Von Interesse war, inwiefern sich das Expressionsniveau von BRG-1 nach der jeweiligen Mono- bzw. Kombinationstherapie verändert. In der UCC UM-UC-3 ließ sich eine direkte Steigerung des Expressionsniveaus nach der Monotherapie mit LDC 000067 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle feststellen. In der UCC VM-CUB-1 war zu beobachten, dass es durch die Behandlung mit Mocetinostat allein bzw. in Kombination zu einer Repression von BRG-1 kam. Nach Monotherapie mit einem der beiden CDK9i war BRG-1 weiterhin

ähnlich gut nachweisbar wie im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es lässt sich also festhalten, dass die Behandlung mit CDK9i in den UCCs die BRG-1-Expression nicht negativ beeinflusst. So ist davon auszugehen, dass BRG-1 am Umbau des Chromatins sowie an der Veränderung der Genexpression beteiligt sein könnte. Somit könnte den CDK9i in diesem Fall eine protektive Wirkung zugeschrieben werden, falls auf diese Weise Tumorsuppressorgene oder andere antikarzinogene Proteine produziert werden könnten. In der Kontrollzelllinie HBLAK hingegen kam es zu einer Abnahme der BRG-1-Expression, welche jedoch nach CDK9-Inhibition weniger stark ausgeprägt war als nach Mocetinostat-Mono- bzw. -Kombinationstherapie. Wenn BRG-1 sich als notwendig für das Ablesen bestimmten Gensequenzen in Karzinomzellen erweisen sollte, dann wäre es ein zusätzlich protektiver Mechanismus. Denn dies wäre in gesunden Urothelzellen nicht der Fall bzw. käme nur in geringem Ausmaß vor. Es wurde beschrieben, dass ein niedriges Expressionsniveau von BRG-1 häufig mit Karzinomerkrankungen assoziiert ist. Häufig ist das kodierende Gen stillgelegt. Die Arbeitsgruppe Wang et al. beschrieb 2015 einen neuen Signalweg, der durch ein niedriges Expressionsniveau von BRG-1 zu einer Metastasierung der Darmkrebszellen in vivo und -vitro führt (*Wang et al., 2016*). Auch die Arbeitsgruppe Hendricks et al. beschrieb bereits 2003 BRG-1 als Tumorsuppressor. Zudem stellten sie fest, dass es in Brusttumorzellen, die aufgrund einer Mutation kein BRG-1 aufweisen, durch das neue Hinzufügen von BRG-1 zu einem Wachstumsstopp kommt (*Hendricks et al., 2004*). Dies zeigt, dass BRG-1 in der Krebstherapie einen entscheidenden Faktor im Ansprechen auf die Therapie darstellen könnte, jedoch bisher nicht alle Wirkmechanismen abschließend geklärt sind. Im Gegensatz dazu ist das Protein in benignen und malignen Urothelzellen offenbar robust abundant.

5.3.5 Effekt der Inhibitoren einzeln und in Kombination auf die globale Gen-Expression

Zusätzlich zu den bisherigen Experimenten erfolgte eine RNA-Sequenzierung, da die Gruppe Zhang et al. 2018 beschrieben, dass die CDK9i bestimmte Gene nach kurzer Zeit herunterregulierten und weitere Gene nach einem längeren Zeitraum hochregulierten. Dies wurde mittels RNA-Sequenzierung festgestellt (*Zhang et al., 2018*). Um festzustellen, ob die CDK9i ggf. relevante antiapoptotische Gene oder

Tumorsuppressorgene regulierten, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Es wurden lediglich die beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 allein im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in den beiden UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 untersucht. In beiden Zelllinien konnten zahlreiche Gene detektiert werden, die durch die Behandlung mit einem der beiden CDK9i hoch- bzw. herunterreguliert wurden. In der Ziellinie UM-UC-3 zeigten sich beispielsweise nach Behandlung mit LDC 000067 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 1117 differentiell exprimierte Gene. Davon waren 364 Gene hochreguliert und 753 herunterreguliert. Nach Behandlung von UM-UC-3-Zellen mit MC 180295 waren 153 Gene im Vergleich zur DMSO-Kontrolle differentiell exprimiert, wovon 18 Gene hochreguliert und 135 Gene herunterreguliert waren. Für die Zelllinie VM-CUB-1 zeigten sich durch MC 180295 insgesamt 242 Gene und durch LDC 000067 jeweils 254 Gene beeinflusst. Mit Hilfe von Venn-Diagrammen ließen sich die Daten für bestimmte Konditionen einfacher bewerten. Beispielsweise zeigten sich fünf überlappende Gene, die sowohl in der UCC UM-UC-3 als auch in der UCC VM-CUB-1 jeweils nach MC 180295 bzw. LDC 000067 Behandlung herunterreguliert wurden. Bei diesen fünf gemeinsamen Genen handelt es sich um *IFIT3*, *GDF15*, *PBXIP1*, *PGPEP1* und *GSN*. Zwischen diesen 5 Genen fand sich in der Funktion teilweise eine kleine Übereinstimmung, was die Regulation der Genexpression betrifft. Ansonsten waren sie an viralen Prozessen, an der negativen Regulation antiapoptotischer Prozesse oder am Auf- und Abbau von Aktinfilamenten beteiligt. Besonders interessant war dabei die Herunterregulation von *GDF-15*. Die Arbeitsgruppe von Melero et al. veröffentlichte 2024, dass beispielsweise in UCs und NSCLCs es zu einer Hochregulierung des Wachstumsdifferenzierungsfaktors *GDF-15* kommt. Zudem zeigten sie, dass eine Kombination aus *GDF-15*-Inhibition durch den Antikörper Visugromab und Checkpoint-Inhibitoren zu einer verstärkten Wirkung führt. Daraus ergibt sich ein vielversprechender Ansatz, um Resistenzen gegenüber Immuncheckpoint-Inhibitoren zu umgehen (Melero et al., 2024). Dieser Ansatz ist von besonderem Interesse, da durch die CDK9-Inhibition auf molekulargenetischer Ebene die *GDF-15*-Expression reduziert und somit ggf. das Ansprechen der Zellen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren verbessert werden könnte. Diese Theorie müsste durch weitere Experimente fortgeführt werden.

Mit Hilfe von GO-Gruppenanalysen wurden zelluläre Prozesse identifiziert, denen die herunterregulierten Gene zugeordnet werden konnten. Die Gruppen wurden entsprechend der Anzahl der Gene absteigend sortiert., wobei jede Kondition berücksichtigt wurde (VM-CUB-1 MC 180295 down; VM-CUB-1 LDC 000067 down, sowie UM-UC-3 MC

180295 down; UM-UC-3 LDC 000067 down). Beide CDK9i beeinflussten in der Zelllinie VM-CUB-1 Immunreaktionen (z.B. Interferon-Signalwege, Abwehrreaktion bzw. Reaktion auf Viren). Sie griffen jedoch auch beide auf unterschiedliche Art und Weise in die Genregulation (z.B. positive Regulation der Transkription) ein. Es ließen sich insgesamt 47 überlappende Gene festlegen, die sowohl durch MC 180295 als auch durch LDC 000067 in VM-CUB-1 herunterreguliert wurden. Dieses Verfahren wurde nun für alle weiteren Konditionen angewandt. In der Zelllinie UM-UC-3 konnten 106 überlappende, herunterregulierte Gene durch beide CDK9i festgelegt werden. Mit Hilfe der GO-Gruppenanalyse konnte auch hier veranschaulicht werden, welche Prozesse am häufigsten beeinflusst wurden. Durch die MC-180295-Behandlung wurden vor allem Gene herunterreguliert, die den Interferon-Signalweg beeinflussten. Des Weiteren wurden auch die positive Regulierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalübertragung, die positive Regulierung der Zellproliferation, die Abwehrreaktion auf Viren sowie die Herunterregulierung der extrinsischen Apoptosesignalwege negativ beeinflusst. Für die Kondition LDC 000067 und UM-UC-3 wurden vor allem Gene herunterreguliert, die an der Steuerung der durch die kleine GTPase vermittelten Signaltransduktion, an der Regulierung der Mitose sowie an der positiven Regulierung der Transkription des RNA-Polymerase-II-Promotors als Reaktion auf Stress im endoplasmatischen Retikulum negativ beteiligt waren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Inhibition von CDK9 in UCCs vor allem zu einer Herunterregulation von Genen führt, die an einer immunologischen Antwort sowie an der Genexpression beteiligt sind. Die Immuntherapie stellt bereits seit einigen Jahren eine bedeutende Säule in der Behandlung von UCs dar. Als Monotherapien finden Checkpoint-Inhibitoren ihren Einsatz bei nicht-platin-geeigneten Patienten mit positiver PD-L1-Expression in der Erstlinientherapie (Atezolizumab, Pembrolizumab), in der Erhaltungstherapie nach platinbasierter Erstlinientherapie (Avelumab) oder als Zweitlinientherapie nach Versagen einer platinbasierten Therapie (Pembrolizumab). Als Kombinationspartner werden Checkpoint-Inhibitoren in der Erstlinientherapie entweder zusammen mit dem Antibody-drug-conjugat (ADC) Enfortumab-Vedotin (Pembrolizumab) oder mit einer Cisplatin-basierten Chemotherapie (Gemcitabin/Cisplatin + Nivolumab) eingesetzt. Zusätzlich finden sie ihren Einsatz in der perioperativen Therapie (Durvalumab in Kombination mit Gemcitabin/Cisplatin, Nivolumab als adjuvante Monotherapie) (<https://uroweb.org/guidelines>). An diesem Punkt könnte die CDK9-Inhibition in UCs relevant werden, da diese, wie bereits zuvor beschrieben, zu einer signifikanten

Repression von Genen führt, die an verschiedenen immunologischen Prozessen beteiligt sind. Dies zeigte auch die Arbeitsgruppe Zhang et al. (2018), welche den CDK9i MC 180295 entwickelte. Sie stellten fest, dass eine gezielte CDK9-Inhibition möglicherweise die Zellen sensibilisiert, sodass eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren besser ansprechen könnte (Zhang et al., 2018). Zusammenfassend stellen CDK9i eine interessante Strategie hinsichtlich der Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren dar, jedoch ist eine weitere Erforschung unerlässlich, um diese Hypothese zu stützen.

Von Interesse war auch die Hochregulation von Genen durch die Inhibition von CDK9 in UCCs. Hier konnten keine überlappenden Gene festgestellt werden, die sowohl in beiden UCCs als auch durch beide CDK9i hochreguliert wurden. In der UCC VM-CUB-1 konnten 27 überlappende Gene festgestellt werden, die sowohl durch LDC 000067 als auch durch MC 180295 hochreguliert wurden. Mit Hilfe einer erneuten GO-Gruppenanalyse wurde festgestellt, welche Gene am häufigsten durch einen der beiden CDK9i positiv beeinflusst wurden. Unter MC 180295 Behandlung wurden am häufigsten Gene positiv beeinflusst, die Transkripte produzierten und die an der Chromosomentrennung beteiligt waren. Zudem waren Gene, die an der Zellteilung, an der Reaktion auf Medikamente, an der positiven Regulation der Zellproliferation sowie an der zellulären Reaktion auf Interleukin-1 beteiligt waren, vermehrt heraufreguliert. Im Vergleich zu dem CDK9i LDC 000067 ergaben sich teils ähnliche Gruppen, die durch die alleinige Behandlung der Zellen heraufreguliert wurden. Auch hier war die positive, aber auch die negative Regulierung der Zellproliferation positiv beeinflusst. Zusätzlich zeigte sich auch eine Heraufregulation der chemokinvermittelten Signalwege. Es ist sehr kritisch zu betrachten, inwiefern eine Induktion der Zellproliferation diese auch in Karzinomzellen begünstigt und somit zu einem Progress der Erkrankung führen könnte. Für LDC 000067 spricht, dass hier Gene zusätzlich heraufreguliert wurden, die die Zellproliferation negativ beeinflussen. Zukünftig müssten diese Gene genauer angeschaut werden, um entscheiden zu können, ob diese das Tumorwachstum unterstützen oder nicht. Wenn man sich dies vergleichend für die UCC UM-UC-3 anschaut, kann man feststellen, dass sich 14 überlappende, heraufregulierte Gene finden ließen, welche sowohl durch MC 180295 als auch durch LDC 000067 hochreguliert wurden. Auch hier erfolgte mittels GO-Gruppenanalyse eine Einteilung der Gene nach Funktion und eine Auflistung nach Anzahl der Gene pro übergeordnete Funktion. Eine GO-Gruppenanalyse war für die Behandlung mit MC 180295 nicht durchführbar, da nur insgesamt 18 Gene induziert wurden. Die heraufregulierten Gene nach LDC-000067-Behandlung waren vor allem an der

Regulation des Zellwachstums, an der Reparatur von Doppelbrüchen durch homologe Rekombination und an der Entwicklung der Spongiotrophoblastenschicht beteiligt. Zudem konnten Gene zusammengefasst werden, die an der tRNA-Verarbeitung, an der zellulären Reaktion auf DNA-Schadensreize sowie an der Zell-Zell-Signalübertragung beteiligt waren. Auch hier lässt sich feststellen, dass das Zellwachstum positiv beeinflusst wurde, was ähnlich kritisch zu betrachten ist wie in der UCC VM-CUB-1.

5.4 Ausblick und mögliche Hindernisse für weitere Forschungsreihen

Die weitere Erforschung auf dem Gebiet der HDAC- und CDK9-Inhibition ist aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse unerlässlich. Beide Inhibitoren zeigten ein vielversprechendes Potential in der Therapie von Urothelkarzinomen, jedoch gibt es einige Bereiche, die noch zu wenig erforscht sind. Einige in der Literatur für andere Entitäten beschriebene Wirkmechanismen könnten beim Urothelzellkarzinom möglicherweise nicht zu greifen. Auch die Frage nach der Toxizität gegenüber Normalgewebe müsste mit weiteren Kontrollen und Modellen genauer betrachtet werden.

Relevant für die weitere Erforschung von CDK9i ist das genaue Verständnis des Wirkmechanismus in UCCs und dessen, was diese von anderen Tumorentitäten unterscheidet, die ein gutes Ansprechen auf CDK9i zeigen. Ein möglicher relevanter molekularer Unterschied könnte in der Transkriptionsregulation von Urothelzellkarzinomen liegen. Die Kontrolle der Transkription und die damit einhergehende Aufrechterhaltung der Proliferation könnten ggf. weniger stark CDK9 abhängig sein. Daher führt die Inhibition von CDK9 zu keiner relevanten Auswirkung auf die Proliferation des Tumors. Die Arbeitsgruppe von Borowczak et al. veröffentlichte 2022, dass CDK9 in Urothelzellkarzinomen als prognostischer Marker dienen könnte. Die Überexpression von CDK9 korrelierte mit einem längeren Überleben der Patienten, der Tumorstadien und der Ausprägung des invasiven Wachstums (*Borowczak et al., 2022*). Dies könnte die zuvor aufgestellte These unterstützen, da auch dies bestätigt, dass eine hohe Konzentration von CDK9 nicht mit einer verstärkten Proliferation des Tumors einhergeht. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die unterschiedliche Expression von Zielmolekülen in unterschiedlichen Tumorentitäten. Möglicherweise könnte es in Urothelzellkarzinomen zu einer erhöhten Expression von CDK9 in seiner inaktiven Form kommen. Dies könnte die erhöhte Konzentration von CDK9 in Urothelzellkarzinomen

erklären und gleichzeitig die gute Prognose bei hohen CDK9-Konzentrationen bestätigen. Auch die Unterschiede hinsichtlich der Mutationsmuster und epigenetischer Regulationsmechanismen zwischen anderen Tumoren und Urothelzellkarzinomen könnten Ursachen für eine geringere Effektivität der CDK9i in Urothelzellkarzinomen sein.

Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen synergistischen Effekt durch die Kombination aus CDK9i und HDACi Mocetinostat in Urothelzellkarzinomen zu untersuchen. Die molekularen Mechanismen der Kombination bestanden zum einen aus der Wirkung des CDK9i, welcher die Transkription allgemein hemmt. Zum anderen bestanden sie aus der Wirkung des HDACi Mocetinostat, welcher gezielt über die Veränderung der Chromatinstruktur die Expression von Tumor-Suppressorgenen erhöht. Es ist anzunehmen, dass die Kombination, unter Berücksichtigung ihrer individuellen Wirkungen, gleichzeitig zu einer Unterdrückung von Onkogenen und einer Aktivierung von Tumor-Suppressorgenen führt und damit die Apoptose der Karzinomzellen fördert. Zudem wird angenommen, dass die Kombination die Expression pro-apoptotischer Proteine stärker erhöht als ein einzelner Wirkstoff. Der Grund warum sich diese Effekte gar nicht oder nur in geringem Ausmaß in den Ergebnissen widerspiegeln, ist nicht abschließend geklärt. Mögliche Gründe könnten etwa eine komplexe Redundanz innerhalb der Transkriptionswege sein. So könnte ggf. die einzelne Wirkung eines Inhibitors abgeschwächt bzw. seine Wirkung an den Zielstrukturen nicht vollständig entfaltet worden sein. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Urothelzellkarzinome sehr vielfältig sind und daher unterschiedlich auf die therapeutische Kombination reagieren, was auch in den zuvor behandelten Ergebnissen deutlich wurde. Neben der Heterogenität der Urothelzellkarzinome spielen auch die richtige Dosierung und der Zeitpunkt der Medikationsgaben eine wichtige Rolle, um eine potente Synergie zu erreichen.

Ein vielversprechender Ansatz könnte die Kombination aus Immuncheckpoint-Inhibitor und einem CDK9i darstellen. Wie bereits in den Auswertungen der RNA-Sequenzierung beschrieben, konnte nach Inhibition von CDK9 festgestellt werden, dass viele immunologische Signalwege betroffen waren. Hier ist eine weiterführende Analyse der Daten erforderlich, um genauere Bedingungen für experimentelle Untersuchungen festzulegen. Im Verlauf wäre nach Behandlung der UCCs mit der Kombination aus ICI und CDK9i eine Immunzellfiltration sowie die Messung der Expression von Immun-

Checkpoints auf den Tumorzellen notwendig. Interessante Punkte wären auch die Bestimmung genetischer und molekularer Biomarker sowie die Untersuchung transkriptioneller Veränderungen oder die Auswirkung auf Apoptose und Zellzyklus. Da die CDK9-Inhibition viele Zytokin-abhängige Signalwege beeinflusst, könnten auch Zytokin-Profile interessante Ergebnisse erzielen. Neben den Auswirkungen auf die Tumorzellen spielte auch die Normaltoxizität eine bedeutende Rolle. Zunächst müsste diese im Rahmen von in-vitro-Tests an gesunden Zellen getestet werden. Im weiteren Verlauf wären ggf. Tiermodelle erforderlich, um die systemische Toxizität oder mögliche Organschäden beurteilen zu können. Dies ist auch erforderlich, um die Dosierung der Medikation genauer bestimmen zu können.

5.5 Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der HDACi Mocetinostat in den beiden UCCs UM-UC-3 und VM-CUB-1 zu einer Reduktion der Proliferation, zur Induktion der Apoptose sowie zum Zellzyklusarrest führte. Die beiden CDK9i MC 180295 und LDC 000067 zeigten eine gering ausgeprägte Reduktion der Kurzzeitproliferation, auf die Langzeitproliferation war kein nennenswerter Einfluss festzustellen. Es war ebenfalls, auch wenn nur eine leichte Induktion der Apoptose durch MC 180295 zu beobachten, jedoch zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf den Zellzyklus. Alle drei Inhibitoren führten in der UEC HBLAK zur Abnahme der Proliferation, zum Zellzyklusarrest und auch zur Apoptoseinduktion. Vergleicht man die Ergebnisse der Monotherapien mit denen der kombinierten Therapie, fällt auf, dass in der UCC UM-UC-3 Mocetinostat allein einen signifikanten Einfluss auf die Zellen hatte. Die CDK9-Inhibition allein hatte jedoch eher wenig bis gar keinen Effekt. Auch die kombinierte Therapie aus HDACi und CDK9i führte zu keinem sicheren synergistischen Effekt auf die Zellen. Es zeichnete sich der gleiche Effekt wie zuvor durch Mocetinostat allein, ab. Zu hinterfragen bleibt die Verwendung des einfachen IC_{50} -Werts für die Monotherapie und des 0,75-fachen IC_{50} -Werts für die kombinierte Therapie des jeweiligen Wirkstoffes. Trotz der Dosisreduktion, aber auch der Verwendung zweier Inhibitoren wurde der gleiche Effekt wie durch Mocetinostat allein herbeigeführt. Für die UCC VM-CUB-1 ließ sich dieses Muster nicht erkennen. Hier zeigte sich die kombinierte Therapie, vor allem die Kombination aus Mocetinostat und LDC 000067, am wirksamsten auf die Proliferation der Zellen und die

Induktion der Apoptose. Hier ist von einem, wenn auch nur geringen, synergistischen Effekt auszugehen. Auch die UEC HBLAK ließ nach Kombinationstherapie einen geringen synergistischen Effekt erkennen. Die Kombination sorgte für eine leichte Zunahme der Apoptoseinduktion.

Ordnet man die erhobenen Daten, einschließlich der RNAseq-Daten, in den Kontext der heutigen Forschung ein, kann festgehalten werden, dass sowohl HDACs als auch CDK9 beliebte Angriffspunkte neuer Studien sind. Wie bereits im Ausblick beschrieben, bieten die CDK9i in Hinblick auf ihre immunologischen Komponenten einen vielversprechenden, jedoch noch zu wenig erforschten Angriffspunkt für zukünftige Therapiemodelle. Jedoch stellt die Inhibition von CDK9 allein kein sinnvolles Therapietarget dar. Auch die Kombination mit dem HDACi Mocetinostat stellt aufgrund des nur sehr gering ausgeprägten synergetischen Effekts keine mögliche Option dar. Lediglich die Kombination aus CDK9i und einem Immuncheckpoint-Inhibitor könnte sich unter Berücksichtigung der RNAseq-Daten als sinnvolle und effiziente Kombinationstherapie in Urothelzellkarzinomen erweisen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Klassifikation anhand der Tumorgroße	4
Abb. 2: Wirkmechanismus der HDACs und HATs	9
Abb. 3: Darstellung der CDK9-Aktivität bzw. CDK9-Inhibition auf die RNA-Polymerase II	18
Abb. 4: Darstellung des Einflusses von MC 180295 auf die RNA-Polymerase II	21
Abb. 5: Darstellung der BRG-1 Aktivität in Abhängigkeit von CDK9	22
Abb. 6: Exemplarischer Western Blot zur Darstellung des CDK9 Expression verschiedener UCCs, sowie der UEC HBLAK auf Proteinebene	49
Abb. 7: Exemplarische Dosiswirkungskurve der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat sowie den CDK9i MC 180295 und LDC 000067	52
Abb. 8: Kalkulierte IC ₅₀ -Werte der UCC VM-CUB-1 mit dem Programm Quest Graph™ IC ₅₀ Calculator	53
Abb. 9: Exemplarische Untersuchung von Kombinationen eines HDACi und eines CDK9i in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK	56
Abb. 10: Exemplarische Quantifizierung des Effektes der Inhibitoren allein und in Kombination auf die Kurzzeitproliferation der Zelllinien UM-UC-1, VM-CUB-1 und HBLAK mit Hilfe eines MTT-Viabilitäts-Tests über 96 h	59
Abb. 11: Exemplarische Exploration der langfristigen Proliferationsfähigkeit der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach Behandlung mit dem HDACi Mocetinostat und den CDK9i MC 180295 bzw. LDC 000067 mittels Klonogenitäts- Tests	61
Abb. 12: Exemplarische Zellzyklusanalyse der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie.....	63
Abb. 13: Darstellung der relativen Mittelwerte mittels Säulendiagrammen aus drei unabhängigen Zellzyklusanalysen (n = 3) der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h.....	64
Abb. 14: Exemplarisches Annexin-V-PI-Test der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Annexin-V- und Propidiumiodid-färbung. Die Messung wurde mit Hilfe einer Durchflusszytometrie durchgeführt	66

Abb. 15: Darstellung der relativen Mittelwerte mittels Säulendiagrammen aus drei unabhängigen Annexin-V-PI-Tests (n = 3) der Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h.....	69
Abb. 16: Exemplarische Validierung der Apoptose-Induktion durch den Nachweis von cleaved PARP in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK mittels Western Blot	71
Abb. 17: Exemplarische Darstellung des Proteinniveaus des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot	72
Abb. 18: Exemplarische Darstellung des Proteinniveaus des antiapoptotischen Proteins MCL-1 in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot	74
Abb. 19: Exemplarische Darstellung der Proteinexpression des Onkoproteins MYC in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot...	75
Abb. 20: Exemplarischer Nachweis der aktiven phosphorylierten Form der RNA-Polymerase II in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot	77
Abb. 21: Exemplarischer Nachweis des Proteinniveaus von BRG-1 in den Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB-1 und HBLAK nach 48 h mittels Western Blot.....	79
Abb. 22: Darstellung der Anzahl herunterregulierter Gene nach Behandlung mit CDK9i in den Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 mittels Venn-Diagramm	82
Abb. 23:	
A) Darstellung der herunterregulierten Gene nach Monobehandlung mit CDK9i in der Zelllinie VM-CUB-1 mittels Venn-Diagramm	83
B) Ausschnitt aus der Einteilung der betroffenen Gene mittels GO-Gruppenanalyse für die jeweilige Kondition der Zelllinie VM-CUB 1 (1. MC 180295 down; 2. LDC 000067 down)	83
Abb. 24:	
A) Darstellung der herunterregulierten Gene nach Monobehandlung mit CDK9i in der Zelllinie UM-UC-3 mittels Venn-Diagramm.....	85

B) Ausschnitt aus der Einteilung der betroffenen Gene mittels GO-Gruppenanalyse für die jeweilige Kondition der Zelllinie UM-UC-3 (1. MC 180295 down; 2. LDC 000067 down)	85
---	----

Abb. 25: Darstellung der Anzahl hochregulierter Gene nach Behandlung mit CDK9i in den Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 mittels Venn-Diagramm.	87
---	----

Abb. 26:

A) Darstellung der heraufregulierten Gene nach Monobehandlung mit CDK9i in der Zelllinie VM-CUB-1 mittels Venn-Diagramm	88
B) Ausschnitt aus der Einteilung der betroffenen Gene mittels GO-Gruppenanalyse für die jeweilige Kondition der Zelllinie VM-CUB 1 (1. MC 180295 up; 2. LDC 000067 up)	88

Abb. 27:

A) Darstellung der heraufregulierten Gene nach Monobehandlung mit CDK9i in der Zelllinie UM-UC-3 mittels Venn-Diagramm	90
B) Ausschnitt aus der Einteilung der betroffenen Gene mittels GO-Gruppenanalyse für die jeweilige Kondition der Zelllinie UM-UC-3 (1. MC 180295 up; 2. LDC 000067 up)	90

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten UCCs und der UEC	25
Tab. 2: Aufstellung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	25
Tab. 3: Aufstellung der verwendeten molekularbiologischen Kids	28
Tab. 4: Puffer und Lösungen für die Herstellung von Proteinlysaten	28
Tab. 5: Puffer und Lösungen für Western Blots	28
Tab. 6: Puffer und Lösungen für Zellzyklusanalysen	29
Tab. 7: Puffer und Lösungen für Annexin-V-PI-Tests	29
Tab. 8: Puffer und Lösungen für das BCA-Assay	29
Tab. 9: Aufstellung der verwendeten Antikörper für Western Blots	30
Tab. 10: Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	31
Tab. 11: Aufstellung der verwendeten Geräte	32
Tab. 12: Aufstellung der verwendeten Software	33
Tab. 13: Aufstellung der verwendeten Datenbanken	34
Tab. 14: Darstellung der Zusammensetzung der Trenngele	42
Tab. 15: Darstellung der Zusammensetzung des Sammelgels	43
Tab. 16: Finale IC ₅₀ -Werte für alle drei Zelllinien	53
Tab. 17: Differentiell exprimierte Gene der Zelllinien UM-UC-3 und VM-CUB-1 im Vergleich DMSO Lösungsmittel und CDK9i	81
Tab. 18: Auflistung der Gene, die durch die CDK9-Inhibition beeinflusst wurden	128

8 Literaturverzeichnis

- Adelman, K.; Lis, J. T., (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature Reviews Genetics*, 13, S. 720–731.
- Razin, A.; Riggs, A. D., (1980). DNA Methylation and Gene Function. *SCIENCE*, VOL. 210, S. 604-610.
- Albert, T. K.; Rigault, C.; Eickhoff, J.; Baumgart, K.; Antrecht, C.; Klebl, B.; Mittler, G.; Meisterernst, M., (2014). Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor. *British journal of pharmacology*, 171, S. 55–68.
- Almouzni, G.; Cedar, H., (2016). Maintenance of Epigenetic Information. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8.
- Baluapuri, A.; Wolf, E.; Eilers, M., (2020). Target gene-independent functions of MYC oncoproteins. *Nature reviews, Molecular cell biology*, 21, S. 255–267.
- Bachy, E.; Camus, V.; Thieblemont, C.; Sibon, D.; Casasnovas, R.-O.; Ysebaert, L.; Damaj, G.; Guidez, S.; Pica, G. M.; Kim, W. S.; Lim, S. T.; André, M.; García-Sánchez, A. M.; Penarrubia, M. J.; Staber, P. B.; Trotman, J.; Hüttmann, A.; Stefoni, V.; Re, A.; Gaulard, P.; Delfau-Larue, M.-H.; de Leval, L.; Meignan, M.; Li, J.; Morschhauser, F.; Delarue, R., (2021). Romidepsin plus CHOP versus CHOP in patients with previously untreated peripheral T-cell lymphoma: Results of the Ro-CHOP phase III study (conducted by LYSA). *Journal of Clinical Oncology*, 40, S. 242–251.
- Barboric, M.; Nissen, R. M.; Kanazawa, S.; Jabrane-Ferrat, N.; Peterlin, B. M., (2001). NF- κ B binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular Cell*, Vol. 8, S. 327–337.
- Barkett, M.; Gilmore, T. D., (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18, S. 6910 – 6924.
- Bhutkar, S.; Yadav, A.; Dukhande, V., (2023). Mechanistic Investigation of a Combination of a Cell Cycle Inhibitor and an HDAC Inhibitor in Pancreatic Cancer Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 385, S. 433.
- Borowczak, J.; Szczerbowski, K.; Maniewski, M.; Zdrenka, M.; Słupski, P.; Andrusewicz, H., Lysik-Miskurka, J.; Rutkiewicz, P.; Bodnar, M.; Szyłberg, L., (2023). The prognostic role of p53 and its correlation with CDK9 in urothelial carcinoma. *Clinical & translational Oncology*, 25, S. 830–840.
- Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A., (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, S. 229–263.
- Briere, D.; Sudhakar, N.; Woods, D. M.; Hallin, J.; Engstrom, L. D.; Aranda, R.; Chiang, H.; Sodre, A. L.; Olson, P.; Weber, J. S., (2018). The class I/IV HDAC inhibitor mocetinostat increases tumor antigen presentation, decreases immune suppressive cell types and

- augments checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, CII 67, S. 381–392.
- Bubeník, J.; Perlmann, P.; Helmstein, K.; Moberger, G. M., (1970). Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *International Journal of Cancer*, 5, S. 310–319.
- Cancer Genome Atlas Research Network, 2014
- Cao, L.; Chen, F.; Yang, X.; Xu, W.; Xie, J.; Yu, L., (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 14.
- Soldani, C.; Scovassi, A. I., (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*, 7, S. 321.
- Cheng, Y.-T.; Li, Y.-L.; Wu, J. D.; Long, S.-B.; Tzai, T.-S.; Tzeng, C.-C.; Lai, M.-D., (1995). Overexpression of MDM-2 mRNA and mutation of the p53 tumor suppressor gene in bladder carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, 13, S. 173–181.
- Cidado, J.; Boiko, S.; Proia, T.; Ferguson, D.; Criscione, S. W.; San Martin, M.; Pop-Damkov, P.; Su, N.; Roamio Franklin, V. N.; Chilamakuri, C. S. R.; D'Santos, C. S.; Shao, W.; Saeh, J. C.; Koch, R.; Weinstock, D. M.; Zinda, M.; Fawell, S. E.; Drew, L., (2020). AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces Apoptosis in Hematologic Cancer Cells. *Clinical cancer*, 26, S. 922–934.
- Clinical Trials gov - *NCT02345382*
- Clocchiatti, A.; Florean, C.; Brancolini, C., (2011). Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15, S. 1833–1846.
- Dahmus, M. E., (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry*, 271 (32), S. 19009–19012.
- de Ruijter, A. J. M.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. P., (2003). Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, 370 (Pt 3), S. 737–749.
- Dietrich, J. B., (1997). Apoptose et gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. *Archives of physiology and biochemistry*, 105 (2), S. 125–135.
- Dokmanovic, M.; Clarke, C.; Marks, P. A., (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research*, 5 (10), S. 981–989.
- Doshi, B.; Athans, S. R.; Woloszynska, A., (2023). Biological differences underlying sex and gender disparities in bladder cancer: current synopsis and future directions. *Oncogenesis*, 12 (1), S. 44–54.
- Duex, J. E.; Swain, K. E.; Dancik, G. M.; Paucek, R. D.; Owens, C.; Churchill, M. E. A.; Theodorescu, D., (2018). Functional Impact of Chromatin Remodeling Gene Mutations and Predictive Signature for Therapeutic Response in Bladder Cancer. *Molecular Cancer Research*, 16 (1), S. 69–77.
- Eberhardy, S. R.; Farnham, P. J., (2001). C-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 276 (51), S. 48562–48571.

- Egloff, S., (2021). CDK9 keeps RNA polymerase II on track. *Cellular and molecular life sciences*, 78 (14), S. 5543–5567.
- Felsenfeld, G., (2014). The evolution of epigenetics. *Perspectives in biology and medicine*, 57 (1), S. 132–148.
- Fletcher, S., (2019). MCL-1 inhibitors - where are we now (2019)? *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(11), S. 909–919.
- Fournel, M.; Bonfils, C.; Hou, Y.; Yan, P. T.; Trachy-Bourget, M.-C.; Kalita, A.; Liu, J.; Lu, A.-H.; Zhou, N. Z.; Robert, M.-F.; Gillespie, J.; Wang, J. J.; Ste-Croix, H.; Rahil, J.; Lefebvre, S.; Moradei, O.; Delorme, D.; MacLeod, A. R.; Bestermann, J. M.; Li, Z., (2008). MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (4), S. 759–768.
- Fujii, T.; Nishikawa, J.; Fukuda, S.; Kubota, N.; Nojima, J.; Fujisawa, K.; Ogawa, R.; Goto, A.; Hamabe, K.; Hashimoto, S.; Wai, A. P.; Iizasa, H.; Yoshiyama, H.; Sakai, K.; Suehiro, Y.; Yamasaki, T.; Takami, T., (2022). MC180295 Inhibited Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma Cell Growth by Suppressing DNA Repair and the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (18). S. 10597.
- Furtado, C. L. M.; Dos Santos Luciano, M. C.; Da Silva Santos, R.; Furtado, G. P.; Moraes, M. O.; Pessoa, C., (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176.
- Gibney, E. R.; Nolan, C. M., (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105 (1), S. 4–13.
- Greger, V.; Debus, N.; Lohmann, D.; Höpping, W.; Passarge, E.; Horsthemke, B., (1994). Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Human Genetics*, 94(5), S. 491–496.
- Grimm M.O., Jurgens B., Schulz W.A., Decken K., Makri D. and Schmitz-Dräger B.J. (1995) Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines. *Urological Research* 23(5): 293-300.
- Gong, Fade; Miller, Kyle M. (2013): Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. In: *Mutation research* 750 (1-2), S. 23–30. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.002.
- Grimm, M.O.; Jürgens, B.; Schulz, W. A.; Decken, K.; Makri, D.; Schmitz-Dräger, B. J., (1995). Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines. *Urological Research*, 23 (5), S. 293-300.
- Grivas, P.; Mortazavi, A.; Picus, J.; Hahn, N. M.; Milowsky, M. I.; Hart, L. L.; Alva, A.; Bellmunt, J.; Pal, S. K.; Bambury, R. M.; O'Donnell, P. H.; Gupta, S.; Guancial, E. A.; Sonpavde, G. P.; Faltaos, D.; Potvin, D.; Christensen, J. G.; Chao, R. C.; Rosenberg, J. E., (2019). Mocetinostat for patients with previously treated, locally advanced/metastatic urothelial carcinoma and inactivating alterations of acetyltransferase genes. *Cancer*, 125 (4), S. 533–540.
- Grossman, H. B.; Wedemeyer, G.; Ren, L.; Wilson, G. N.; Cox, B., (1986). Improved growth

- of human urothelial carcinoma cell cultures. *Journal of Urology*, 136(4), S. 953–959.
- Guan, P.; Chen, J.; Mo, C.; Fukawa, T.; Zhang, C.; Cai, X.; Li, M.; Hong, J. H.; Chan, J. Y.; Young Ng, C. C.; Lee, J. Y.; Wong, S. F.; Liu, W.; Zeng, X.; Wang, P.; Xiao, R.; Rajasegaran, V.; Myint, S. S.; Sun Lim, A. M.; Sheng Yeong, J. P.; Tan, P. H.; Ong, C. K.; Xu, Tao; Du, Yiqing; Bai, F.; Yao, X.; The, B. T.; Tan, J., (2024). Comprehensive molecular characterization of collecting duct carcinoma for therapeutic vulnerability. *EMBO Molecular Medicine*, 16 (9), S. 2132–2145.
- Guo, G.; Sun, X.; Chen, C.; Wu, S.; Huang, P.; Li, Z.; Dean, M.; Huang, Y.; Jia, W.; Zhou, Q.; Tang, A.; Yang, Z.; Li, X.; Song, P.; Zhao, X.; Ye, R.; Zhang, S.; Lin, Z.; Qi, M.; Wan, S.; Xie, L.; Fan, F.; Nickerson, M. L.; Zou, X.; Hu, X.; Xing, L.; Lv, Z.; Mei, H.; Gao, S.; Liang, C.; Gao, Z.; Lu, J.; Yu, Y.; Liu, C.; Li, L.; Fang, X.; Jiang, Z.; Yang, J.; Li, C.; Zhao, X.; Chen, J.; Zhang, F.; Lai, Y.; Lin, Z.; Zhou, F.; Chen, H.; Chang Chan, H.; Tsang, S.; Theodorescu, D.; Li, Y.; Zhang, X.; Wang, J.; Yang, H.; Gui, Y.; Wang, J.; Cai, Z., (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, S. 1459–1463.
- Haberland, M.; Montgomery, R. L.; Olson, E. N., (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics*, 10 (1), S. 32–42.
- Han, H.; Wolff, E. M.; Liang, G., (2012). Epigenetic alterations in bladder cancer and their potential clinical implications. *Advances in Urology*, 2012.
- Heijkants, R.; Willekens, K.; Schoonderwoerd, M.; Teunisse, A.; Nieveen, M.; Radaelli, E.; Hawinkels, L.; Marine, J.-C.; Jochemsen, A., (2018). Combined inhibition of CDK and HDAC as a promising therapeutic strategy for both cutaneous and uveal metastatic melanoma. *Oncotarget*, 9 (5), S. 6174–6187.
- Hendricks, K. B.; Shanahan, F.; Lees, E., (2004). Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Molecular and cellular biology*, 24 (1), S. 362–376.
- 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), S. 12460–12484.
- Hochegger, H.; Shunichi, T.; Hunt, T., (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), S. 49–59.
- 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.; Koutsogiannouli, E.; Skowron, M. A.; Pinkerneil, M.; Niegisch, G.; Brandt, A.; Stepanow, S.; Rieder, H.; Schulz, W. A., (2016). The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors. *Bladder cancer*, 2 (4), S. 449–463.
- Hu, E.; Chen, Z.; Fredrickson, T.; Zhu, Y.; Kirkpatrick, R.; Zhang, G.-F.; Johanson, K.; Sung,

- C.-M.; Liu, R.; Winkler, J., (2000). Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (20), S. 15254–15264.
- Huang, R.; Zhang, X.; Min, Z.; Shadia, A. S.; Yang, S.; Liu, X., (2018). MGCD0103 induces apoptosis and simultaneously increases the expression of NF- κ B and PD-L1 in classical Hodgkin's lymphoma. *Experimental and therapeutic medicine*, 16 (5), S. 3827–3834.
- Ilango, S.; Paital, B.; Jayachandran, P.; Padma, P. R.; Nirmaladevi, R., (2020). Epigenetic alterations in cancer. *Frontiers in Bioscience, Landmark*, 25, S. 1058–1109.
- Kraywinkel, K.; Fiebig, J.; Schulz, G. B., (2018). Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 2018, 24 (1), S. 6–13.
- Kyriazis, A. A.; Kyriazis, A. P., McCombs, W. B.; Peterson, W. D., (1984). Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice. *Cancer Research*, 44 (9), S. 3997–4005.
- 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. *Cancer Research*, 83 (12), S. 2345–2355.
- Lee, D. K.; Duan, H. O.; Chang, C., (2001). Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (13), S. 9978–9984.
- Li, H.; Zhang, Z.; Wang, B.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Jin, Y., (2007). Wwp2-mediated ubiquitination of the RNA polymerase II large subunit in mouse embryonic pluripotent stem cells. *Molecular and cellular biology*, 27 (15), S. 5296–5305.
- Liao, B.; Sun, Q.; Yuan, Y.; Yin, Y.; Qiao, J.; Jiang, P., (2020). Histone deacetylase inhibitor MGCD0103 causes cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in liver cancer cells. *Journal of Cancer*, 11 (7), S. 1915–1926.
- Lin, R. J.; Sternsdorf, T.; Tini, M.; Evans, R. M., (2001). Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20(49), S. 7204–7215.
- Lu, Q., (2013). The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 41, S. 1–5.
- Lücking, U.; Scholz, A.; Lienau, P.; Siemeister, G.; Kosemund, D.; Bohlmann, R.; Briem, H.; Terebesi, I.; Meyer, K.; Prella, K.; Denner, K.; Bömer, U.; Schäfer, M.; Eis, K.; Valencia, R.; Ince, S.; von Nussbaum, F.; Mumberg, D.; Ziegelbauer, K.; Klebl, B.; Choidas, A.; Nussbaumer, P.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Rühter, G.; Eickhoff, J.; Brands, M., (2017). Identification of Atuveciclib (BAY 1143572), the First Highly Selective, Clinical PTEFb/CDK9 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *ChemMedChem*, 12 (21), S. 1776–1793.
- MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R., (2005). Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II–Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res*, 65 (12), S. 5399–5407.

- Malumbres, M., (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 10 (6).
- Marshall, C. J.; Franks, L. M.; Carbonell, A. W., (1977). Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(6), 1743–1751.
- Masters, J. R.; Hepburn, P. J.; Walker, L.; Highman, W. J.; Trejdosiwicz, L. K.; Povey S.; Parkar, M.; Hill, B. T.; Riddle, P. R.; Franks, L. M., (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Research*, 46 (7), S. 3630-3636.
- Meneceur, S.; De Vos, C. E.; Petzsch, P.; Köhrer, K.; Niegisch, G; Hoffmann, M. J., (2024). New synergistic combination therapy approaches with HDAC inhibitor quisinostat, cisplatin or PARP inhibitor talazoparib for urothelial carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 28 (9).
- Melero, I.; de Miguel Luken, M.; de Velasco, G.; Garralda, E.; Martín-Liberal, J.; Joerger, M.; Alonso, G.; Goebeler, M.-E.; Schuler, M.; König, D.; Dummer, R.; Reig, M.; Rodriguez Ruiz, M.-E.; Calvo, E.; Esteban-Vllarrubia, J.; Oberol, A.; Sabat, P.; Soto-Castillo, J. J.; Koster, K.-L.; Saavedra, O.; Sayehli, C.; Gromke, T.; Läubli, H.; Ramelyte, E.; Fortuny, M.; Landa-Magdalena, A.; Moreno, I.; Torres-Jlmenez, J.; Hernando-Calvo, A.; Hess, D.; Racca, F.; Richly, H.; Schmitt, A. M.; Eggenschwller, C.; Sanduzzi-Zamparelli, M.; Vllalta-Lacarra, A.; Trojan, J.; Koch, C.; Galle, P. R.; Foerster, F.; Trajanoski, Z.; Hackl, H.; Gogolla, F.; Koll, F. J.; Wild, P.; Hwan Chun, F. K.; Reis, H.; Lloyd, P.; Machacek, M.; Gajewski, T. F.; Fridman, W. H.; Eggermont, A. M. M.; Bargou, R.; Schöniger, S.; Rüschoff, J.; Tereshchenko, A.; Zink, C.; da Silva, A.; Lichtenegger, F. S.; Akdemir, J.; Rüdiger, M.; L'Huller, P.; Dutta, A.; Haake, M.; Auckenthaler, A.; Gjorgjloska, A.; Rössler, B.; Hermann, F.; Liebig, M.; Relchhardt, D.; Schuberth-Wagner, C.; Wischhusen, J.; Fettes, P.; Auer, M.; Klar, K.; Leo, E., (2024). Neutralizing GDF-15 can overcome anti-PD-1 and anti-PD-L1 resistance in solid tumours. *Nature*, März 2025, online, 639 (8054).
- Mithraprabhu, S.; Kalff, A.; Gartlan, K. H.; Savvidou, I.; Khong, T.; Ramachandran, M.; Cooke, R. E.; Bowen, K.; Hill, G. R.; Reynolds, J.; Spencer, A., (2021). Phase II trial of single-agent panobinostat consolidation improves responses after sub-optimal transplant outcomes in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 193 (1), S. 160–170.
- Molife, L. R.; Attard, G.; Fong, P. C.; Karavasilis, V.; Reid, A. H. M.; Patterson, S.; Riggs, C. E.; Higano, C.; Stadler, W. M.; McCulloch, W.; Dearnaley, D.; Parker, C.; de Bono, J. S., (2010). Phase II, two-stage, single-arm trial of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) romidepsin in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Annals of Oncology*, 21 (1), S. 109–113.
- Morales, F.; Giordano, A., (2016). Overview of CDK9 as a target in cancer research. *Cell cycle*, 15 (4), S. 519–527.
- Niegisch, G.; Hoffmann, M. J.; Koutsogiannouli, E. A.; Schulz, W. A. (2015). Epigenetik des Urothelkarzinoms: Pathogenese, verbesserte Diagnostik und neue Therapieansätze. *Der Urologe*, 54 (4), S. 526–532.
- Niegisch, G.; Knievel, J.; Koch, A.; Hader, C.; Fischer, U.; Albers, P.; Schulz, W. A. (2013).

- Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urologic Oncology*, 31 (8), S. 1770–1779.
- O'Toole, Christine M.; Povey, Susan; Hepburn, Patricia; Franks, Lionel M. (1983). Identity of some human bladder cancer cell lines. *Nature*, 301(5899), S. 429–430.
- Peixoto, P.; Cartron, P.-F.; Serandour, A. A.; Hervouet, E., (2020). From 1957 to Nowadays: A Brief History of Epigenetics. *International journal of molecular sciences*, 21 (20).
- Pinkerneil, M.; Hoffmann, M. J.; Deenen, R.; Köhrer, K.; Arent, T.; Schulz, W. A.; Niegisch, G., (2016). Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*, 15 (2), S. 299–312.
- Pinkerneil, M.; Hoffmann, M. J.; Niegisch, G., (2023). Epigenetic treatment options in urothelial carcinoma. *Urothelial Carcinoma, Methods and Protocols*, 5 (21), S. 289–318.
- Porten, S. P., (2018). Epigenetic Alterations in Bladder Cancer. *Current urology reports*, 19 (12), S. 102.
- Powles, T.; Bellmunt, J.; Comperat, E.; De Santis, M. ; Huddart, R.; Loriot, Y.; Necchi, A.; Valderrama, B. P.; Ravaud, A.; Shariat, S. F.; Szabados, B.; van der Heijden, M. S.; Gillissen, S.; on behalf of the ESMO Guidelines Committee, (2022). Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 33 (3), S. 244–258.
- Powles, T.; Valderrama, B. P.; Gupta, S.; Bedke, J.; Kikuchi, E.; Hoffman-Censits, J.; Iyer, G.; Vulsteke, C.; Park, S. H.; Shin, S. J.; Castellano, D.; Fornarini, G.; Li, J.-R.; Gümüş, M.; Mar, N.; Loriot, Y.; Flechon, A.; Duran, I.; Drakaki, A.; Narayanan, S.; Yu, X.; Gorla, S.; Horne Moreno, B.; van der Heijden, M. S., (2024). Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 390 (10), S. 875–888.
- Poyet, C., Jentsch, B.; Hermanns, T.; Schwenkendiék, D.; Seifert, H.-H.; Schmidtpeter, M.; Sulser, T.; Moch, H.; Wild, P. J.; Kristiansen, G., (2014). Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer. *BMC Clinical Pathology*, 14, 10.
- Quinn, D. I.; Tsao-Wei, D. D.; Twardowski, P.; Aparicio, A. M.; Frankel, P.; Chatta, G.; Wright, J. J.; Groshen, S. G.; Khoo, S.; Lenz, H.-J.; Lara, P. N.; Gandara, D. R.; Newman, E., (2021). Phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid; SAHA) in recurrent or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium - an NCI-CTEP sponsored: California Cancer Consortium trial, NCI 6879. *Investigational new drugs*, 39 (3), S. 812–820.
- Rahl, P. B.; Lin, C. Y.; Seila, A. C.; Flynn, R. A.; McCuine, S.; Burge, C. B.; Sharp, P. A.; Young, R. A., (2010). C-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell*, 141 (3), S. 432–445.
- Rasheed, S.; Gardner M.B.; Rongey, R.W.; Nelson-Rees, W.A; Arnstein P., (1977). Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *Journal of the National Cancer Institute*, 58 (4), S. 881–890.
- Raynal, N. J-M; Si, J.; Taby, R. F.; Gharibyan, V.; Ahmed, S.; Jelinek, J.; Estecio, M. R. H.;

- Issa, J.-P. J., (2012). DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer research*, 72 (5), S. 1170–1181.
- Robert Koch Institut (2022): Krebs - Harnblasenkrebs. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasenkrebs_node.html, zuletzt aktualisiert am 14.03.2022, zuletzt geprüft am 14.03.2022.
- Robertson, A. G.; Kim, J.; Al-Ahmadie, H.; Bellmunt, J.; Guo, G.; Cherniack, A. D.; Hinoue, T.; Laird, P. W.; Hoadley, K. A.; Akbani, R.; Castro, M. A. A.; Gibb, E. A.; Kanchi, R. S.; Gordenin, D. A.; Reuter, V. E.; Su, X.; de Sa Carvalho, B.; Chagas, V. S.; Mungall, K. L.; Sadeghi, S.; Pedamallu, C. S.; Lu, Y.; Klimczak, L. J.; Zhang, J.; Choo, C.; Ojesina, A. I.; Bullman, S.; Leraas, K. M.; Lichtenberg, T. M.; Wu, C. J.; Schultz, N.; Getz, G.; Meyerson, M.; Mills, G. B.; McConkey, D. J.; TCGA Research Network; Weinstein, J. N.; Kwiatkowski, D. J.; Lerner, S. P., (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171 (3), S. 540-556.
- Rodríguez-Paredes, M.; Esteller, M., (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*, 17 (3), S. 330–339.
- Rübben, Uroonkologie, 6. Auflage, 2014
- S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Leitlinienprogramm Onkologie, Version 3.0 - März 2025, AWMF-Registernummer: 032-038OL
- Schulz, W. A.; Koutsogiannouli, E. A.; Niegisch, G.; Hoffmann, M. J., (2015). Epigenetics of Urothelial Carcinoma. *Cancer Epigenetics*, 2 (10), S. 183–216.
- Seto, E.; Yoshida, M., (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6 (4).
- Shapiro, G., (2006). Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 24 (11), S1770-1783.
- Shore, S. M.; Byers, S. A.; Maury, W.; Price, D. H., (2003). Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene*, 307, S. 175–182.
- Sikandar, S.; Dizon, D.; Shen, X.; Li, Z.; Besterman, J.; Lipkin, S. M., (2010). The class I HDAC inhibitor Mgcd0103 induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer initiating cells by upregulating Dickkopf-1 and non-canonical Wnt signaling. *Oncotarget*, 1 (7), S. 617–629.
- Slingerland, M.; Guchelaar, H.-J.; Gelderblom, H., (2014): Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anti-cancer drugs*, 25 (2), S. 140–149.
- St Pierre, R.; Kadoch, C., (2017). Mammalian SWI/SNF complexes in cancer: emerging therapeutic opportunities. *Current opinion in genetics & development*, 42, S. 56–67.
- Steube K. G.; Meyer C.; Drexler, H. G., (1998). Secretion of functional hematopoietic growth factors by human carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 78 (1), S. 120-124.
- Thieme, E.; Bruss, N.; Sun, D.; Dominguez, E. C.; Coleman, D.; Liu, T.; Roleder, C.; Martinez,

- M.; Garcia-Mansfield, K.; Ball, B.; Pirrotte, P.; Wang, L.; Xia, Z.; Danilov, A. V., (2023). CDK9 inhibition induces epigenetic reprogramming revealing strategies to circumvent resistance in lymphoma. *Molecular cancer*, 22 (1), S. 64-81.
- Tzeng, C. C.; Liu, H. S.; Li, C.; Jin, Y. T.; Chen, R. M.; Yang, W. H.; Lin, J. S., (1996). Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Research*, 16 (4A), S. 1797-1804.
- Wang, G.; Fu, Y.; Yang, X.; Luo, X.; Wang, J.; Gong, J.; Hu, J., (2016). Brg-1 targeting of novel miR550a-5p/RNF43/Wnt signaling axis regulates colorectal cancer metastasis. *Oncogene*, 35 (5), S. 651–661.
- Wang, S.; Fairall, L.; Khoa Pham, T.; Ragan, T. J.; Vashi, D.; Collins, M. O.; Dominguez, C.; Schwabe, J. W. R. (2023). A potential histone-chaperone activity for the MIER1 histone deacetylase complex. *Nucleic Acids Research*, 51 (12), S. 6006–6019.
- Wang, Z., (2022). Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Cell-Cycle Synchronization*, 1 (1), S. 3-24.
- Washington, K.; Ammosova, T.; Beullens, M.; Jerebtsova, M.; Kumar, A.; Bollen, M.; Nekhai, S., (2002). Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II. *The Journal of biological chemistry*, 277 (43), S. 40442–40448.
- Williams R.D. (1980) Human urologic cancer cell lines. *Investigative Urology* 17(5): 359-363.
- Witjes, J. A.; Bruins, H. M; Carrión, A.; Cathomas, R.; Compérat, E. M.; Efstathiou, J. A., Fietkau, R.; Gakis, G.; van der Heijden, A. G.; Lorch, A.; Mariappan, P.; Meijer, R. P.; Milowsky, M. I.; Neuzillet, Y.; Panebianco, V.; Rink, M.; Rouanne, M.; Thalmann G. N.; Patient Advocates: Redlef, J.; Sæbjørnsen, S.; Guidelines Associates: Kailavasan, M.; Martini, A.; Mertens, L.S.; Guidelines Office: Smith, E-J.; Ali, H.; European Association of Urology 2024 - EAU Guidelines on Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer
- Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T., (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (28), S. 17174–17179.
- Yoshida, M.; Kudo, N.; Kosono, S.; Ito, A., (2017). Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93 (5), S. 297–321.
- Zhang, H.; Pandey, S; Travers, M.; Jelinek, J.; Grana, X.; Issa, J.-P. J., (2018). Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell*, 175 (5), S. 1244-1258.
- Zhang, M.-M.; Xia, Y.; Tan, Y.-Y.; Xie, Z.-B.; Li, J.-J., (2024). Expression of CDK9 in Newly Diagnosed Patients with Acute Myeloid Leukemia and its Clinical Significance. *Clinical laboratory*, 70 (10).
- Zhang, H.; Huang, C.; Gordon, J.; Yu, S.; Morton, G.; Childers, W.; Abou-Gharbia, M.; Zhang, Y.; Jelinek, J.; Issa, J.-P. J., (2024). MC180295 is a highly potent and selective CDK9 inhibitor with preclinical in vitro and in vivo efficacy in cancer. *Clinical Epigenetics*, 16 (1), S. 3-17.

Zhu, Y.; Pe'ery, T.; Peng, J.; Ramanathan, Y.; Marshall, N.; Marshall, T.; Amendt, B.; Mathews, M. B.; Price, D. H., (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes & Development*, 11, S. 2622-2632.

9 Anhang

Tab. 18: Auflistung der Gene, die durch die CDK9-Inhibition beeinflusst wurden.

Hier werden die Gene aufgelistet, die in der jeweiligen UCC sowohl nach Behandlung mit MC 180295 als auch LDC 000067, hoch- bzw. herunterreguliert wurden.

VM-CUB-1 47 Herunterregulierte Gene	VM-CUB-1 27 Hochregulierte Gene	UM-UC-3 106 Herunterregulierte Gene	UM-UC-3 14 Hochregulierte Gene
- <i>RP11-468E2.2</i>	- <i>LPCAT1</i>	- <i>KRT6A</i>	- <i>FAM81A</i>
- <i>PKNOX2</i>	- <i>ENC1</i>	- <i>H19</i>	- <i>DHX37</i>
- <i>OASL</i>	- <i>THBS1</i>	- <i>GDF15</i>	- <i>EFNB2</i>
- <i>PADI3</i>	- <i>S100A3</i>	- <i>TINAGL1</i>	- <i>RP11-359B12.2</i>
- <i>IFITM1</i>	- <i>KRT5</i>	- <i>NUPR1</i>	- <i>G0S2</i>
- <i>INHBE</i>	- <i>ARL4C</i>	- <i>ALDH3A1</i>	- <i>SFXN2</i>
- <i>IFIT2</i>	- <i>CA2</i>	- <i>KRT19</i>	- <i>ZNF587B</i>
- <i>IFIT3</i>	- <i>MAOB</i>	- <i>JUP</i>	- <i>CEND1</i>
- <i>GDF15</i>	- <i>PINK1-AS</i>	- <i>SPINT2</i>	- <i>ANGPTL4</i>
- <i>HERC5</i>	- <i>KLF6</i>	- <i>CITED4</i>	- <i>DKK1</i>
- <i>HCAR2</i>	- <i>BARX2</i>	- <i>SYT12</i>	- <i>ACTA2</i>
- <i>HAL</i>	- <i>DUSP4</i>	- <i>ABCG4</i>	- <i>ADAMTS1</i>
- <i>LRG1</i>	- <i>RHOB</i>	- <i>SIGIRR</i>	- <i>RP11-66N24.3</i>
- <i>HCAR3</i>	- <i>CXCL8</i>	- <i>CRLF2</i>	- <i>ARL2-SNX15</i>
- <i>GBP2</i>	- <i>FOSL1</i>	- <i>ZNF467</i>	-
- <i>TET1</i>	- <i>FAM83C</i>	- <i>MMP9</i>	
- <i>WFDC2</i>	- <i>TNC</i>	- <i>DLG3</i>	
- <i>IFIT1</i>	- <i>CXCL1</i>	- <i>C11orf86</i>	
- <i>GBP4</i>	- <i>ZNF296</i>	- <i>DTWD2</i>	
- <i>CIR</i>	- <i>KRT6A</i>	- <i>KRT7</i>	
- <i>CFB</i>	- <i>XXbac-</i>	- <i>RAB4B</i>	
- <i>PPFIA4</i>	<i>BPG32J3.22</i>	- <i>TMEM173</i>	
- <i>PBXIP1</i>	- <i>KRT14</i>	- <i>IL1RAP</i>	
- <i>KIF21B</i>	- <i>RP11-47I22.2</i>	- <i>ARHGAP18</i>	
- <i>APOBEC3G</i>	- <i>HIST1H2AC</i>	- <i>IFITM2</i>	
- <i>DTX4</i>	- <i>HIST1H2BG</i>	- <i>CBLB</i>	
- <i>HCAR1</i>	- <i>SDHAP2</i>	- <i>OSTF1</i>	
- <i>PGPEP1</i>	- <i>TRIM6-TRIM34</i>	- <i>ABTB1</i>	
- <i>PTPRJ</i>		- <i>PPM1E</i>	
- <i>MUC1</i>		- <i>KRT15</i>	

- <i>GSTM4</i>		- <i>KLHL24</i>	
- <i>CCDC80</i>		- <i>HDAC5</i>	
- <i>SLCO4C1</i>		- <i>HMGN5</i>	
- <i>PNRC1</i>		- <i>GATSL3</i>	
- <i>MTHFR</i>		- <i>KDM7A</i>	
- <i>HLA-DQB1</i>		- <i>ARHGAP26</i>	
- <i>LAPTM5</i>		- <i>UBE2D4</i>	
- <i>CITED2</i>		- <i>ZNF25</i>	
- <i>DDX58</i>		- <i>TLE6</i>	
- <i>FCGRT</i>		- <i>PSORS1C1</i>	
- <i>CALCOCO1</i>		- <i>FYN</i>	
- <i>GSN</i>		- <i>KRT80</i>	
- <i>C3</i>		- <i>SLC4A8</i>	
- <i>AKR1C3</i>		- <i>CA11</i>	
- <i>EPHX1</i>		- <i>PNPLA8</i>	
- <i>LINC01419</i>		- <i>C15orf59</i>	
- <i>ABCC3</i>		- <i>GSN</i>	
		- <i>RAPGEF3</i>	
		- <i>FBXO32</i>	
		- <i>PLEKHA5</i>	
		- <i>PRAME</i>	
		- <i>CHRNA1</i>	
		- <i>CACNG8</i>	
		- <i>SEMA6C</i>	
		- <i>LRRC15</i>	
		- <i>ADD3</i>	
		- <i>GRAMD1C</i>	
		- <i>SLC8B1</i>	
		- <i>ZDHHC11</i>	
		- <i>IGF2</i>	
		- <i>ZCCHC24</i>	
		- <i>VASH1</i>	
		- <i>MXI1</i>	
		- <i>IGSF8</i>	
		- <i>EMX2OS</i>	
		- <i>MFGE8</i>	
		- <i>CTD-</i>	
		<i>2020K17.1</i>	
		- <i>CD27-AS1</i>	
		- <i>TSPYL2</i>	

		- <i>PBXIP1</i> - <i>ARHGDIB</i> - <i>LINC01270</i> - <i>CACNA1G</i> - <i>TMEM8B</i> - <i>IFIT3</i> - <i>TNS2</i> - <i>GALNT9</i> - <i>FOXO6</i> - <i>CRIP2</i> - <i>COL13A1</i> - <i>BDKRB2</i> - <i>DAAMI</i> - <i>HES1</i> - <i>LTB4R</i> - <i>ACACB</i> - <i>AGAP2</i> - <i>FAM102B</i> - <i>PINK1</i> - <i>KIFAP3</i> - <i>POLR3GL</i> - <i>CHMP1B2P</i> - <i>MBNL2</i> - <i>CASD1</i> - <i>PGPEP1</i> - <i>SLC43A2</i> - <i>YPEL5</i> - <i>ABCA7</i> - <i>UNC5B</i> - <i>RIMS3</i> - <i>DOCK6</i> - <i>ATP1A3</i> - <i>NIPAL3</i> - <i>DNAH14</i> - <i>CCDC112</i> - <i>HIST1H1C</i> - <i>BCAM</i>	
--	--	--	--

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Niegisch für die Unterstützung und Begleitung während meiner Promotionszeit bedanken. Auch für die bereitgestellte Zeit, die konstruktiven Ratschläge und die fachliche Expertise, die mir dadurch zur Verfügung stand, bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. Michèle Hoffmann-Massier, meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Sie hat mich während der Monate meiner Laborzeit begleitet und mich stets mit viel Engagement geleitet. Ihr offenes Ohr, ihre freundliche und herzliche Art sowie die vielen gemeinsamen, auch lustigen Erlebnisse haben diese Zeit für mich besonders gemacht. Sie hat mich unterstützt neue Perspektiven zu gewinnen und an Herausforderungen zu wachsen, was meine persönliche Entwicklung geprägt hat. Ich bedanke mich herzlich für die wundervolle Unterstützung, sowohl während der Laborzeit als auch darüber hinaus, für die wiederholten Videobesprechungen und die Erinnerungen an Abgabetermine und Fortschrittsberichte.

Zusätzlich möchte ich meinem Co-Betreuer Prof. Dr. Matthias Kassack für seine Unterstützung und seine fachliche Beratung danken. Ein besonderer Dank gilt auch Christiane Harder für ihre großartige Einarbeitung im Labor, was mir den Einstieg sehr erleichtert hat, aber auch für ihre Zeit und Geduld, wenn es mal zu Schwierigkeiten bei der Durchführung von Experimenten kam.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, die stets an meiner Seite standen – in den Höhen wie in den Tiefen. Sie haben mich unermüdlich motiviert und durch kleine, liebevolle Gesten in den stressigsten Situationen sowohl während meines Studiums als auch während der Promotionszeit gezeigt, wie sehr sie an mich glauben. Unter anderem auch als wenige Tage vor der Abgabe mein Laptop in Italien kaputt ging. Ihre Unterstützung hat mir Kraft geschenkt, wenn ich sie am dringendsten brauchte, und ihre Liebe hat mich immer wieder getragen. Ein besonderer Dank gebührt meinem Bruder, der mir während des Studiums und der Promotion den Rücken freigehalten hat. Er hat in vielen Gesprächen meinen Frust ertragen und mir Aufgaben abgenommen, wenn ich mal keine Zeit zum Kirschpflücken oder für mein Ehrenamt im Sportverein hatte. Seine Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert. An dieser Stelle

möchte ich auch meine Großeltern für die motivierenden Gespräche und die kleinen Gesten, wie köstliches Essen, Kuchen oder Pudding, danken.

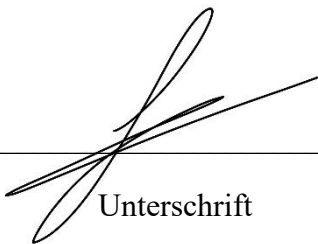
Mein herzlicher Dank gilt all den wunderbaren Menschen, die mich während meines Studiums begleitet und unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei Anna und Franzi bedanken, die seit Tag 1 an meiner Seite sind. Gemeinsam haben wir so viel erlebt, wir haben gelernt, gefeiert, gelacht und auch geweint. Ein besonderer Dank gilt auch Susi und Anne, die ich während meines Studiums kennengelernt habe. Die gemeinsamen Unternehmungen, die Gespräche, die Unterstützung in allen Lebenslagen und die unvergesslichen Urlaube haben mein Leben bereichert. Ich bin sehr glücklich, dass sich unsere Wege gekreuzt haben und das wir uns trotz weiter Entfernung nie aus den Augen verloren haben. Ein großes Dankeschön gilt Julia und Laura, deren Freundschaft mich seit der Schulzeit begleitet und darüber hinaus immer ein verlässlicher Anker in meinem Leben gewesen ist. Eure aufbauenden Gespräche, egal zu welcher Tages- und Nachtzeit, haben mir in vielen Momenten des Studiums und der Promotion Kraft und Zuversicht geschenkt. Ich schätze eure stets motivierende und liebevoll Art, mit der ihr mich aufgefangen habt, wenn der Weg mal steinig wurde. Eure Freundschaft bedeutet mir sehr viel und ich bin allen unendlich dankbar, euch an meiner Seite zu wissen. Zudem möchte ich David danken, dessen lustige und motivierende Memes mir gerade in den stressigsten Phasen des Schreibens genau die Auszeit schenkten, die ich dringend brauchte.

Abschließend möchte ich allen Mitgliedern des urologischen Forschungslabors für die schöne und bereichernde Zeit im Labor danken. Ein großer Dank geht an Alexandra, Amp, Anna P., Anna, Camilla, Elvira, Hanna, Kathrin, Margaretha, Marieke, Meike, Melanie und Merve, die mir immer mit einem guten Rat und motivierenden Worten zur Seite gestanden haben. Ich danke euch für die schönen gemeinsamen Momente, die Waffeltage und die lustigen Unternehmungen außerhalb des Labors.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lisa Grote, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Essen, der 30.06.2025



Unterschrift