Aus der Klinik für Urologie

der Heinrich-Heine-Universität

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Neue Strategien zur Überwindung von Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Isabelle Renate Schrimpf

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zusammenfassung (deutsch)

Das muskelinvasive Urothelkarzinom (MIUC) zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen. Durch Resistenzen gegenüber Standardtherapien haben die Patienten häufig eine schlechte Prognose, sodass die Identifizierung neuer Strategien zur Umgehung dieser Resistenzen von großer Bedeutung ist.

In Vorarbeiten der Gruppe waren über Proteomanalysen von Cisplatin-resistenten Zelllinien (LTTs) im Vergleich zu ihren Parentallinien Proteine identifiziert worden, die in LTTs stärker abundant waren und entsprechend mit der Resistenz assoziiert sein könnten. Die Relevanz solcher Faktoren für die Prognose von Cisplatin-behandelten Patienten wurde durch Analyse von Patientengewebe validiert. Über *siRNA Knockdown* war bereits eine unmittelbare Relevanz für die Cisplatinantwort gezeigt worden. In dieser Arbeit sollten solche Faktoren, die pharmakologisch targetierbar waren, an Cisplatin-resistenten Zelllinienmodellen (LTTs) untersucht werden. In diesen zeigten sich erhöhte Proteinlevel von NAMPT, GSR und TOP2A im Vergleich zu ihren Parentallinien. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte spezifischer Inhibitoren (Daporinad für NAMPT, 2-AAPA für GSR, Doxorubicin für TOP2A) allein und in Kombination mit Cisplatin auf resistente Zelllinien. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression bestimmt, anschließend die zellspezifischen IC_{50}-Werte durch MTT-Assays ermittelt. Kombinationstests erfolgten nach simultaner Gabe sowie nach Vorbehandlung mit den Inhibitoren und anschließender Cisplatin Gabe.

Daporinad und Doxorubicin zeigten in der Monotherapie eine stärkere Reduktion der Zellviabilität in LTTs als in naiven Zellen, während 2-AAPA höhere Dosierungen erforderte und somit stärker toxisch auf benigne Zellen wirkte. Simultane Kombinationen von Cisplatin mit Daporinad oder Doxorubicin führten zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Zellviabilität und zu erhöhter Caspase-Aktivität im Vergleich zu Einzelbehandlungen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NAMPT, GSR und TOP2A eine zentrale Rolle in der Cisplatinresistenz des Urothelkarzinoms spielen und dass insbesondere die simultane Kombination von Cisplatin mit NAMPT- oder TOP2A-Inhibition eine vielversprechende Strategie zur Überwindung dieser Resistenz darstellt.

Zusammenfassung (englisch)

Muscle-invasive urothelial carcinoma (MIUC) is one of the most common malignant tumours worldwide. Due to resistance to standard therapies, patients often have a poor prognosis, making the identification of new strategies to overcome this resistance of great importance.

In previous work by the group, proteomic analyses of cisplatin-resistant cell lines (LTTs) compared to their parent lines had identified proteins that were more abundant in LTTs and could therefore be associated with resistance. The relevance of such factors for the prognosis of cisplatin-treated patients was validated by analysing patient tissues. An immediate relevance to the cisplatin response had already been demonstrated via *siRNA knockdown*. In this study, factors that were pharmacologically targetable were to be investigated in cisplatin-resistant cell line models (LTTs). In these, elevated protein levels of NAMPT, GSR and TOP2A were observed compared to their parent lines. The aim of this study was to investigate the effects of specific inhibitors (daporinad for NAMPT, 2-AAPA for GSR, doxorubicin for TOP2A) alone and in combination with cisplatin on resistant cell lines. Protein expression was determined by western blot, followed by the determination of cell-specific IC_{50} values using MTT assays. Combination tests were carried out following simultaneous administration, as well as following pretreatment with the inhibitors followed by cisplatin administration.

In monotherapy, daporinad and doxorubicin showed a greater reduction in cell viability in LTTs than in naive cells, whereas 2-AAPA required higher doses and was therefore more toxic to benign cells. Simultaneous combinations of cisplatin with daporinad or doxorubicin led to a significantly greater inhibition of cell viability and increased caspase activity compared with single treatments.

These results suggest that NAMPT, GSR and TOP2A play a central role in cisplatin resistance in urothelial carcinoma and that, in particular, the simultaneous combination of cisplatin with NAMPT or TOP2A inhibition represents a promising strategy for overcoming this resistance.

Abkürzungsverzeichnis

ADC ..... *Antibody Drug Conjugates*
APS ..... *Ammoniumpersulfat*
ATP ..... *Adenosintriphosphat*
BCA ..... *Bicinchoninsäure*
BCG ..... *Bacillus-Calmette-Guérin*
Bcl-2 ..... *B-cell Lymphoma 2*
BSA ..... *Bovines Serumalbumin*
c ..... *clinical*
CD ..... *Cluster of Differentiation Antigene*
CI ..... *Combination Index*
cm^2 ..... *Quadratzentimeter*
Ctr1 ..... *Kupfertransporter 1*
DMEM ..... *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO ..... *Dimethylsulfoxid*
DNA ..... *Desoxyribonukleinsäure*
DPBS ..... *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
EDTA ..... *Ethylendiamintetraessigsäure*
EGFR ..... *Epidermal Growth Factor Rezeptor*
EMT ..... *Epitheliale-Mesenchymale-Transformation*
ERCC1 ..... *Excision Repair Cross-Complementation group 1*
EV ..... *Enfortumab Vedotin*
Fa ..... *Fraction affected*
FCS ..... *Fetales Kälberserum*
G ..... *Grading*
g/mol ..... *Gramm pro Mol*
GC ..... *Gemcitabin/Cisplatin*
GSH ..... *Glutathion*
GSR ..... *Glutathionreduktase*
h ..... *Stunden*
HBF ..... *Humane Fibroblasten der Harnblase*
Her-3 ..... *Human Epidermal Growth Factor Rezeptor-3*
Hsp ..... *Heat-Shock-Protein*
IC_{25} ..... *viertelletale Dosis*
IC_{50} ..... *halbletale Dosis*
IGF-1 ..... *Insulin-like Growth Factor-1*

IL ..... *Interleukin*
kDa ..... *Kilodalton*
LTTs ..... *Long-Term Treated Urothelkarzinomzellen*
M ..... *Fernmetastasen*
MAPK ..... *Mitogen-aktivierte Proteinkinase*
MDR1 ..... *Multi-Drug-Resistance Protein 1*
Mg^{2+} ..... *Magnesium*
min ..... *Minuten*
MIUC ..... *Muskelinvasives Urothelkarzinom*
mL ..... *Milliliter*
mM ..... *Millimolar*
MMR ..... *Mismatch-Reparatur Proteine*
mRNA ..... *Messenger Ribonukleinsäure*
mTOR ..... *Mammalian Target of Rapamycin*
MTT ..... *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test*
MVAC ..... *Methotrexat/Vinblastin/Doxorubicin/Cisplatin*
N ..... *Stickstoff*
NaCl ..... *Natriumchlorid*
NAD ..... *Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid*
NAM ..... *Nikotinamid*
NAMPT ..... *Nikotinamidphosphoribosyltransferase*
NAPRT ..... *Nicotinat-Phosphoribosyltransferase*
NER ..... *Nukleotid-Exzisionsreparatur*
nm ..... *Nanometer*
nM ..... *Nanomolar*
NMN ..... *Nikotinamid-Mononukleotid*
O_2 ..... *Sauerstoff*
PBS ..... *Phosphate-buffered Saline*
PD1-Inhibitor ..... *Programmed Cell Death 1-Inhibitor*
PD-L1 ..... *Programmed Cell Death-Ligand 1*
PVDF ..... *Polyvinylidene Difluoride Membran*
RC ..... *radikale Zystektomie*
Ripa Puffer ..... *Radioimmunoprecipitation Assay Puffer*
ROS ..... *Reaktive Sauerstoffspezies*
SCLC ..... *kleinzelliges Lungenkarzinom*
SDS ..... *Sodium Dodecyl Sulfat*
SG ..... *Sacituzumab govitecan*

siRNA.....*Small interfering Ribonukleinacid*
T .....*Tumorstadium*
TBS-T.....*Tris-buffered saline with Tween 20*
Temed.....*Tetramethylethylendiamin*
Tis.....*Tumor in situ*
TNFalpha .....*Tumornekrosefaktor alpha*
TOP2A .....*Topoisomerase 2 alpha*
Tris .....*Tris(hydroxymethyl)aminomethan*
TROP2 .....*Trophoblast cell-surface antigen 2*
TURB.....*transurethrale Tumorresektion*
UC .....*Urothelkarzinom*
UCC .....*Urothelkarzinom Zellen*
V .....*Volt*
µg .....*Mikrogramm*
µg/µL .....*Mikrogramm pro Mikroliter*
µL.....*Mikroliter*
µm .....*Mikrometer*
µM.....*Mikromolar*

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH) I

ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH) II

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

INHALTSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1. DAS UROTHELKARZINOM UND DIE THERAPIE 1

1.1.1. Immuncheckpoint-Inhibitoren 2

1.1.2. Antibody Drug Conjugates 3

1.2. FUNKTIONSWEISE VON CISPLATIN 3

1.3. MECHANISMEN DER CISPLATINRESISTENZ 4

1.4. MÖGLICHE ANGRIFFSPUNKTE ZUR UMGEHUNG DER CISPLATINRESISTENZ 7

1.5. FUNKTION DER ZIELPROTEINE UND IHRE RELEVANZ IN DER TUMORPATHOGENESE 8

1.5.1. NAMPT 8

1.5.2. GSR 9

1.5.3. TOP2A 9

1.6. MÖGLICHKEITEN ZUR UMGEHUNG DER CISPLATINRESISTENZ DURCH KOMBINATIONSTHERAPIE 10

1.7. MÖGLICHKEIT EINER CISPLATINFREIEN THERAPIEOPTION DURCH *HEAT-SHOCK-PROTEIN*-INHIBITOREN 10

1.8. FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT 11

2. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1. MATERIAL 12

2.1.1. Zelllinien 12

2.1.2. Antikörper 13

2.1.3. Verwendete Wirkstoffe 14

2.1.4. Medien und Puffer 14

2.1.5. Geräte und Software 17

2.1.6. Verbrauchsmaterialien 18

2.2. METHODEN 19

2.2.1. Kultivierung und Passagieren der Urothelkarzinomzellen 19

2.2.2. Zellzahlbestimmung 19

2.2.3. MTT-Test zur Analyse der Zellviabilität 20

2.2.6. Proteinanalyse ... *24*
2.2.7. Statistik ... *26*

3. ERGEBNISSE ... **27**

3.1. ABUNDANZ DER ZIELPROTEINE IN ZELLLINIEN ... 27
3.2. VIABILITÄTSMESSUNG DER ZELLEN UNTER INHIBITORISCHER BEHANDLUNG DER ZIELPROTEINE MITTELS MTT ... 28
3.2.1. MTT-Monotherapie ... *28*
3.2.3. Kombinationsversuche von Inhibitoren mit Cisplatin ... *42*
3.3. DIE SIMULTANE KOMBINATIONSBEHANDLUNG BEWIRKTE STÄRKERE APOPTOSEINDUKTION 57
3.4. GANETESPIB – EIN HSP90 INHIBITOR ALS NEUER THERAPIEANSATZ IN DER CISPLATIN-RESISTENTEN SITUATION? ... 67
3.4.1. Sensitivitätsvergleich von parentalen und LTT Zelllinien gegenüber Ganetespib ... *67*
3.4.2. Kombination von Ganetespib und Doxorubicin als Cisplatinersatz? ... *68*
EXKURS: SIND ZUGELASSENE ANTIBODY DRUG CONJUGATES EINE THERAPEUTISCHE OPTION FÜR CISPLATIN-RESISTENTE UROTHELKARZINOMZELLEN ... 71

4. DISKUSSION ... **73**

4.1. IST DIE ALLEINIGE INHIBITION DER ERMITTELTEN ZIELPROTEINE EIN SINNVOLLER ANSATZ FÜR DIE BEHANDLUNG DES CISPLATIN-RESISTENTEN MIUC? ... 73
4.2. SIND KOMBINATIONSBEHANDLUNGEN MIT INHIBITOR UND CISPLATIN EINE LÖSUNG FÜR DAS RESISTENZPROBLEM? ... 75
4.3. GIBT ES NEUE THERAPIEANSÄTZE, UM CISPLATIN-RESISTENTE UC-ZELLEN EFFIZIENT ZU BEHANDELN? ... 81
4.4. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK ... 83
4.5. EXKURS: BIETEN *ANTIBODY DRUG CONJUGATES* EINEN AUSWEG AUS DER PLATINHALTIGEN ERSTLINIENTHERAPIE ... 84

LITERATURVERZEICHNIS ... **86**

1. Einleitung

1.1. Das Urothelkarzinom und die Therapie

Das Urothelkarzinom (UC) ist ein maligner Tumor der Harnblase und gehört zu den zehnthäufigsten Tumorerkrankungen weltweit (Lobo et al., 2022). Hierbei sind vor allem Männer häufiger betroffen als Frauen. Es handelt sich beim Urothelkarzinom eher um eine Erkrankung des höheren Alters (Dobruch et al., 2016), ((AWMF), 2025). Zu den typischen Risikofaktoren, die zur Entstehung eines Urothelkarzinoms beitragen, zählen: Nikotinkonsum, chemische Verbindungen, wie zum Beispiel aromatische Amine, chronische Harnblasenentzündungen und manche Berufe. Besonders risikobehaftet schienen hierbei Berufe in der Chemieindustrie zu sein (Sorahan, 2008).

Unterschieden werden kann das Urothelkarzinom in lokale, nicht-muskelinvasive Tumore (Tis und T1), sowie muskelinvasive Tumore (≥ T2, MIUC). Mittels Differenzierungsgrad kann man die Tumore noch in *Low-Grade* Karzinome (gut differenzierte G1- Tumore) und *High-Grade* Karzinome (mäßig, bis schlecht/undifferenzierte G2/G3-Tumore) unterteilen. Die histologische Klassifikation der Urothelkarzinome ist maßgeblich für die Therapieentscheidung und den Therapieerfolg (Lenis et al., 2020). In etwa 75% aller Fälle handelt es sich bei Erstdiagnose um ein nicht-invasives Urothelkarzinom ((AWMF), 2025). Nicht-invasive, lokal begrenzte Urothelkarzinome werden leitliniengemäß mittels einer transurethralen Tumorresektion (TURB) entfernt. Anschließend kommt es zu einer weiteren adjuvanten Therapie. Je nach Risikoabwägung des einzelnen Patienten wird die Therapie entschieden. Niedrig-Risiko Patienten erhalten anschließend eine Instillation mittels Zytostatikum. Hierfür stehen Mitomycin C oder Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) zur Verfügung. Bei BCG handelt es sich um die bovine apathogene Form des *Mycobacterium bovis*. Mittel- oder hoch-Risiko Patienten ist nach TURB eine mindestens einjährige Instillation mit BCG empfohlen. Bei Patienten mit sehr hohem Risiko sollte eine radikale Zystektomie erwogen werden (Babjuk et al., 2022). Patienten, welche mit einem lokal begrenzten Urothelkarzinom vorstellig werden, weisen eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 75% auf. Bei Vorliegen eines invasiven Urothelkarzinoms (≥ T2) sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate pro Gewebeinvasion um 25% ab. Zudem steigt pro Stadium die Lymphknoten- und Fernmetastasierungsrate stetig an (Patel et al., 2020). Aus diesem Grund ist die Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms weitaus umfangreicher. Die Therapie startet initial mit einer radikalen Zystektomie (RC) und einer zusätzlichen vollständigen pelvinen Lymphknotenentfernung (unter Beachtung des chronologischen und biologischen Alters, sowie weiterer Risikofaktoren). Alternativ kann bei lokal begrenzten Tumoren (cT0, cTxM0) eine primär organerhaltene Therapie mittels TURB und adjuvanter Chemo angeboten werden ((AWMF), 2025). Anschließend wird bei geeigneten Patienten eine adjuvante Cisplatin-haltige Kombinations-Chemotherapie, in der Regel mit Gemcitabin (GC), angeschlossen. Alternativ kann diese Therapie

auch neo-adjuvant durchgeführt werden, welche das 5-Jahres-Überleben um ca. 5% steigert. Nach neo-adjuvanter Therapie soll keine adjuvante Chemotherapie mehr durchgeführt werden ((AWMF), 2025). Alternativ zur neo-adjuvanten Cisplatin-haltigen Therapie steht das Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin/Adriamycin und Cisplatin (MVAC) – Schema zur Verfügung. Das MVAC-Schema wurde vor Einführung der GC-Therapie erstliniengemäß als adjuvante Therapie nach RC genutzt. GC stellte sich allerdings als deutlich nebenwirkungsärmer dar als das MVAC-Schema. Ausgelöst wurden hierbei zum Beispiel starke Myelosuppression und Mukositis. Die MVAC-Therapie stellt trotzdem in manchen Fällen eine weitere Therapieoption dar (Patel et al., 2020), ((AWMF), 2025).
Es zeigte sich also, dass beim MIUC eine Cisplatin-haltige Therapie weiterhin leitliniengemäß als Erstlinientherapie zusätzlich zur RC empfohlen wird (Patel et al., 2020), ((AWMF), 2025).

1.1.1. Immuncheckpoint-Inhibitoren

Trotz leitliniengemäßer Behandlung bei MIUCs mittels einer Cisplatin-haltigen Chemotherapie bleiben bei manchen Patienten weiterhin Residuen vorhanden, oder es kommt zu Rezidiven. Weiterhin handelt es sich bei einer Vielzahl der zu therapierenden Patienten um ältere, multimorbide Patienten (Lenis et al., 2020), welche durch die Toxizität nicht gut mit Cisplatin therapierbar wären (Patel et al., 2020). Für diese Patientengruppen bot sich mit Zulassung von Immuncheckpoint-Inhibitoren als Erst- und Zweitlinientherapie bei MIUCs und metastasierten UCs eine neue Therapieoption. In Deutschland ist hierfür der PD1-Inhibitor Nivolumab zur adjuvanten Therapie bei nicht metastasierten MIUCs zugelassen ((AWMF), 2025). Voraussetzung dafür sind die oben genannten Patientengruppen, sowie ein genetisch nachgewiesener positiver PD-L1-Status (Lewerich et al., 2023). Patienten mit metastasiertem UC, welche nicht Cisplatin-geeignet sind, können bei positivem PD-L1 Status mit Atezolizumab (PD-L1 Inhibitor) oder Pembrolizumab (PD1 Inhibitor) therapiert werden ((AWMF), 2025).
Bei Versagen der Erstlinientherapie mit Cisplatin-haltiger Chemotherapie sollten alle Patienten mit metastasiertem UC eine Zweittherapie mit Pembrolizumab (Konsenslevel A) oder Nivolumab/Atezolizumab (Konsenslevel 0) erhalten ((AWMF), 2025).
Die Funktionsweise der Immuncheckpoint-Inhibitoren läuft folgendermaßen ab: Tumorzellen sind in der Lage über einen exprimierten Liganden (PD-L1) an den zugehörigen PD1-Rezeptor einer zytotoxischen T-Zelle zu binden. Über diese Bindung wird eine inhibitorische Signalkaskade in der T-Zelle ausgelöst, welche dafür sorgt, dass eine T-Zell-Antwort und somit die Erkennung der Tumorzelle als körperfremd unterdrückt wird. Nivolumab als Immuncheckpoint-Inhibitor ist ein monoklonaler Antikörper, welcher PD1 der Zelle bindet und so dafür sorgt, dass die Tumorzelle kein Signal an die T-Zelle weiterleiten kann. Somit kann durch die T-Zelle eine zytotoxische Reaktion gegen die Tumorzelle erfolgen, welche die Einleitung des Zelltods auslöst (Shiravand et al., 2022). Folglich funktioniert eine Therapie nur bei einem positivem PD-L1 Status der Tumorzellen.

1.1.2. Antibody Drug Conjugates

In den 2000ern wurden erstmals *Antibody Drug Conjugates* (ADC) eingeführt. ADCs sind monoklonale Antikörper, welche an spezifische Epitope der Tumoroberfläche binden können. Diese Antikörper sind über Linker an zytotoxische Medikamente gekoppelt, welche durch die Bindung am Epitop in die Zelle aufgenommen werden und das Medikament über lysosomale Abbauprozesse freisetzen. Bei den zytotoxischen Medikamenten handelt es sich entweder um Substanzen, welche direkte DNA-Schäden hervorrufen können, wie zum Beispiel Topoisomerase-1-Inhibitoren, oder um Substanzen, welche den Mikrotubuliaufbau stören, wie Monomethyl-Auristatin. In beiden Fällen führt es zum Zelltod der Tumorzelle (Hafeez et al., 2020). Anwendung finden ADCs bereits in vielen Tumortherapien, wie bei Leukämien und Lymphomen, seit kurzem aber auch bei soliden Tumoren wie dem Urothelkarzinom (Riccardi et al., 2023).

Urothelkarzinom-Zellen weisen eine Vielzahl von stark exprimierten Molekülen an der Oberfläche auf. Dazu zählen: Nectin-4, TROP2 und Her-3, sowie CD25 und CD205 (Hafeez et al., 2020), (Patel et al., 2020). Seit 2022 ist Enfortumab Vedotin (EV) für bereits vortherapierte Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierten und therapierefraktären Urothelkarzinom zugelassen. EV bindet Nectin-4 an der Tumoroberfläche und stört nach Endozytose in die Zelle den Mikrotubuliaufbau. Es zeigte sich zudem in Studien, dass obwohl eine TROP2 Expression mit einer vermehrt auftretenden Nectin-4 mRNA (*Messenger* Ribonukleinsäure) auftreten kann, EV resistente Urothelkarzinom-Zellen weiterhin sensitiv auf Sacituzumab govitecan (SG), ein TROP2 bindendes ADC, reagierten (Chou et al., 2022). SG ist konjugiert mit dem Topoisomerase-1-Inhibitor SN-38. SG zählt deshalb in den USA auch als zugelassene Therapieoption bei therapierefraktären MIUC-Patienten (Chou et al., 2022).

Nach aktuellen Leitlinien *der European Association of Urology* und *European Society for Medical Oncology* steht alternativ zur reinen Zytostatika- oder Immuncheckpointinhibitor Erstlinientherapie, die Kombination aus EV und Pembrolizumab zur Verfügung. Dies gilt sowohl für Cisplatin-geeignete als auch für Cisplatin-ungeeignete Patienten (Powles et al., 2024; Zameer & Shaikh, 2024). In der aktuellen S3 Leitlinie von April 2025 findet sich diese Kombination noch nicht als Erstlinientherapie wieder ((AWMF), 2025).

1.2. Funktionsweise von Cisplatin

Cisplatin, auch bekannt als cis-diammindichloroplatinum, ist ein gängiges platinhaltiges Zytostatikum, welches bereits Ende der 1970er Jahre in der Therapie von Keimzelltumoren eingesetzt wurde (Dasari & Tchounwou, 2014). Seitdem ist das Einsatzgebiet deutlich gewachsen und Cisplatin findet Anwendung bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, wie bei Sarkomen, Ovarial- und Hodenkarzinom, sowie Urothelkarzinomen.

Die Wirkung von Cisplatin innerhalb der Zelle ist sehr vielseitig. Cisplatin kann über verschiedene Transporter in die Zelle gelangen. Diese Transporter funktionieren analog zum MDR1 Transporter, welcher ein ATP-bindender (Adenosintriphosphat) Transporter ist (Chan et al., 2013). Weiterhin fungiert der Kupfertransporter Ctr1 in Säugetieren als Cisplatinaufnahmetransporter. In der Zelle angekommen, wird das Molekül hydrolysiert und ist durch diese Reaktion stark elektrophil. Als Elektrophil kann es nun mit nukleophilen Substanzen interagieren. Hierzu zählen vor allem, die stickstoffhaltigen Basen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Zelle. Durch Bindung am N7 (Stickstoffatom Nr. 7) der Purinbasen der DNA, also Adenin und Guanin, sorgt Cisplatin für Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Strangs, und auch zwischen beiden DNA-Strängen. Zu den häufigsten Addukten zählen allerdings die intrastrang Addukte zwischen Guanin und Guanin, sowie zwischen Guanin und Adenin. Diese Verbindungen zwischen den einzelnen Basen behindern die Teilung der Zellen durch Inhibition der DNA-Replikation und führen so zu Zelltod induziert durch Apoptose (Dasari & Tchounwou, 2014).

Unabhängig von seiner genotoxischen Wirkung, übt das Zytostatikum auch auf andere Zellbestandteile Einfluss aus, welche schlussendlich zum Zelltod führen. Zellorganellen, welche durch Cisplatin geschädigt werden, sind zum Beispiel Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum, was zu vermehrter Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), fehlgefalteten Proteinen und Störung des Calciumhaushalts der Zelle führt. Durch Bindung von hydrolysiertem Cisplatin an Glutathion (GSH) und Metallothionein depletiert sich die zytoplasmatische Konzentration dieser Moleküle und die Zelle wird anfälliger für ROS (Timerbaev et al., 2006). Außerdem ist Cisplatin in der Lage, die Genexpression der Zelle und die Mitose, durch Bindung an dafür relevante Strukturen, zu stören (Makovec, 2019).

Neben der eigentlichen antitumoralen Wirkungsweise durch die zytotoxischen Effekte, löst Cisplatin bei Behandlung eine Vielzahl von unerwünschten Nebenwirkungen auf. Dazu zählen: Schädigungen der Nieren, Übelkeit und Erbrechen, Blutungen und mögliche Immunsuppression (Romani, 2022). Durch diese unerwünschten Wirkungen, sowie die durch vermehrte Cisplatin-Nutzung einsetzenden Resistenzen, wird die Behandlung mit Cisplatin in der Tumorbehandlung stark eingeschränkt (Romani, 2022).

1.3. Mechanismen der Cisplatinresistenz

Um die Entstehung der Cisplatinresistenz zu erklären, gibt es nicht nur einen möglichen Ansatz. Durch die sehr vielseitige Wirkungsweise und Interaktion mit der Zelle, bieten sich mehrere mögliche Wege zur Umgehung seiner toxischen Wirkung (Makovec, 2019). Klassifiziert werden können diese verschiedenen Wege ganz grob in: „*Pre-target, on-target, post-target und off-target*“ Wege (siehe Abb. 1), (Galluzzi et al., 2012).

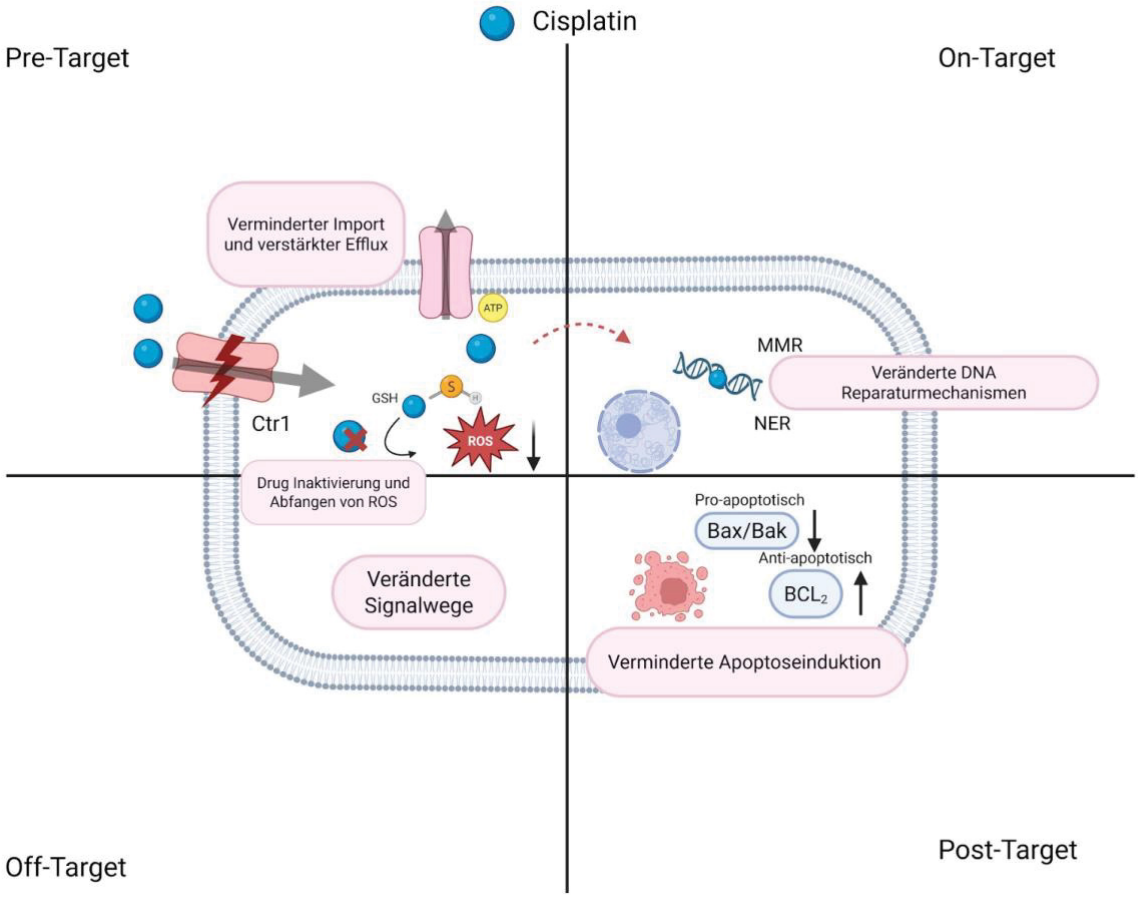

Abb. 1. **Möglichkeiten der Entstehung von Cisplatinresistenz in Cisplatin-resistenten Tumorzellen**. Beschrieben wurden die Mechanismen nach Galluzzi et al., 2012. Eingeteilt werden Mechanismen in der Zelle in *Pre-, On-, Post- und Off-Target* in Abhängigkeit von der eigentlichen Wirkweise von Cisplatin. *Pre-Target*: Konzentration von Cisplatin in der Zelle kann beeinflusst werden durch Import/Export sowie Bindung. *On-Target*: Interaktionen mit der DNA. *Post-Target*: Apoptose Inaktivierung durch Resistenzen. *Off-Target*: Veränderte Signalwege unabhängig von der eigentlichen Cisplatinwirkweise. Created in BioRender. Schrimpf, I. (2026) auf Basis der Abbildung von (Lugones et al., 2022). (Ctr1 = Kupfertransporter 1, ATP = Adenosintriphosphat, GSH = Glutathion, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, DNA = Desoxyribonukleinsäure, MMR = Mismatch-Reparatur-Proteine, NER = Nukleotid-Exzisionsreparatur, BCL2 = *B-cell lymphoma 2*)

Pre-target Mechanismen, also Entstehung der Cisplatinresistenz bevor es zur eigentlichen Interaktion mit der DNA kommt, beinhalten vor allem die Veränderung der zellulären Konzentration von Cisplatin und damit seine toxische Wirkung (Galluzzi et al., 2012). Um die intrazelluläre Konzentration von Cisplatin zu beeinflussen, kann entweder die zelluläre Aufnahme verhindert werden oder aber der zelluläre Efflux verstärkt werden. Wie zuvor beschrieben, dient der Ctr1 Transporter in Säugetieren vor allem zur Aufnahme von Cisplatin in die Zelle. Durch Veränderung im Ctr1 Gen durch Deletion wird in Tumorzellen die Aufnahme von Cisplatin vermindert und eine Resistenz gefördert (Ishida et al., 2002). Zum verstärkten Efflux, und damit ebenfalls zur

Resistenzentstehung, führen überexprimierte oder hochregulierte ATPasen (Nakayama et al., 2002). Um die toxische Wirkung von Cisplatin in der Zelle abzumindern, und die Level an aktivem Cisplatin zu senken, kann hydrolysiertes Cisplatin an cysteinreichen Proteinen, wie GSH und Metallothionein binden. Dies ist zum einen, wie oben beschrieben, eine erwünschte Wirkung, da durch diesen Prozess weniger ROS durch zum Beispiel GSH abgefangen werden könnte. Allerdings liegt dann zum anderen intrazellulär weniger aktives Cisplatin vor, welches DNA-Bindungen eingehen könnte. Dies wird durch resistente Zellen erreicht, indem erhöhte GSH-Level, durch zum Beispiel eine überexprimierte Glutathionreduktase (GSR) vorliegen. GSR reduziert oxidiertes GSH, welches dann erneut Cisplatin binden kann (Traverso et al., 2013).

On-target Mechanismen beschreiben den Umgang von Cisplatin-resistenten Zellen mit den, durch Cisplatin verursachten DNA-Schäden (Galluzzi et al., 2012). Beispielsweise zählen dazu effiziente DNA-Reparaturmechanismen. Zum einen wird dies durch eine verstärkte Exzision von veränderten Basen durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) gewährleistet. So scheint eine Überexpression von ERCC1, welches eine spezifische Nuklease als Teil des NER ist, für eine bessere DNA-Reparatur und somit für die Entwicklung einer Cisplatinresistenz sorgen zu können (Dabholkar et al., 1992). Zum anderen werden Cisplatin-Addukte durch fehlerhafte *Mismatch*-Reparatursysteme (MMR) nicht mehr gut erkannt und keine Apoptose eingeleitet. Im Regelfall würden durch das MMR DNA-Fehler erkannt, ein Zellzyklusarrest eingelegt und bei nicht möglicher Reparatur, die Apoptose eingeleitet werden. Durch Defizienz des MMR kann dies umgangen werden (Aebi et al., 1996).

Post-Target-Mechanismen umfassen die Möglichkeiten der resistenten Zellen, den durch den DNA-Schaden eingeleiteten Zelltod zu umgehen (Galluzzi et al., 2012). Um zu verstehen, wie diese Mechanismen funktionieren und die Apoptose umgangen werden kann, folgt ein kurzer Exkurs in die Biochemie der Zelle. Apoptose, also der programmierte Zelltod, kann durch extrinsische Wege über Rezeptoren, oder intrinsisch über eine Signalkaskade ausgelöst werden. Typische Ursachen, welche den intrinsischen Apoptoseweg auslösen können, sind zum Beispiel DNA-Schäden, welche nicht korrigierbar sind. Wichtiger Bestandteil der Apoptose sind so genannte Caspasen, Cystein-Aspartat-spezifische-Proteasen. Dabei unterscheidet man zwischen Initiatorcaspasen, also diese, die die Apoptose einleiten, und Effektorcaspasen, also diese, die den Zelltod im Endeffekt ausführen. Um den intrinsischen Weg der Apoptose einzuleiten, wird Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt und ist wichtig für die Aktivierung von Initiatorcaspase 9. Caspase 9 sorgt dann letztendlich für die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Effekte der Apoptose sind dann: Fragmentierung des Zellkerns, sowie Zerfall der Zelle in apoptotische Fragmente, welche durch Makrophagen phagozytiert werden. Die Freisetzung von Cytochrom C wird von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie katalysiert, welche durch den initialen DNA-Schaden vermehrt sezerniert werden. Dazu zählen zum Beispiel Bak und Bax. Diese Proteine bilden Poren in der Mitochondrienmembran, was die Freisetzung von Cytochrom C ermöglicht. Ebenfalls der Bcl-2

Familie angehörend, ist das Protein Bcl-2, welches antiapoptotisch wirkt und die Einleitung der Apoptose verhindern würde (Galluzzi et al., 2018).

Resistente Tumorzellen machen sich nun von verschiedenen Stellen in diesem Signalweg einen eigenen Nutzen. Zum Beispiel zeigt sich eine Überexpression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2 und gleichzeitige Verminderung von proapoptotischen Proteinen, wie Bax/Bak (Liu et al., 2023). Weitere Möglichkeiten umfassen ein Eingreifen in den Signalkaskadeweg selber oder verminderte Synthese von Tumorsuppressorgenen, wie p53 (Galluzzi et al., 2012). Ein weiterer wichtiger Punkt wäre zum Beispiel auch die direkte Modifikation von Initiator- und Effektorcaspasen und somit direktes Eingreifen in die Apoptoseausführung (Janson et al., 2010).

Off-Target-Mechanismen, als letzte Möglichkeit zur Umgehung der Cisplatin Wirkung, umfassen Veränderungen in zusätzlichen Signalwegen, welche nicht direkt mit dem Cisplatin Signalweg zusammenhängen (Galluzzi et al., 2012). Die Möglichkeit der Resistenzentstehung erfolgt dann, durch Kompensation von Schäden, welche durch Cisplatin induziert werden.

Folglich wäre es falsch davon auszugehen, dass sich jede Zelle bei jeder Tumorentität dem gleichen Mechanismus der Resistenzentstehung bedient. Allerdings lässt sich daraus ebenfalls schlussfolgern, dass es ebenso viele Möglichkeiten geben könnte, Cisplatin-resistente Tumorzellen wieder zu sensitivieren.

1.4. Mögliche Angriffspunkte zur Umgehung der Cisplatinresistenz

Um diese möglichen Angriffspunkte in der Therapie von Cisplatin-resistenten Urothelkarzinom-Zellen zu finden, wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe das Proteom von eigens etablierten Cisplatin-resistenten Sublinien (LTTs) von kommerziellen Urothelkarzinom-Zelllinien mit ihren Cisplatin-naiven parentalen Zellen mittels Proteinmassenspektrometrie verglichen. Die verglichenen Zelllinienpaare waren, T24+T24LTT, J82+J82LTT, 253J+253JLTT und RT112+RT112LTT. Die Top 10 der höher abundanten Proteine in LTTs wurden, mittels *Tissue Microarray Testung*, *in vivo* bei Patientenproben auf ihre Abundanz und Assoziation mit der Patientenprognose validiert. Inkludiert wurden hierfür Patienten, welche mindestens zwei Zyklen Chemotherapie erhalten hatten. Verglichen wurde dies mit allen anderen UC-Patienten. Gegenübergestellt wurden anschließend die generelle Überlebenswahrscheinlichkeit, sowie das progressionsfreie Überleben. Hierbei stellte sich heraus, dass zusätzlich zum Metastasierungsgrad und dem Geschlecht folgende Proteine einen signifikanten Unterschied in der Prognose der Patienten machen: TOP2A, APOBEC3B, NAMPT und GSR.

Um anschließend die funktionelle Relevanz dieser Proteine für die Entstehung der Cisplatinresistenz in den getesteten Zelllinien festzustellen, erfolgte ein transienter *siRNA*(*Small interfering* Ribonukleinsäure)-*Knockdown* derer Gene. Zeitgleich wurden die Zellen mit Cisplatin behandelt. Verglichen wurden diese mit nicht behandelten Zellen. Der *Knockdown* sensitivierte die Zellen

signifikant für Cisplatin. Zusätzlich dazu wurde mittels eines *Apoptose-Assays*, insbesondere für TOP2A und APOBEC3B, die funktionelle Relevanz bei Entstehung der Cisplatinresistenz nachgewiesen.

Als weitere Strategie sollte, im Verlauf der vorliegenden Arbeit, die Wirksamkeit einer Resensitivierung der Urothelkarzinom-Zellen auf Cisplatin durch pharmakologische Inhibition dieser Proteine erfolgen. Von den Kandidaten waren TOP2A, NAMPT und GSR mit kommerziell erhältlichen Inhibitoren pharmakologisch targetierbar. Hierfür wurden Daporinad, als NAMPT-Inhibitor und 2-AAPA als GSR-Inhibitor verwendet, wobei beide Inhibitoren klinisch noch keine Zulassung haben (Park et al., 2022), (de Souza et al., 2017). Die Beteiligung von TOP2A in der Tumorentstehung ist schon länger bekannt, weshalb die Inhibition dieses Enzyms bereits als Wirkmechanismus in der Zytostatikabehandlung Anwendung findet (Elfadadny et al., 2023). In dieser Arbeit wurde für die TOP2A-Inhibition Doxorubicin verwendet.

1.5. Funktion der Zielproteine und ihre Relevanz in der Tumorpathogenese

1.5.1. NAMPT

Die Nikotinamidphosphoribosyltransferase, kurz NAMPT, oder auch bekannt als Visfatin, ist das Schlüsselenzym im *Salvage Pathway*, beziehungsweise der Wiederverwendung von Nikotinamid (NAM). Dieses Enzym liegt sowohl als extrazelluläre (eNAMPT), als auch als intrazelluläre Form vor (Xu et al., 2022). NAMPT konvertiert NAM in Nikotinamid-Mononukleotid (NMN), welches wiederum für die Bildung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, kurz NAD, verwendet werden kann (Li et al., 2019). NAD, als Vitamin B_3-Derivat, kann in seiner oxidierten oder reduzierten Form als NAD+ oder NADH vorliegen. Damit dient NAD als wichtiger Elektronentransporter in der Zelle, welche im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung für die ATP Gewinnung der Zelle genutzt werden. In diesem Rahmen dient NAD+ auch als Cofaktor für viele Enzyme (Su et al., 2024).

Nicht nur in physiologischen Prozessen spielen NAD und NAMPT eine große Rolle. In der Tumorentstehung, sowie der Tumoraufrechterhaltung nimmt es ebenfalls eine zentrale Rolle ein. Zum einen dient eine Überexpression von NAMPT dazu, mittels verstärkter NAD+ Produktion den erhöhten Energiebedarf der Zelle zu decken und zum anderen unterstützt eNAMPT die Tumorprogression durch Veränderung des *Tumormikroenvironments*, Verstärkung des Tumormetabolismus und Förderung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transformation (EMT). eNAMPT fördert hierfür die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL6, TNFalpha, sowie eine Unterdrückung der anti-tumorösen Immunantwort (Xu et al., 2022).

Beschrieben wurde dieses Phänomen insbesondere bei Pankreas- und Magenkarzinomen, sowie Gliomen, Melanomen und Lymphomen (Xu et al., 2022). Von einem veränderten NAMPT- und

NAD-Haushalt wurde auch in Assoziation mit Urothelkarzinomen berichtet (Mierzejewska et al., 2018). In dieser Arbeit wurde Daporinad als NAMPT-Inhibitor verwendet.

1.5.2. GSR

Das Tripeptid Glutathion (GSH), bestehend aus Glutamat, Cystein und Glycin, ist eines der wichtigsten Antioxidationsmittel der Zelle. Über seine freie Thiolgruppe kann GSH oxidiert werden, es reduziert somit andere Verbindungen in der Zelle und kann so als Cofaktor an Enzymen interagieren, oder direkt freie Elektronen und ROS abfangen. GSH als Antioxidationsmittel bietet verschiedenen Zellbestandteilen somit den Schutz vor ROS und daraus resultierenden Schäden. GSH in seiner oxidierten Form (GSSG) muss zunächst, bevor es erneut oxidiert werden kann, wieder in die reduzierte Form überführt werden. Für diesen Schritt ist die Glutathionreduktase (GSR), ein $NADPH/H^+$ abhängiges Enzym, zuständig (Meister, 1995).
Um oxidative Schäden zu vermeiden, und um gleichzeitig ihre schnelle Teilungsrate aufrecht erhalten zu können, weisen Tumorzellen erhöhte GSH- und GSR-Level auf. Gleichzeitig steht dies in Verbindung mit einer erhöhten Chemoresistenz von Tumorzellen (Traverso et al., 2013). In dieser Arbeit wurde 2-AAPA als GSR-Inhibitor verwendet.

1.5.3. TOP2A

DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, welche essenziell für zelluläre Prozesse wie die Replikation und Transkription sind. Sie entwinden die DNA-Doppelhelix. Konkreter gesagt, sorgen sie durch spezifische Schnitte in einem, oder beiden Strängen dafür, dass die Stränge während dieser Prozesse spannungsfrei voneinander getrennt werden können (Wang, 1996). Grob unterteilen kann man diese Enzyme in zwei Gruppen. Typ 1 und Typ 2, wobei diese erneut in Gruppe A und B unterteilt werden. Der wesentliche Unterschied ist, dass Typ 1 Einzelstrangbrüche erzeugen und Typ 2 Doppelstrangbrüche (Ali & Abd Hamid, 2016). Funktionell relevant ist für diese Arbeit allerdings nur Topoisomerase 2 alpha (TOP2A). TOP2A ist zudem mit Zellproliferation assoziiert und somit ein gutes Ziel für eine antiproliferative Therapie (Ali & Abd Hamid, 2016). Tumorzellen, dazu zählend auch Urothelkarzinom-Zellen, sind assoziiert mit einem deutlich erhöhten Expressionslevel von TOP2A (Zeng et al., 2019).
Mit Doxorubicin als Zytostatikum im gängigen Therapieschema des MIUC wird die Hemmung von TOP2A effektiv als Zielstruktur verwendet (Zacharis & Grullich, 2020). In dieser Arbeit wurde Doxorubicin als TOP2A-Inhibitor verwendet.

1.6. Möglichkeiten zur Umgehung der Cisplatinresistenz durch Kombinationstherapie

In der aktuellen Therapie des MIUCs wird bereits eine Kombinationstherapie aus mehreren Zytostatika angewandt, um den größtmöglichen Therapieerfolg zu erzielen (Patel et al., 2020). Um das Hindernis der Cisplatinresistenz zu umgehen, wurden bereits in verschiedenen Studien Inhibitoren möglicher *Targets* der resistenten Zellen mit Cisplatin kombiniert. So zeigten sich verschiedene Kombinationsmethoden als vielversprechende Ziele für die Resensitivierung von resistenten Zellen.

Zargar et al. zeigten in ihrem Versuch 2022, dass sich durch eine Vorbehandlung von Cisplatin-resistenten Zellen mit Acriflavine (einem antimikrobiellen Farbstoff), eine Herunterregulierung von Topoisomerase 1 und 2 erreichen ließ. Dies resultierte schlussendlich in einem besseren Ansprechen der vorbehandelten Zellen auf die Cisplatin-Behandlung als bei Zellen ohne Vorbehandlung (Zargar et al., 2022). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in einer Studie von 2023 nachgewiesen. Hierbei wurden Ovarialtumorzellen mittels Quercetin vorbehandelt und reagierten so sensitiver auf die Cisplatin-Behandlung (Hasan et al., 2023).

Als weitere Kombinationsoption, neben einer Vorbehandlung, bietet sich die simultane Behandlung der Zellen mittels Inhibitors und Cisplatin an. Durch die Kombination von Cordycepin und Cisplatin zeigte sich in einer Studie von 2020 eine deutliche Resensitivierung von resistenten T24 Urothelkarzinom-Zellen und ein besseres Therapieansprechen, als bei separat behandelten Zellen (Oh et al., 2020).

Analog wurden solche Behandlungsmodelle für die Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin für diese Arbeit implementiert.

Solche Arbeiten bildeten die Basis für die Idee dieser Arbeit, nämlich eine Kombination eines Inhibitors der o.g. Proteine mit Cisplatin.

1.7. Möglichkeit einer cisplatinfreien Therapieoption durch *Heat-Shock-Protein*-Inhibitoren

Eine neue Möglichkeit der cisplatinfreien Therapie könnte Ganetespib bieten. Ganetespib ist ein *Heat-Shock-Protein* 90-Inhibitor (Hsp90) der zweiten Generation. Es zeigten sich *in vitro* und *in vivo* starke zytotoxische und antitumoröse Eigenschaften, bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu den Erstgenerationsformen, wie Geldanamycin (Youssef et al., 2023). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden die LTT-Zelllinien einem Hochdurchsatz *Drug Screen* mit einer Bibliothek an klinisch zugelassenen Substanzen unterzogen. Dabei ergab sich Ganetespib als eine vielversprechende Substanz, die die Viabilität der LTTs signifikant reduzierte. Daher sollte dieser Befund in der vorliegenden Arbeit validiert werden.

Heat-Shock-Proteine sind wichtige Proteine in allen Zellen und kommen auch in extrazellulären Kompartimenten vor. Sie lassen sich in verschiedene Gruppen anhand ihres Molekulargewichtes einteilen, dazu gehören die: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70 und die Hsp90 Familie. Ihnen kommen verschiedene Aufgaben zu, wie die Proteinfaltung, der Transport von Proteinen und die richtige Zuweisung in zelluläre Kompartimente, Zellzyklus-Kontrolle, Einfluss in Signalwegen, Schutz der Zelle vor zytotoxischem Stress, sowie Apoptose und der Antigenpräsentation (Hagymasi et al., 2022).

Hsps lassen sich auch deutlich überexprimiert in einer Vielzahl von Tumorzellen nachweisen. Durch ihre zytoprotektive Wirkung benötigen Tumorzellen diese zum Überleben (Regimbeau et al., 2022). Mit dem Fokus auf die Hsp90 Familie ließen sich folgende Überlegungen zu ihrer Rolle im Tumorüberleben anstellen. Hsp90 ist insbesondere wichtig für die Zellzyklusregulation, DNA-Schadens-Meldungen, und Überleben der Zelle. Zudem ist es ein wichtiger Akteur in Signalwegen, welche Tumorassoziiert sind, wie mTOR, Raf, MAPK-Wege. Insbesondere die extrazelluläre Form von Hsp90 ist assoziiert mit Tumorprogression, Zellüberleben und Angiogenese, sowie Immunmodulation und Regulation des *Tumormikroenvironments* durch Interaktion mit Tumorassoziierten-Fibroblasten (Youssef et al., 2023).

So ließ sich auch in Urothelkarzinom-Zellen eine Veränderung in der Expression von *Heat-Shock-Proteinen*, darunter Hsp27, Hsp70 und Hsp90 feststellen. Insbesondere zeigte sich, dass eine Hsp90-Überexpression mit dem pathologischen Zustand und dem *Grading* des Tumors korrelierte (Ischia & So, 2013). Es ließ sich vermuten, dass nicht nur die Gesamtproteinmenge entscheidend sei, sondern insbesondere der Affinitätszustand. Diese Schlussfolgerung ergab sich, nachdem man ebenfalls erniedrigte Proteinlevel in manchen Tumorzellen nachweisen konnte (Lebret et al., 2003). *Heat-Shock-Proteine* scheinen allerdings, sowohl als prognostischer Marker, als auch als mögliches Therapieziel eine vielversprechende Option zu sein (Lebret et al., 2003).

Als möglicher Inhibitor bindet Ganetespib nun die ATP-Bindestelle von Hsp90 und sorgt durch diese Inhibition für eine verminderte Aktivität und eine antitumoröse Wirkung. Dies resultiert in einer verminderten Aktivierung und Expression von Rezeptoren, wie IGF-1, EGFR, HER und Zytokinrezeptoren, und somit verminderte Signalwegaktivierung und reduzierte prokanzeröse Genexpression und Effekte (Youssef et al., 2023).

Es wird zudem davon ausgegangen, dass eine Kombination von Ganetespib mit anderen zytotoxischen Substanzen, zum Beispiel Anthracyclinen wie Doxorubicin, additive oder synergistische Effekte aufweisen könnte (Youssef et al., 2023)

1.8. Fragestellung dieser Arbeit

Cisplatin ist immer noch ein wichtiger Bestandteil in der Therapie des MIUCs. Durch Resistenz gegenüber Cisplatin und die gleichzeitig immer schlechter werdende Prognose bei nicht

ansprechender Therapie, ist es essenziell eine alternative Behandlungsmöglichkeit zu finden, um den Patienten trotzdem die vielversprechendste und wirkungsvollste Therapie zu ermöglichen.
Daher war das Ziel dieser Arbeit einen neuen therapeutischen Ansatz zu finden die Cisplatinresistenz in Urothelkarzinom-Zellen zu umgehen und im besten Falle die Tumorzellen für das Zytostatikum zu resensitivieren.
Um die Verbindung zu den in den Vorarbeiten entdeckten, pharmakologisch targetierbaren, Proteinen (NAMPT, GSR, TOP2A) herzustellen, sollte zunächst das Proteinniveau in den Urothelkarzinom-Zelllinien dargestellt werden. Hierfür wurden mittels Westernblot-Analyse die Proteinniveaus von parentalen Urothelkarzinom-Zellen mit ihren Cisplatin-resistenten LTT-Sublinien verglichen.
Um die Wirksamkeit der Inhibitoren zu testen, wurden mittels Viabilitäts-Testung Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, sodass die halbletale Dosis (IC_{50}) des jeweiligen Wirkstoffes berechnet werden konnte. Zeitgleich diente dieser Test dazu herauszufinden, ob ein Einsatz dieser Inhibitoren klinisch überhaupt möglich wäre. Dazu wurden zugleich benigne Zelllinien behandelt und die toxische Wirkung auf die Zellen mit der auf die Urothelkarzinom-Zellen verglichen. Potenziell wirksame und nicht zu toxische Kandidaten wurden anschließend in eine Kombinationsbehandlung mit Cisplatin übernommen. Ziel dabei war es, durch synergistische Effekte die antineoplastische Wirkung von Cisplatin auf die Zellen zu verstärken. Zudem sollten Effekte auf die Apoptoseinduktion geprüft werden.
Mittels Substanzscreening wurde der Hsp90 Inhibitor Ganetespib ermittelt, welcher ein ebenfalls vielversprechender Kandidat in der Tumortherapie bei Cisplatin-resistenten Urothelkarzinom-Zellen darstellt. Entsprechend sollte seine Wirkung auf die Zelllinien Modelle analog geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Die verwendeten Urothelkarzinom-Zelllinien wurden im urologischen Forschungslabor kultiviert. Hierbei handelte es sich ausschließlich um kommerziell erhältliche Zelllinien. Die Urothelkarzinom-Zelllinien wurden zur Verfügung gestellt von Prof. M. A. Knowles (Leeds Institute of Cancer and Pathology, Leeds, United Kingdom), Dr. J. Fogh (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY), Dr. B. Grossman (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (DSMZ). Die Cisplatin-resistenten Sublinien (LTTs) wurden in früheren Arbeiten im Labor selbst aus den kommerziellen Zelllinien durch Langzeit-Behandlung mit Cisplatin mit aufsteigender Dosierung von Cisplatin generiert

(Skowron et al., 2018). Die humane benigne urotheliale Zelllinie HBLAK wurde von der Firma CellnTec (Schweiz) bezogen. Die humanen Fibroblasten der Harnblase (HBF) wurden von der Firma Lifeline Cell Technology käuflich erworben.

Zelllinie *maligne*	**Geschlecht; Alter**	**TNM Grading**	**Referenz**
T-24	F, 81	G3	Bubenik et al, 1973
T-24 LTT	F, 81	G3	Skowron et al., 2018
J-82	M, 58	TCC	O'Toole et al., 1978
J-82 LTT	M, 58	TCC	Skowron et al., 2018
253J	M, 53	T4, G4	Elliot et al. 1974
253J LTT	M, 53	T4, G4	Skowron et al. 2018
RT-112	F	G2	Masters et al., 1986
RT-112 LTT	F	G2	Skowron et al., 2018
Zelllinie *benigne*	**Alter**	**Ursprung**	**Besonderheit/Referenz**
HBLAK	M, 80	Uroepithelzellen Blase	Hoffmann et al., 2016
HBF	M	Fibroblasten Blase	Firmendatenblatt

Tabelle 1: **Übersicht über die verwendeten Urothelkarzinomzellinien und Kontrollzelllinien**. Angegeben sind zusätzlich die Auskunft über das Geschlecht (F = Weiblich, M = Männlich), das Alter, Tumorgrad, Tumorstadium, Referenz und Ursprung

2.1.2. Antikörper

Antikörper	**Wirt**	**Verdünnung**	**Blockierung**	**Kat.-Nr.**	**Hersteller**	**Standort**
NAMPT (Visfatin)	Kaninchen	1:1000	5% Milch	ab252558	Abcam	Cambridge, UK
GSR	Kaninchen	1:2000	5% Milch	ab124995	Abcam	Cambridge, UK
TOP2A	Maus	1:500	5% Milch	MA5-44952	Invitrogen	Massachusetts, USA
TROP2	Kaninchen	1:1000	5% Milch	SAB1306344	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Nectin-4 (PVRL4)	Kaninchen	1:1000	5% BSA	17402	Cell Signaling	Cambridge, UK

					Technology	
Vinculin	Maus	1:5000	5% Milch	05-386	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Polyklonaler Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulin/HRP	Ziege	1:2000	1% Milch	P0448	Agilent Technologies Dako	Santa Clara, Kalifornien, USA
Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin/HRP	Kaninchen	1:1000	1% Milch	P0260	Agilent Technologies Dako	Santa Clara, Kalifornien, USA

Tabelle 2: **Verwendete Antikörper**. Angegeben sind zusätzlich Wirt, Verdünnung, Blockierung, Katalog-Nummer, Hersteller und Standort (NAMPT = Nikotinamidphosphoribosyltransferase, GSR = Glutathionreduktase, TOP2A = Topoisomerase 2 alpha, TROP2 = *Trophoblast Cell-Surface Antigen 2*)

2.1.3. Verwendete Wirkstoffe

Wirkstoffname	**Target**	**Molekulargewicht (g/mol)**	**Kat.-Nr.**	**Hersteller**	**Standort**
Daporinad (FK866)	NAMPT	391,51	HY-50876	Hycultec	Bayern, Deutschland
2-AAPA hydrate	GSR	518,65	A4111	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Doxorubicin	TOP2A	579,98	25316-40-9	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Ganetespib (STA-9090)	HSP90	364,4	HY-15205	Hycultec	Bayern, Deutschland
Cisplatin	DNA	301,01	01551736	Hexal AG	Holzkirchen, Deutschland

Tabelle 3: **Verwendete Wirkstoffe**. Zusätzlich angegeben Wirkstoffname, Zielmolekül, Molekulargewicht in (g/mol = Gramm pro Mol), Katalog-Nummer, Hersteller und Standort (NAMPT = Nikotinamidphosphoribosyltransferase, GSR = Glutathionreduktase, TOP2A = Topoisomerase 2 alpha, HSP90 = *Heat-Shock-Protein* 90, DNA = Desoxyribonukleinsäure)

2.1.4. Medien und Puffer

Medien	**Hersteller**	**Standort**
Accutase	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
CnT Prime Medium	CellNTec	Bern, Schweiz
Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

DMEM+GlutaMAX (+4,5 g/L D-Glucose, + Pyruvat)	Gibco	Waltham, Massachusetts, USA
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
FibroLife S2 Medium Complete Kit	Lifeline Cell Technology	Oceanside, California, USA
Trypsin/EDTA	Gibco/Sigma Aldrich	Waltham, Massachusetts, USA/St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 4: **Verwendete Zellkulturmedien, Hersteller und Standort**. (DMEM = *Dulbecco´s Modified Eagle Serum*, DPBS = *Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline*, FCS = Fetales Kälberserum)

Assay-Kit	**Hersteller**	**Standort**
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega	Madison, Wisconsin, USA
Cell Titer-Glo® 2.0 Assay	Promega	Madison, Wisconsin, USA
MTT Pulver	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 5: **Molekularbiologische Kits/Assays, Hersteller und Standort**. (BCA = Bicinchoninsäure, MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test)

Puffer	**Hersteller**	**Standort**
10x Tris/Glycin Buffer	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
10x Tris/Glycin/SDS Buffer	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Milchpulver	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Millipore Wasser	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Phosphatase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Protease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Ripa Puffer	Thermo Scientific Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Roti® Load	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH+Co. KG/Bio Rad	Karlsruhe, Deutschland
Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Super Signal West Femto Pierce	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Super Signal West Pico Pierce	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Tris	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 6: **Verwendete Puffer und Chemikalien, Hersteller und Standort** (kDa = Kilodalton)

Puffer Lösung	**Zusammensetzung**
Block Lösung 1. Antikörper	5% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T 5% BSA in 0,1% TBS-T
Block Lösung 2. Antikörper	1% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T
Protein Lysis Puffer („Ripa Puffer“, pH7,6)	150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,5% Desoxycholat 1% NP-40 0,1% SDS 1 mM EDTA 50 mM Tris (pH 7,6) 0,1% Proteaseinhibitor-Cocktail (Zugabe vor Gebrauch) 0,1% Phosphataseinhibitor-Cocktail (Zugabe vor Gebrauch)
10 x Tris/Glycin *Buffer*	250 mM Tris 1,92 M Glycin pH 8,8
Blotting Puffer	1-fach Tris/Glycin Buffer: 25 mM Tris 192 mM Glycin 10% (v/v) Methanol ad 1 Liter Millipore Wasser pH 8,3
10 x Tris/Glycin/SDS *Buffer*	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS pH 8,8
Running Buffer	1-fach Tris/Glycin/SDS Buffer 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS ad 1 Liter Millipore Wasser pH 8,3
10 x TBS (à 1 Liter)	87,7 g NaCl 12,11 g Tris ad 1 Liter Millipore Wasser pH 7,4
1 x TBS-T (à 1 Liter)	100 mL 10 x TBS 900 mL Millipore Wasser

	0,1% Tween
Sammelgel (à 2 Gele)	3,4 mL Millipore Wasser 0,83 mL PAA 30% 0,63 mL 1M Tris pH6,8 0,05 mL 10% SDS 0,05 mL 10% APS 0,005 mL Temed
Trenngel 8% (à 2 Gele)	4,6 mL Millipore Wasser 2,7 mL PAA 30% 2,5 mL 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 mL 10% SDS 0,1 mL 10% APS 0,01 mL Temed
Trenngel 10% (à 2 Gele)	4 mL Millipore Wasser 3,3 mL PAA 30% 2,5 mL 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 mL 10% SDS 0,1 mL 10% APS 0,005 mL Temed
Trenngel 12% (à 2 Gele)	3,3 mL Millipore Wasser 4 mL PAA 30% 2,5 mL 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 mL 10% SDS 0,1 mL 10% APS 0,005 mL Temed
10% (w/v) APS	1 g Ammoniumpersulfat 10 mL Millipore Wasser
10% SDS	10 g SDS 100 mL Millipore Wasser
MTT-Detergenz (5 mg/mL)	200 mg MTT Pulver 40 mL PBS

Tabelle 7: **Verwendete (Puffer-) Lösungen Zusammensetzung** (mM = Millimolar, M = Mol, g = Gramm, mL = Milliliter, APS = Ammoniumpersulfat, BSA = Bovines Serumalbumin, TBS = *Tris-buffered saline*, SDS = Sodium-Dodecyl-Sulfate, PBS = *Phosphate-Buffered Saline*)

2.1.5. Geräte und Software

Laborgerät	**Hersteller**	**Standort**
Allegra™ 2IR Centrifuge	Beckman Coulter™	Krefeld, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Chemi Doc Imaging System	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
HERACell 150i CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
iMark Microplate Reader	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
LC3201D Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Mini Trans Blot Cell	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Mini Protean Tetra System	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multipette® Stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Microprocessor pH-Meter	WTW	Bayern, Deutschland
Pipetten (Research/Reference)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Power Pac Basic	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Revco CxF (-80° Celsius Gefriertruhe)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Schüttler (KS250 Basic)	IKA Labortechnik	Staufen im Breisgau, Deutschland
TC20 Automated Cell Counter	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Wallace Victor^{2}™ 1420 microplate reader	Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 8: **Laborgeräte mit Hersteller und Standort**

Programm	**Hersteller**	**Standort**
CompuSyn Software	CompuSyn, Inc.	Paramus, New Jersey, USA
GraphPad Prism Version 9.5.1 (733)	Graphpad Software, Inc.	Boston, Massachusetts, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation	Redmond, Washington, USA
Microplate Manager® 6 Software	BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Wallace 1420 Manager	Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 9: **Verwendete Software mit Hersteller und Standort**

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Zellkultur

- T-25 Flasche
- T-75 Flasche
- Stripetten
- Gestopfte Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Schraubröhre 50 mL
- Schraubröhre 15 mL
- Röhre+Tube 5 mL
- Röhre+Tube 15 mL
- *96-Well-Plate*
- *96-Well Advanced TC™ Plate*
- *96 Well Optical Btm Plt PolymerBase White w/Lid Cell Culture Sterile PS* (Thermo Fisher)
- *6-Well-Plate*
- *6-Well Advanced TC™ Plate*
- Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)
- Pasteur Pipetten

Laborgebrauch

- Immobilon-P Membran, PVDF 0,45 µm (Merck, Millipore)
- *Whatman Paper*
- Pipetus® (Pipettboy)
- Spritzen
- Nadeln
- *96-Well-Plate* (unsteril)
- Pipettenspitze 5 mL

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Sarstedt, Greiner, Corning und Eppendorf gekauft.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung und Passagieren der Urothelkarzinomzellen

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5% CO_2 und 95 % Wasserdampfsättigung in 25 cm^2 oder 75 cm^2 Zellkulturflaschen in je 5 mL oder 12 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurde 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Zur Zellpassage wurde das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen, die Zellen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen, dieses entfernt und je 1 ml à T-25 oder 2 ml à T-75 Zellkulturflasche 0,05 % Trypsin/EDTA hinzugefügt. Bei Inkubation sorgte dies für ein Ablösen der Zellen von der Gefäßwand. In eine neue Flasche wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie (siehe Material) frisches DMEM hinzugegeben. Nach Ablösung wurden die Zellen mit je 4 mL oder 10 mL resuspendiert und abhängig vom Passage-Verhältnis 0,25 mL bis 1 mL in das neue Gefäß überführt.

Die HBLAK Zellen wurden unter denselben Bedingungen kultiviert. Zur Passage wurden diese ebenfalls mit PBS gewaschen und darauffolgend mit 2,5 mL Accutase abgelöst. Nach Ablösung der Zellen von der Gefäßwand wurden sie mit 10 mL CnT-Prime Medium resuspendiert und bei 100 G 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit 4 mL frischem Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 1,5 mL in eine neue T-75 Zellkulturflasche mit 10 mL Medium überführt.

Die HBF Zellen wurde analog zu den anderen Zellen in FibroLife S2 Medium Complete Kit kultiviert.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Die anschließende Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Hilfe des automatischen *Zellcounters* der Firma BioRad. Zur Bestimmung wurden 10 µL Zellsuspension und 10 µL Trypanblau (0,25%) miteinander vermengt. 10 µL dieser Suspension wurden auf ein *Counter Slide* gegeben. Mit Hilfe

des Trypanblaus erkennt das Gerät die abgestorbenen Zellen. Das Ergebnis der Zellzählung wird als Zellzahl pro Milliliter angeben. Unterschieden wird hierbei zwischen den gesamten und den lebenden Zellen.

Mit Hilfe der Zellzahl wurde das Gesamtvolumen an benötigter Zellsuspension berechnet. Für die benötigte Menge wurde die Zellsuspension mit DMEM vermengt. Pro Well in einer 96-Well Platte wurden jeweils 80 µL Zellsuspension ausplattiert. Pro Well in einer 6-Well Platte 2 mL. Für die zelllinienspezifischen Angaben siehe Tabelle 10.

Zelllinie	**Zellzahl pro Well (96 Well)**	**Zellzahl pro Well (6 Well)**
T24	1500	/
T24LTT	6000	300.000
J82	3000	/
J82LTT	6000	300.000
RT112LTT	6000	/
253JLTT	6000	/
HBLAK	4000	200.000
HBF	1000	/

Tabelle 10: **Zellzahl der Zelllinien zum Aussäen**

2.2.3. MTT-Test zur Analyse der Zellviabilität

MTT-Test Methode

Der MTT-Test wird zur Messung der Zellviabilität genutzt und kann als Indikator für Zytotoxizität nach Behandlung mit einem Inhibitor genutzt werden. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (MTT) ist ein gelber Farbstoff, welcher durch NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktase-Enzyme in viablen Zellen in das violette Formazan umgewandelt wird. Je dunkler die Farbe, desto mehr lebendige Zellen sind noch vorhanden. Zur Durchführung dieses Assays wurden 10 µL MTT-Reagenz à 100 µL pro 96-Well Platte gegeben. Diese wurden je nach Zelllinie bei Standardbedingungen 1 Stunde bis 3 Stunden (siehe Tabelle 11) inkubiert. Nach Inkubation erkennt man bereits die Umfärbung in das violette Formazan. Der Inhalt der 96-Well Platte wurde entleert, sodass nur noch die viablen, adhärenten Zellen am Boden der Platte waren. Diese wurden mittels Dimethylsulfoxid (DMSO) lysiert, sodass der Farbstoff freigesetzt wurde. Detektiert wurde der Farbstoff mit Hilfe einer photometrischen Messung bei 595 nm und einer Referenzwellenlänge von 750 nm. Die Daten ergaben Zahlen zwischen 0 und 1. Anhand dieser Daten konnte die Zellviabilität normiert werden. Die Rohdaten wurden wie folgt mit Excel bearbeitet: Von den Rohdaten der Wellenlänge mit 595 nm wurden die Referenzdaten der gleichen Wells mit 750 nm subtrahiert. Anschließend wurde von allen Wells der Leerwert subtrahiert. Von den jeweiligen Quadruplikaten wurden Mittelwert und Standardabweichung (SD) berechnet. Diese wurden auf die positive Referenz (die Medium- oder Lösungsmittelkontrolle) normiert, wobei diese 100% entspricht. So ergab sich eine absteigende Viabilitätskurve.

Zelllinie	Zeit (Stunden)
T24	1
J82	1
T24LTT/J82LTT/RT112LTT/253JLTT	1,5
HBLAK	3
HBF	2

Tabelle 11: **Inkubationsdauer der Zelllinien nach MTT-Reagenz Zugabe in Stunden.**

MTT-Test nach Monotherapie

An Tag eins der Behandlung wurden je 80 µL Zellsuspension pro Well auf eine 96-Well Platte gegeben. Zur späteren Eliminierung des Hintergrunds wurde eine *Blank* Spalte mit 100 µL Medium befüllt. Die Platte wurde unter Standardbedingungen inkubiert.

An Tag zwei der Behandlung wurden die Zellen mit dem jeweiligen Medikament behandelt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe über sieben bis acht Dosispunkte angesetzt. Als positive Referenz wurde eine Mediums-, beziehungsweise DMSO-Kontrolle gewählt. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurden abhängig vom Gesamtvolumen und der Stockkonzentration der Substanz berechnet (siehe Tabelle 12, Tabelle 13). Die Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe vom DMEM/CnT-Prime Medium auf die gewünschten sieben bis acht Dosispunkte verdünnt. Da durch die Aussaat bereits 80 µL im Well vorhanden waren, musste diese Vorverdünnung in der Dosisberechnung beachtet werden (siehe Tabelle 13). Auf die bestehenden 80 µL im Well durch die Aussaat, wurden 20 µL pro Well an Medikamentenverdünnung gegeben, um ein Endvolumen von 100 µL pro Well zu erreichen.

Inhibitor	Lösungsmittel	Stockkonzentration (mM)	Dosisbereiche
Daporinad	DMSO	10	0,5 nM – 10 µM
2-AAPA Hydrate	DMSO	20	100 nM – 50 µM
Doxorubicin	H20	50	5 nM – 5 µM
Cisplatin	H20	3,33	100 nM – 30 µM
Ganetespib	DMSO	10	10 nM – 100 nM

Tabelle 12: **Informationen zu den verwendeten Inhibitoren** (Lösungsmittel, Stockkonzentration (mM = Millimolar), verwendete Dosisbereiche (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)) (DMSO = Dimethylsulfoxid, H20 = Wasser)

Gewünschte Konzentration (µM)	Konzentration mit 1:5 Verdünnung (µM)	Benötigte Menge Substanz (µL)	Ad Medium (µL)	Gesamtvolumen (µL)
X	X*5	Konzentration/(Stock/Gesamtvolumen) *Verdünnung	400-Benötigte Substanzmenge	400

Tabelle 13: **Exemplarische Berechnung eines Dosispunktes bei 20 µL Zugabe pro Well**
(µM=Mikromolar, µL=Mikroliter)

Die Wells wurden daraufhin mit jeweils 20 µL der Verdünnungsreihe behandelt. Pro Dosispunkt wurden immer Quadruplikate in einer Spalte behandelt.
An Tag fünf wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt.

MTT Test nach Kombinationstherapie

Kombinationstherapie mit Vorbehandlung

An Tag eins der Behandlung wurden die Zellen (LTTs) auf eine 6 Well Platte ausgesät. Die vorbehandelten Wells wurden jeweils doppelt ausgesät.
An Tag zwei wurden die Zellen jeweils mit 1500 µL ihrer halbletalen Dosis (IC_{50}) des Inhibitors behandelt. Daraufhin wurden sie 48 h bei Standardbedingungen inkubiert.
An Tag vier der Behandlung wurde das Medium-Inhibitor-Gemisch entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden gezählt. Anschließend wurden die Zellen nach oben genanntem Schema auf eine 96-Well Platte mit 80 µL pro Well ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert.
An Tag fünf der Behandlung wurden die vorbehandelten Zellen mit einer Verdünnungsreihe von Cisplatin mit je 20 µL pro Well behandelt (selbe Methode wie bei Monotherapie). Als Referenz diente eine unbehandelte Mediums-Kontrolle.
An Tag acht der Behandlung wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die drei Kurven durch die drei verschiedenen Vorbehandlungen wurden in einem Graphen dargestellt und miteinander verglichen.

Simultane Kombinationstherapie

An Tag eins der Behandlung, wie auch in der Monotherapie, wurden die Zellen (LTTs) auf 96-Well-Platten ausgesät. Folgende Dosispunkte wurden abhängig vom IC_{50} gewählt: 0,125x, 0,25x, 0,5x, 0,75x, 1x und 1,5x IC_{50}, jeweils als Quadruplikate. Die Zellen wurden für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert.
An Tag zwei der Behandlung wurden die Zellen mit den Inhibitoren behandelt. Zum Vergleich wurden die Zellen jeweils mit den Einzelsubstanzen bzw. einer Kombination aus jeweils einem Inhibitor und Cisplatin behandelt. Nach Zugabe der Inhibitorenverdünnung sollte eine Endvolumen mit 100 µL pro Well entstehen. Für die Monotherapie wurden 20 µL pro Medikament und für die Kombitherapie jeweils 10 µL pro Medikament hinzugegeben (Berechnung siehe Tabelle 14).

Gewünschte Konzentration	**Konzentration mit 1:5 Verdünnung**	**µL Substanz**	**Ad µL Medium**	**Gesamtvolumen (µL)**

X µM	X*10 µM	Konzentration Verdünnung/(Stockkonzentration/Verdünnung)*Gesamtvolumen	400-Benötigte Substanzmenge	400

Tabelle 14: **Exemplarische Berechnung eines Dosispunktes bei 10 µL Zugabe pro Well** (µM=Mikromolar, µL=Mikroliter)

Die Zellen wurden nach der Behandlung für 48 h bei Standardbedingungen inkubiert. An Tag fünf der Behandlung wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt.

Synergieanalyse der simultanen Kombinationstherapie

Um zu untersuchen, ob die simultane Kombinationstherapie synergistische Effekte bewirkt, wurden die Viabilitätsdaten aus der simultanen Kombinationstherapie mit Hilfe der CompuSyn Software der Firma CompuSyn Inc. analysiert.

2.2.4. Cell Titer-Glo® 2.0 Viability Test

Der Cell Titer-Glo 2.0 Viability Test der Firma Promega misst ähnlich zum MTT-Test auch die Viabilität von Zellen und kann somit die Toxizität eines Wirkstoffes darstellen. Durch den Test werden viable Zellen lysiert und das freigesetzte ATP zur Messung verwendet. Je mehr ATP in der Zelle/pro Well noch vorhanden ist, desto höher ist die metabolische Aktivität der Zellen und desto mehr viable Zellen befinden sich noch im Well. Detektiert wird die Viabilität durch eine ATP abhängige Luziferase Reaktion, bei welcher Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert wird. Das Oxyluciferin kann über eine Lumineszenz Messung mit dem Wallace 1410 *Victor$_2$ Microplate Reader* detektiert werden.

Äquivalent zum MTT-Test wurden die Zellen an Tag eins ausgesät, 24 h inkubiert, an Tag zwei je nach Versuchsaufbau behandelt, sodass pro Well ein Gesamtvolumen von 100 µL zustande kam.

Die Detektion erfolgte durch 1:1 Zugabe der Cell Titer Glo Reagenz pro Well.

Die Daten wurden auf eine positive Referenz in Excel normiert und als Kurvendiagramm dargestellt, welche die Viabilität im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle angibt.

2.2.5. Caspase-Glo® 3/7 Test

Der Caspase-Glo 3/7 Test der Firma Promega misst die Caspase 3/7 Aktivität in Zellen und beschreibt somit die apoptotische Wirkung, welche durch ein jeweiliges Medikament in den Zellen ausgelöst wird. Der Assay stellt die Caspase 3/7 Aktivität über zwei Reaktionsschritte dar. Das im Kit enthaltene Caspasesubstrat DEVD, eine Tetrapeptid Sequenz, ist an Luciferin gebunden. Durch Caspaseaktivität der Zellen wird DEVD abgespalten und im zweiten Reaktionsschritt Luciferin durch Luciferase ATP, O_2 und Mg^{2+} abhängig zu dem lumineszierenden Oxyluciferin umgewandelt. Diese Reaktion konnte mittels Lumineszenz Messung an dem *Wallace 1410 Victor$_2$ Microplate Reader* detektiert werden.

Äquivalent zum MTT-Test wurden die Zellen an Tag eins ausgesät, 24 h inkubiert, an Tag zwei je nach Versuchsaufbau behandelt, sodass pro Well ein Gesamtvolumen von 100 µL zustande kam. Die Dosispunkte wurden äquivalent zu den Dosispunkten aus der MTT-Kombinationstherapie ohne Vorbehandlung angesetzt und wie folgt ausgewählt:

Kontrolle (Medium/DMSO)

IC_{25} Dosis Inhibitor

IC_{50} Dosis Inhibitor

IC_{25} Dosis Cisplatin

IC_{50} Dosis Cisplatin

IC_{25} Dosis Inhibitor + Cisplatin

IC_{50} Dosis Inhibitor + Cisplatin

Die Detektion erfolgt durch 1:1 Zugabe des Caspase 3/7 Reagenz pro Well.

Um die Caspaseaktivität unabhängig von der Zellzahl pro Well zu bestimmen, wurde zusätzlich der Cell Titer Glo analog durchgeführt.

Anschließend wurde ein normiertes Ergebnis mit Hilfe von Excel generiert.

2.2.6. Proteinanalyse

Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung wurden zunächst die jeweiligen Zelllinien passagiert und in einem T-25 Gefäß ausgesät und 48 bis 72 h inkubiert.

Zur Isolierung wurde ein Protein-Lysis-Puffer („Ripa Art“) angesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 150 µL Lysis-Puffer hinzugegeben. Ab Zeitpunkt der Zugabe wurden die Zellen auf Eis gelagert, um eine Denaturierung zu verhindern.

Mit Hilfe eines *Soft Plastik Scrapers* wurde der Gefäßboden intensiv abgekratzt, um die freigesetzten Proteine und Zellreste zu sammeln. Der Inhalt des Gefäßes wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Inhalt wurde 30 min auf Eis gelagert und zwischendurch stark gevortext.

Da es sich bei Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) um ein Kernprotein handelt, wurden zur stärkeren mechanischen Aufbereitung die Proben zusätzlich sonifiziert. Pro Probe wurde dreimal je 30 Sekunden bei einer Amplitude von 30 % sonifiziert.

Anschließend wurden die Proben in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4° Celsius und 277 G für 10 min zentrifugiert. Der Inhalt wurde anschließend in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80° Celsius gelagert.

Proteingehaltbestimmung mittels BCA-Test

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der vorher isolierten Proteine wurde ein BCA Kit der Firma Pierce™ verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Anleitung (Pierce® BCA Protein Assay Kit – Reduction Agent Compatible, Instructions; 2023).

Ausgewertet wurde der Proteingehalt photometrisch mit Hilfe des *iMark Microplate Readers*. Der Proteingehalt wird in µg/µL angegeben.

Western Blot

Zur Darstellung des Proteinniveaus wurde ein Western Blot durchgeführt.

Die Prozentigkeit des Trenngels wurde abhängig von der Proteingröße ausgewählt (siehe Tabelle 15). Das Sammelgel wurde mit einem Spacer für zehn Taschen bestückt.

Protein	**Größe (kDa)**	**Trenngel Prozentigkeit**
NAMPT	55	10%
GSR	50	10%
TOP2A	174	8%
Trop 2	35	12%
Nectin 4	~ 63	12%

Tabelle 15: **Verwendete Prozentigkeit des Trenngels der zu detektierenden Proteine** (zusätzliche Angabe der Proteingröße in kDa = Kilodalton). (NAMPT = Nikotinamidphosphoribosyltransferase, GSR = Glutathionreduktase, TOP2A = Topoisomerase 2 alpha, TROP2 = *Trophoblast Cell-Surface Antigen 2*)

Eine Probe wurde nach folgendem Schema für ein Gesamtvolumen von 20 µL hergestellt:

- 20 µg Protein
- 4x Roti® Load
- ad 20 µL Lyse-Puffer (*RIPA-Lysis-Buffer*)

Die Proben wurden in einer Minispin-Zentrifuge kurz anzentrifugiert anschließend für fünf Minuten bei 95° Celsius denaturiert, erneut zentrifugiert und auf Eis gelagert.

In der Zwischenzeit wurde eine Elektrophorese Kammer vorbereitet. Die Gele wurden in eine Kammer gespannt, welche mit Running Buffer gefüllt war (siehe Medien und Puffer). Zur Bandenorientierung wurde eine Tasche mit 7 µL Proteinmarker beladen (#26616, Thermo Scientific). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 100 V. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Auftrennung bei 200 V für 60 bis 100 Minuten, je nach Molekulargewicht des Proteins.

Zur Vorbereitung der Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF Membran) wurde diese zunächst eine Minute in Methanol, dann eine Minute in Millipore Wasser und zum Schluss fünf Minuten in Blotting Buffer eingelegt.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Gele für den Blot vorbereitet. In einer Schale mit Blotting Buffer wurden die Einzelkomponenten übereinander gelegt: Zwei Whatman Papiere, PVDF Membran, Gel, zwei Whatman Papiere. Anschließend wurde dies in die Blotting Kammer transferiert. Die Proteine wurden für 30 Minuten bei 25 Volt auf die PVDF Membran mittels *Semidry* Methodik übertragen.

Nach Abschluss des Übertragungsvorganges wurden die Membranen kurz in TBS-T gewaschen und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem 50 mL Röhrchen mit 5 %igem Milchpulver geblockt (siehe Medien und Puffer). Der erste Antikörper wurde, je nach Angabe des Herstellers (siehe Tabelle 2), hinzugefügt und über Nacht bei 4° Celsius auf einem Roller inkubiert (wahlweise auch eine Stunde bei Raumtemperatur).
Um den überschüssigen Antikörper zu entfernen wurden die Membranen vier Mal für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach Ende des Waschvorgangs wurde der zweite Antikörper (Anti-Maus oder Anti-Kaninchen) für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1 %iger Milch inkubiert. Danach erfolgt ein erneuter Waschvorgang.
Zur Detektion wurde das *Chemi Doc Imaging System* der Firma Bio Rad verwendet. Als Chemolumineszenz-Reagenz wurde das Super Signal West Pico Pierce der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangabe. Als Ladekontrolle des Proteingehaltes wurde Vinculin verwendet.

2.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung auf Signifikanz der MTT-Kombinationsexperimente nach Vorbehandlung und simultaner Therapie, sowie der Caspase-Testung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism und Excel. Durchgeführt wurden hierfür t-Tests. Verglichen wurden jeweils die Kontrollgruppe mit der jeweiligen Intervention, sowie der Vergleich von Einzelbehandlung mit Kombination. Unterschieden wurde in drei Signifikanzniveaus: * $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$.

3. Ergebnisse

3.1. Abundanz der Zielproteine in Zelllinien

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde mittels Proteinmassenspektrometrie in LTTs im Vergleich zu parentalen Zellen verstärkt vorliegende Proteine ermittelt. Mittels *siRNA-Knockdown* konnte festgestellt werden, dass es bei diesen Proteinen eine funktionelle Relevanz zur Cisplatinresistenz gibt. Drei dieser Proteine ließen sich mit Hilfe von Inhibitoren pharmakologisch targetieren. Daher wurden diese Proteine als Zielproteine dieser Arbeit ausgewählt.

Um festzustellen, ob das Proteinniveau der Zielproteine in den LTTs verstärkt vorliegt, wurden Westernblots angefertigt. In den Westernblots wurden jeweils vier Zelllinienpaare, bestehend aus parentalen Zelllinien (T24, J82, 253J, RT112) und deren Cisplatin-resistenten Sublinien (LTTs), mit einer benignen uroepithelialen Zelllinie (HBLAK) verglichen (siehe Abb. 2). Nachgewiesen wurden die Proteine GSR, NAMPT und TOP2A. Als Ladekontrolle diente Vinculin.
Es zeigte sich, dass bei GSR und bei TOP2A in den LTTs ein deutlich verstärktes Proteinniveau vorliegt. Insbesondere bei den Zelllinienpaaren 253J und 253JLTT bei GSR und RT112 und RT112LTT bei TOP2A ließ sich eine deutlich stärkere Expression der Proteine bei den LTTs detektieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei NAMPT kein signifikanter Unterschied im Proteinniveau im Vergleich von parentaler Zelllinie und LTT. Bei der benignen Zelllinie HBLAK zeigte sich bei den drei Proteinen eine unterschiedliche Expression. Bei GSR und NAMPT war das Proteinniveau ungefähr äquivalent zu den parentalen Zelllinien und somit niedriger als bei den LTT Linien. Bei TOP2A war bei HBLAK kein Protein detektierbar. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass vor allem bei GSR und TOP2A das Proteinniveau in den LTTs erhöht exprimiert vorlag.

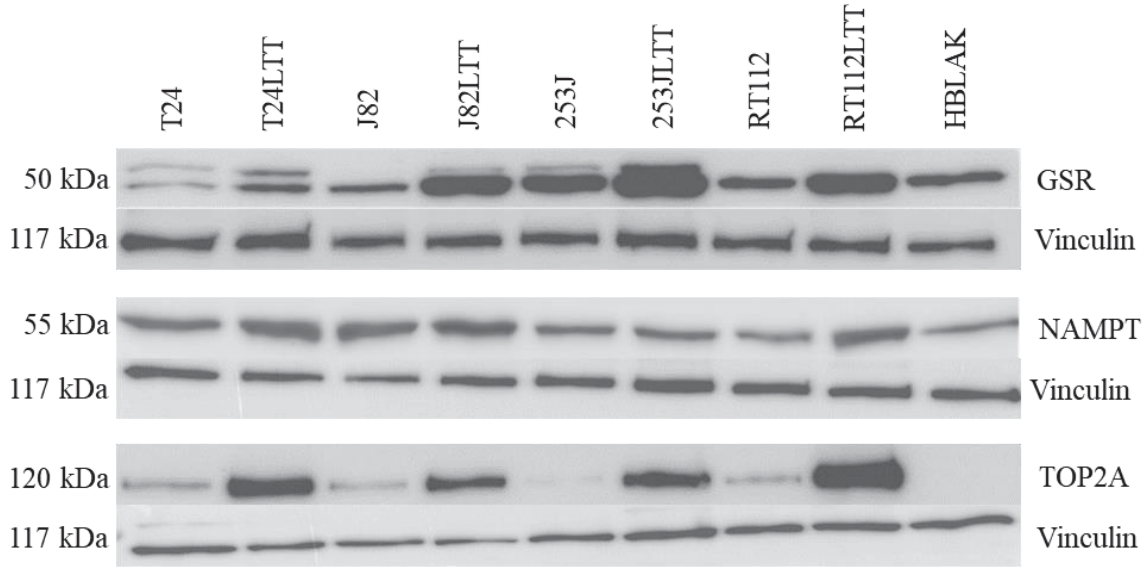

Abb. 2. **Westernblot-Ergebnisse der Zielproteine. Dargestellt wurden die Zielproteine GSR, NAMPT und TOP2A mit jeweils Vinculin als Ladekontrolle.** Verglichen wurden vier Zelllinienpaare, jeweils die parentalen Zelllinien und ihre Cisplatin-resistenten Sublinien (LTT), im Vergleich zur benignen uroepithelialen Zelllinie HBLAK.
(GSR = Glutathionreduktase (n = 4), NAMPT = Nikotinamidphosphoribosyltransferase (n = 4), TOP2A = Topoisomerase 2 alpha (n = 6), kDa = Kilodalton)

3.2. Viabilitätsmessung der Zellen unter inhibitorischer Behandlung der Zielproteine mittels MTT

3.2.1. MTT-Monotherapie

Daporinad

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren zu testen, wurden Viabilitätstestungen mittels MTT-Test durchgeführt. Im Folgenden zeigt sich die Viabilitätsdarstellung der Zelllinienpaare T24 und T24LTT, J82 und J82LTT und 253JLTT und RT112LTT unter Behandlung mit Daporinad (siehe Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5). Daporinad wurde als Inhibitor der Nikotinamidphosphoribosyltransferase (NAMPT) eingesetzt. Dafür wurden die Zellen mit aufsteigender Dosis des Inhibitors behandelt und die Viabilität mittels MTT gemessen. Die Viabilitätsreduktion wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufgezeigt.
Um die Annahme aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu testen, dass die LTTs eine erhöhte NAMPT-Expression aufweisen und somit vulnerabler gegenüber Daporinad sein könnten als die parentalen Zellen, wurden beide Zelllinien mit der gleichen Dosierung behandelt und die Viabilität verglichen. Im Versuch mit T24 und T24LTT wurden Daporinad-Dosispunkte von 0,5 nM bis 10 nM verwendet. Als Kontrollpunkt und zur Normierung diente eine DMSO-Kontrolle. Bereits ab einer Dosierung von 0,5 nM zeigte sich eine deutlich stärkere Viabilitätsreduktion um 10 % bei den LTTs. Im Vergleich dazu fast keine Reduktion bei den parentalen Zellen. Bei einer Dosierung von 1 nM wurde die Zellviabilität der T24LTT bereits auf 10 % der Ausgangsmenge reduziert und bei 1,5 nM zeigten sich kaum noch viable Zellen. Im Vergleich dazu, zeigte sich bei T24 bei einer Dosierung von 1 nM nur eine Reduktion der Viabilität um ca. die Hälfte und erst bei 2 nM eine Reduktion auf ca. 10 %, und somit ein Annähern beider Kurvenverläufe. Bei einer Dosierung von 10 nM ließ sich bei beiden Zelllinien keine Viabilität mehr nachweisen (siehe Abb. 3).
Im Versuch mit J82 und J82LTT zeigte sich ein Unterschied im Vergleich zu T24 und T24LTT. Im folgenden Versuch wurden Dosierungen von 2,5 nM bis 10 µM verwendet. Im Vergleich zu T24 und T24LTT reagierte J82LTT deutlich schwächer auf Daporinad als J82. Bereits in einem Dosisbereich ab 2,5 nM wurde die Viabilität der parentale Zellinie deutlich stärker reduziert als die der LTT. Dieser Unterschied zeigte sich vor allem bei 5 nM, wo die Viabilität von J82 fast doppelt so stark eingeschränkt war wie J82LTT. Über den gesamten Kurvenverlauf ließ sich erkennen, dass J82LTT

nicht so sensitiv auf Daporinad reagierte wie T24LTT. Bei einer Dosierung von 10 µM zeigten sich bei beiden Zelllinien nur noch ca. 15 % der Ausgangsviabilität. Es war somit keine vollständige Dezimierung der Zellen möglich (siehe Abb. 4). Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass vor allem die T24LTT deutlich vulnerabler auf die Behandlung mit Daporinad reagierte als die T24. Bei der J82 und J82LTT ließ sich dieses Phänomen nicht nachweisen. Das J82 Paar war weniger sensitiv gegenüber Daporinad als das T24 Paar. Dies lässt sich auch anhand der ermittelten IC_{50} Werte aus Tabelle 16 entnehmen.

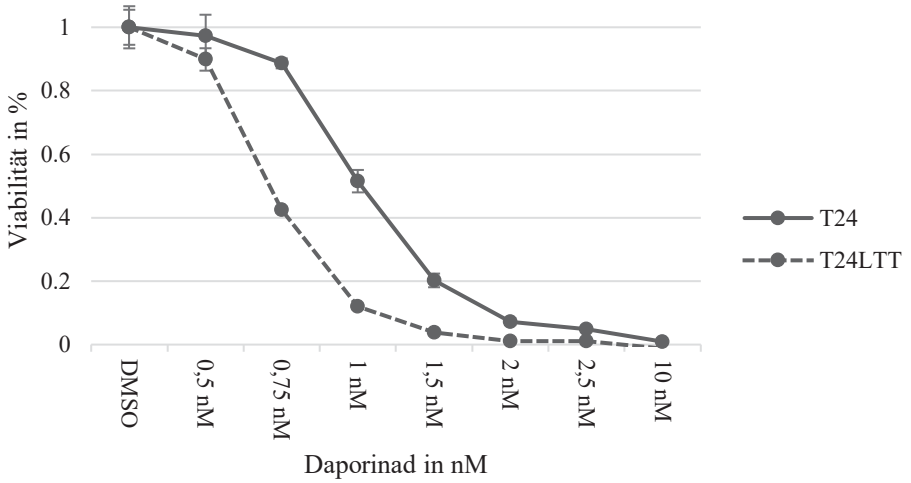

Abb. 3. **Dosiswirkungskurve mit den Zelllinien T24 und T24LTT unter Behandlung mit Daporinad.** Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 0,5 nM bis 10 nM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Daporinad. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar)

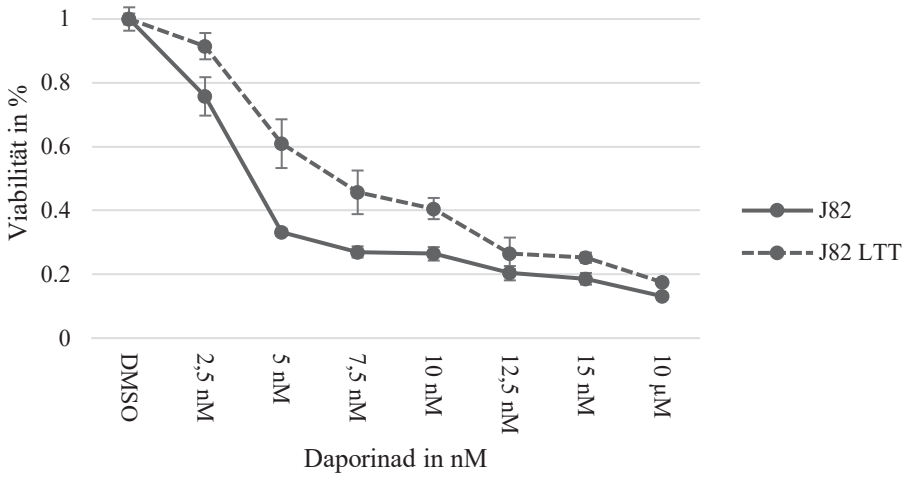

Abb. 4. **Dosiswirkungskurve mit den Zelllinien J82 und J82LTT unter Behandlung mit Daporinad**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 2,5 nM bis 10 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Daporinad. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Um für nachfolgende Kombinationsversuche von Daporinad mit Cisplatin mehr LTTs als nur T24LTT und J82LTT verwenden zu können, erfolgten noch weitere Viabilitiätsmessungen der Zelllinien 253JLTT und RT112LTT mit Daporinad (siehe Abb. 5). Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen mit T24/T24LTT und J82/J82LTT waren hier ähnlich hohe Dosierungen von Daporinad nötig, wie bei J82LTT. Der gewählte Dosisbereich lag hier zwischen 10 nM und 10 µM. Bei beiden Zelllinien (253JLTT und RT112LTT) zeigte sich bei einer Dosierung von 10 nM eine Reduktion der Ausgangszellviabilität auf ca. 55 %. Im Dosierungsbereich von 10 bis 25 nM zeigte sich bei beiden Zelllinien keine merkliche Viabilitätsreduktion. Die Reduktion um die Hälfte der Ausgangsviabilität wurde bei 253JLTT bei ca. 15 nM und bei RT112LTT bei ca. 20 nM erreicht. Auch eine Erhöhung der Dosis auf 10 µM konnte bei beiden Zelllinien keine vollständige Dezimierung der Zellviabilität erreichen. Im Vergleich zu T24LTT waren bei RT112LTT und bei 253JLTT der ermittelte IC_{50} um bis zu 10 nM höher. Verglichen mit J82LTT handelte es sich um einen ähnlichen Dosisbereich des IC_{50}.

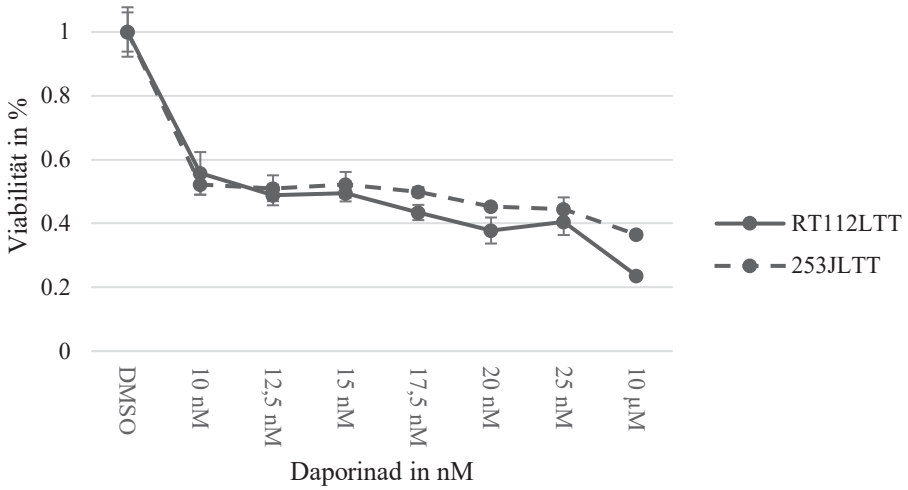

Abb. 5. **Dosiswirkungskurve mit den Zelllinien RT112LTT und 253JLTT unter Behandlung mit Daporinad.** Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 10 nM bis 10 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Daporinad. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Um die Toxizität des Wirkstoffes auf benigne Zellen zu testen, wurde zusätzlich die Zellviabilität von HBF und HBLAK unter Daporinadbehandlung getestet (siehe Abb. 6, Abb. 7).
Gewählt wurden die Dosierungen abhängig von dem niedrigsten gewählten Dosispunkt bei T24LTT. Bei HBLAK wurde ein Dosierungsintervall von 0,5 nM bis 10 µM gewählt und bei HBF von 1 nM bis 10 µM.
Bei HBLAK zeigte sich bei aufsteigender Dosierung ein kontinuierlicher Rückgang der Zellviabilität von 100 % auf ca. 45 % bei einer Dosierung von 2,5 nM. Ab 2,5 nM zeigte sich eine weniger starke Abnahme der Viabilität auf ca. 35-40 %. Ab 100 nM und auch bei 10 µM zeigte sich keine weitere Abnahme der Zellviabilität (siehe Abb. 6).
Bei HBF zeigte sich bei einer Dosierung von 1 nM noch keine Viabilitätsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Erst bei einer Dosierung von 5 nM zeigte sich eine steile Viabilitätsreduktion auf ca. 25 %. Bei einer Dosissteigerung auf 10 nM ließ sich die Zellviabilität um weitere 10 %, also auf ca. 15 % reduzieren. Ab einer Dosis von 25 nM, bis hin zu den 10 µM, zeigte sich keine weitere Viabilitätsreduktion. Die maximal erreichte Viabilitätsreduktion bei der Behandlung von HBF mit Daporinad betrug ca. 90 % des Ausgangswertes.
Somit zeigte sich zwar eine toxische Wirkung von Daporinad auf die benignen Zellen, doch waren im Vergleich zu T24LTT mindestens um 2 nM höhere Dosierungen nötig um eine Reduktion der

Viabilität um die Hälfte zu erreichen. Zusätzlich ließ sich sowohl bei HBLAK, als auch bei HBF, auch bei einer Dosis von 10 µM keine vollständige Viabilitätsreduktion erreichen.

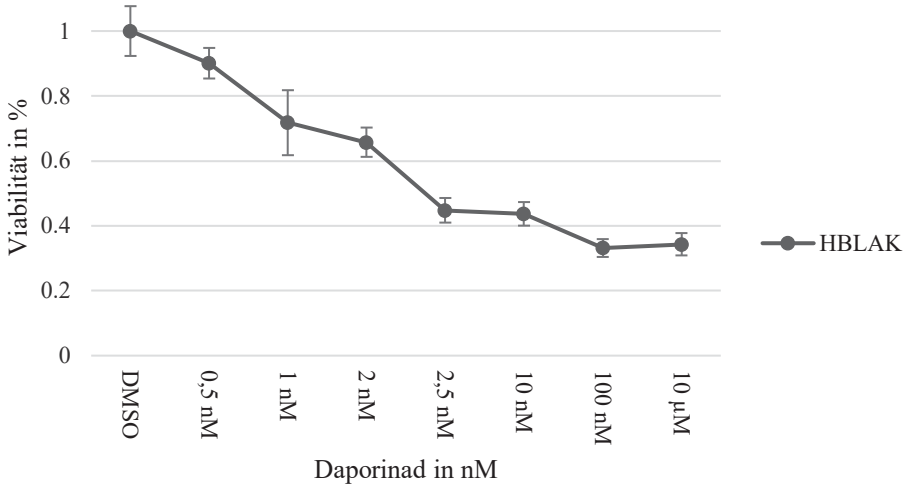

Abb. 6. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBLAK unter Behandlung mit Daporinad.** Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 0,5 nM bis 10 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Daporinad. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

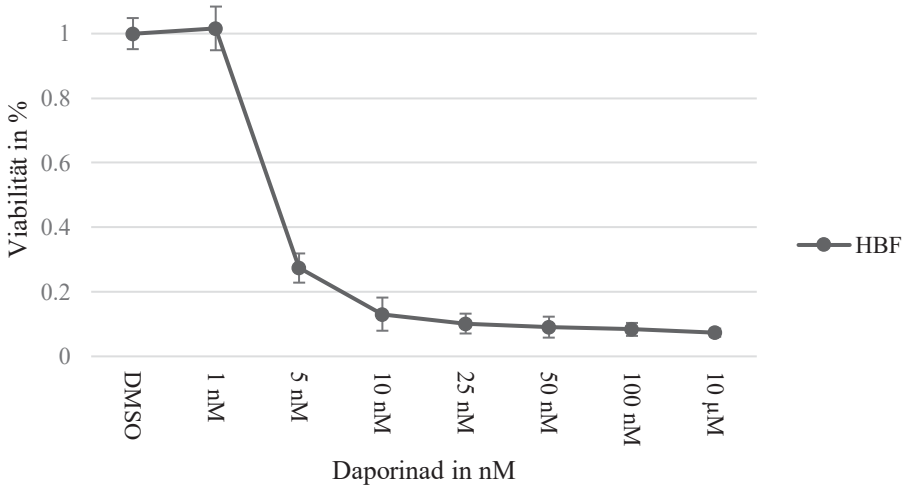

Abb. 7. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBF unter Behandlung mit Daporinad.** Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 1 nM bis 10 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von

Daporinad. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Doxorubicin

Um die Wirksamkeit von Doxorubicin zu testen, wurde erneut eine Viabilitätstestung mittels MTT-Test durchgeführt. Doxorubicin wurde als Inhibitor für Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) eingesetzt. Im Folgenden zeigt sich die Viabilitätsdarstellung der Zelllinienpaare T24 und T24LTT, J82 und J82LTT und 253JLTT und RT112LTT unter Behandlung mit Doxorubicin (siehe Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10). Um die Toxizität des Wirkstoffes auf normale Zellen zu testen, wurde zusätzlich die Zellviabilität von HBF und HBLAK unter Doxorubicinbehandlung getestet (siehe Abb. 11, Abb. 12). Dafür wurden die Zellen mit aufsteigender Dosierung des Inhibitors behandelt und die Viabilität mittels MTT gemessen. Die Viabilitätsreduktion wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufgezeigt.

Um die Annahme zu testen, dass die LTTs eine erhöhte Topoisomerase 2 alpha Expression aufweisen und somit vulnerabler gegenüber Doxorubicin sein sollten als die parentalen Zellen, wurden beide Zelllinien mit der gleichen Dosierung behandelt und die Viabilität verglichen.
Bei der Behandlung des Zelllinienpaars T24 und T24LTT wurde eine Dosierungsintervall von 5 nM bis 1 µM gewählt. Verglichen und normiert wurde die Behandlung mit einer Mediumskontrolle. Bereits ab einer Dosierung von 5 nM zeigte sich ein deutlich sensitiveres Ansprechen von T24LTT als von T24. Im Verlauf der Dosissteigerung wurde die Viabilität von T24LTT mehr als doppelt so stark reduziert wie die von T24. Ab 100 nM reagierte das Paar gleich sensitiv und ab 1 µM Doxorubicin wurde die Viabilität bei beiden auf 0 % reduziert (siehe Abb. 8).
Dieses Verhalten der Zellen ließ sich ebenfalls im Versuch mit J82 und J82LTT darstellen (siehe Abb. 9). Wie auch im Versuch mit Daporinad benötigten die Zellen allerdings deutlich höhere Dosen Doxorubicin als die T24/T24LTT. Bei einer maximalen Dosis ließ sich die Viabilität außerdem nicht auf 0 % reduzieren. Das Dosierungsintervall wurde ebenfalls von 5 nM bis 1 µM gewählt.
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl bei dem T24, als auch dem J82 Zelllinienpaar, die LTTs vulnerabler auf die Behandlung mit Doxorubicin reagierten als die parentalen Zellen. Die J82LTT schien allerdings weniger empfindlich als die T24LTT (siehe Abb. 8, Abb. 9).

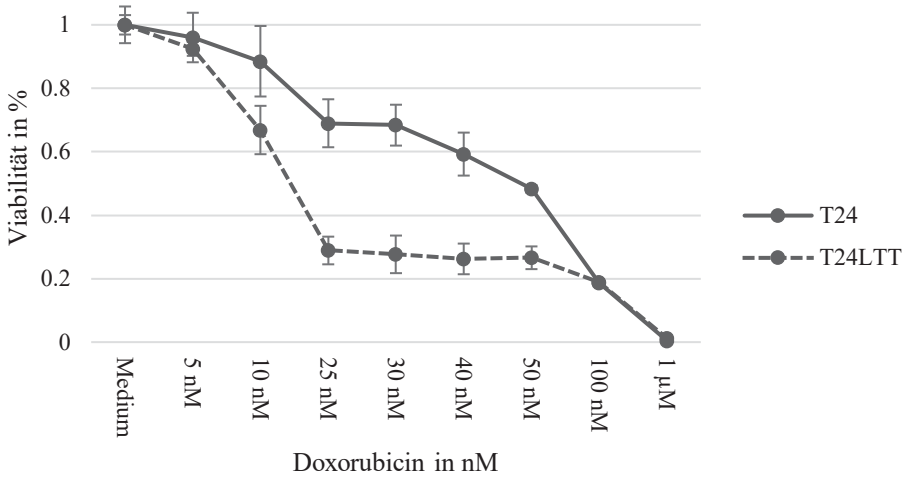

Abb. 8. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinien T24 und T24LTT unter Behandlung mit Doxorubicin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 5 nM bis 1 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Doxorubicin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

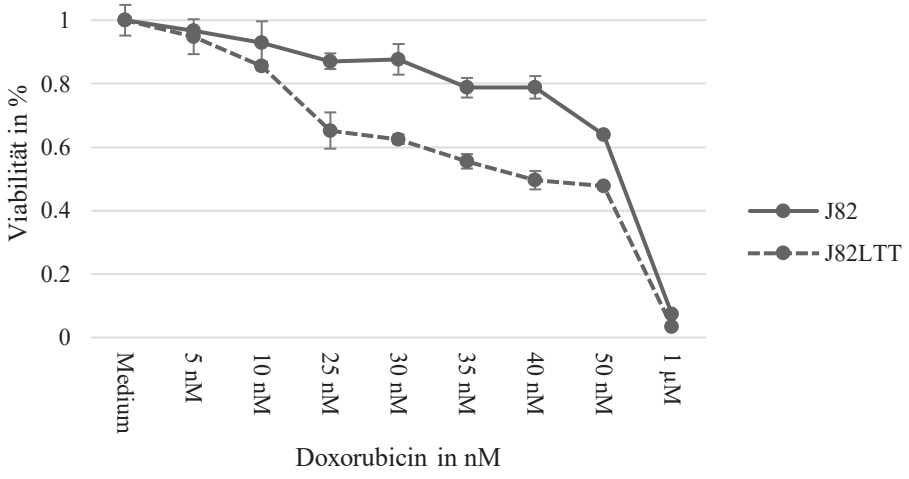

Abb. 9. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinien J82 und J82LTT unter Behandlung mit Doxorubicin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 5 nM bis 1 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Doxorubicin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Anschließend wurde eine Viabilitätstestung mittels MTT mit den Zelllinien 253JLTT und RT112LTT durchgeführt (siehe Abb. 10). In Vorversuchen zeigte sich, dass beide Zelllinien weniger sensibel auf Doxorubicin reagierten als T24LTT und J82LTT. Deshalb wurde das Dosierungsintervall von 75 nM bis 2 µM gewählt (vgl. Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10). Bei beiden Zelllinien zeigte sich ein konstanter Abfall der Zellviabilität in Abhängigkeit zu steigender Dosis. Eine vollständige Dezimierung konnte erst bei Dosierungen ab 2 µM erreicht werden.
Im Vergleich zu T24LTT und J82LTT waren deutlich höhere Dosierungen von Nöten, um eine Reduktion der Viabilität um die Hälfte zu erreichen. Für T24LTT und J82LTT betrug die halbletale Dosis zwischen 20 nM und 40 nM, wohingegen bei RT112LTT und 253JLTT Dosierungen im Bereich zwischen 150 nM und 250 nM verwendet werden mussten.

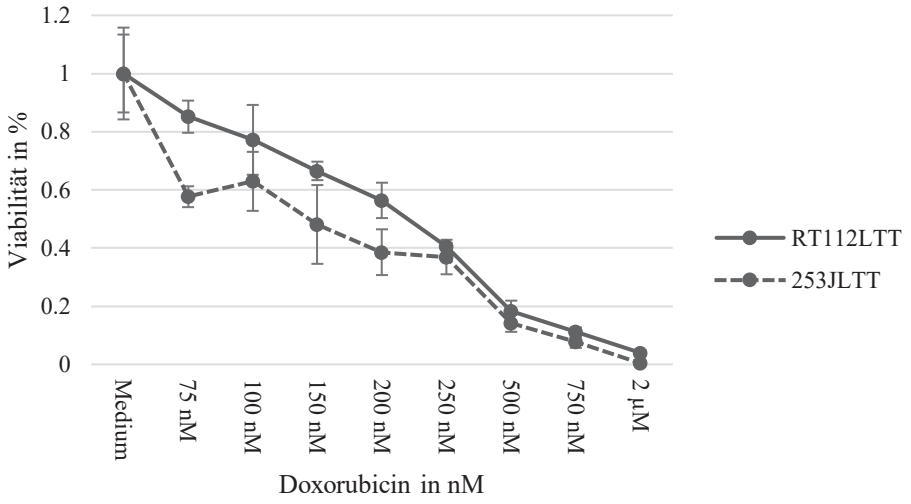

Abb. 10. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinien RT112LTT und 253JLTT unter Behandlung mit Doxorubicin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 75 nM bis 2 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Doxorubicin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Um nun die Toxizität von Doxorubicin für benigne Zellen darstellen zu können, wurden HBLAK und HBF Zellen mit Doxorubicin behandelt und die Viabilität mittels MTT-Test gemessen. Gewählt wurden die Dosierungen abhängig von dem niedrigsten gewählten Dosispunkt bei T24LTT. Bei HBLAK wurde ein Dosierungsintervall von 5 nM bis 1 µM gewählt und bei HBF von 10 nM bis 5 µM.
Bei HBLAK zeigte sich ein konstanter Abfall der Zellviabilität (siehe Abb. 11). Bei einer Dosis von 30 nM, also ca. 6 nM über der halbletalen Dosis von Doxorubicin auf T24LTT (siehe Tabelle 16),

betrug die Viabilität von HBLAK noch ca. 55 %. Bei einer Dosis von 1 µM waren keine viablen Zellen mehr vorhanden.

Bei HBF zeigte sich ebenfalls ein konstanter Abfall der Viabilität, doch wirkten die Zellen weniger vulnerabel als HBLAK. Erst bei einer Dosis von 50 nM wurde die Anzahl viabler Zellen auf ca. 50 % reduziert (siehe Abb. 12). Bei einer Dosis von 10 nM betrug die Viabilität immer noch ca. 45 %. Dies waren 15 % mehr als die Viabilität bei HBLAK war an diesem Dosispunkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Doxorubicin die benignen Zellen weniger vulnerabel reagierten als T24LTT. Im Vergleich zu den anderen drei LTTs waren sie vulnerabler.

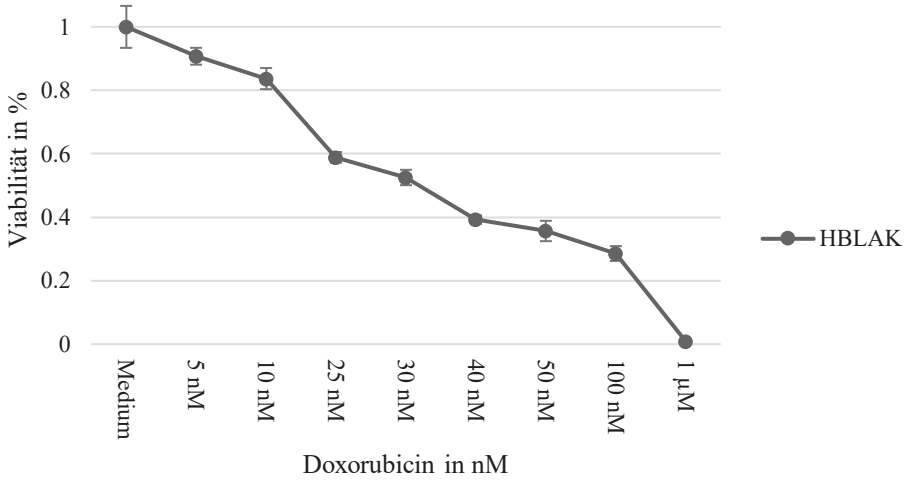

Abb. 11. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBLAK unter Behandlung mit Doxorubicin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 5 nM bis 1 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Doxorubicin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

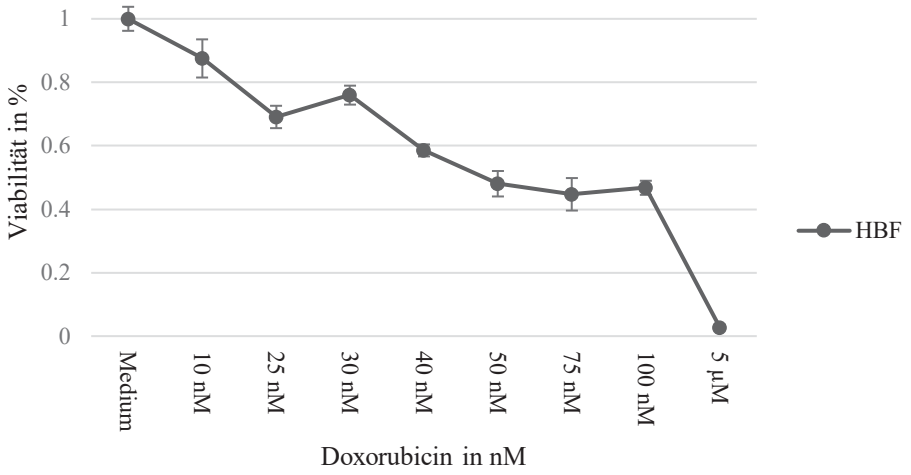

Abb. 12. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBF unter Behandlung mit Doxorubicin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 10 nM bis 5 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Doxorubicin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

2-AAPA

Als letzter inhibitorischer Wirkstoff wurde 2-AAPA als Glutathionreduktaseinhibitor (GSR) getestet. Dies erfolgte ebenfalls mittels MTT-Viabilitätsmessung. Im Folgenden zeigt sich die Viabilitätsdarstellung der Zelllinienpaare T24 und T24LTT, J82 und J82LTT unter Behandlung mit 2-AAPA (siehe Abb. 13, Abb. 14). Um die Toxizität des Wirkstoffes auf normale Zellen zu testen, wurde ebenfalls die Zellviabilität von HBF und HBLAK unter Behandlung mit 2-AAPA getestet (siehe Abb. 15, Abb. 16). Dafür wurden die Zellen mit aufsteigender Dosierung des Inhibitors behandelt und die Viabilität mittels MTT gemessen. Die Viabilitätsreduktion wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufgezeigt.

Sowohl bei der Behandlung mit dem Paar T24 und T24LTT, als auch mit J82 und J82LTT zeigte sich ein deutlich schlechteres Ansprechen der LTTs auf die Behandlung als bei den parentalen Zellen (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Zudem waren, im Vergleich zu den Behandlungen mit Daporinad und Doxorubicin, deutlich höhere Dosen im mikromolaren Bereich nötig, um einen Effekt zu erzielen.
Beim T24 Paar zeigten sich bei der parentalen Zelllinie bereits ab 25 µM keine viablen Zellen mehr, wohingegen bei der LTT erst bei 50 µM keine Viabilität mehr detektierbar war.
Bei J82 und J82LTT war der Verlauf und der Vulnerabilitätsunterschied zwischen den beiden Paaren weniger eindeutig. Bei beiden Zelllinien zeigte sich ein mehr oder weniger gleich konstanter Abfall

der Viabilität bei höherer Dosis. Bei einer maximalen Dosis von 50 µM war bei beiden Paaren noch Restviabilität zu messen.

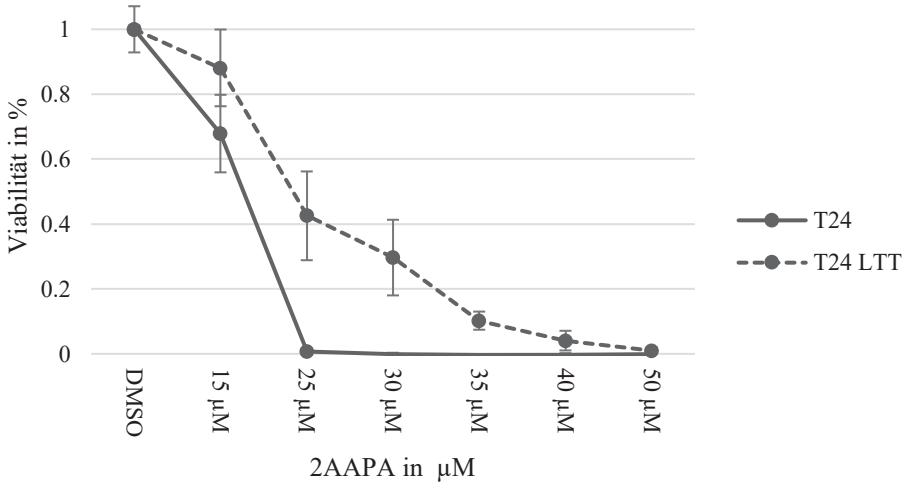

Abb. 13. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinien T24 und T24LTT unter Behandlung mit 2-AAPA**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 15 µM bis 50 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von 2-AAPA. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (µM = Mikromolar)

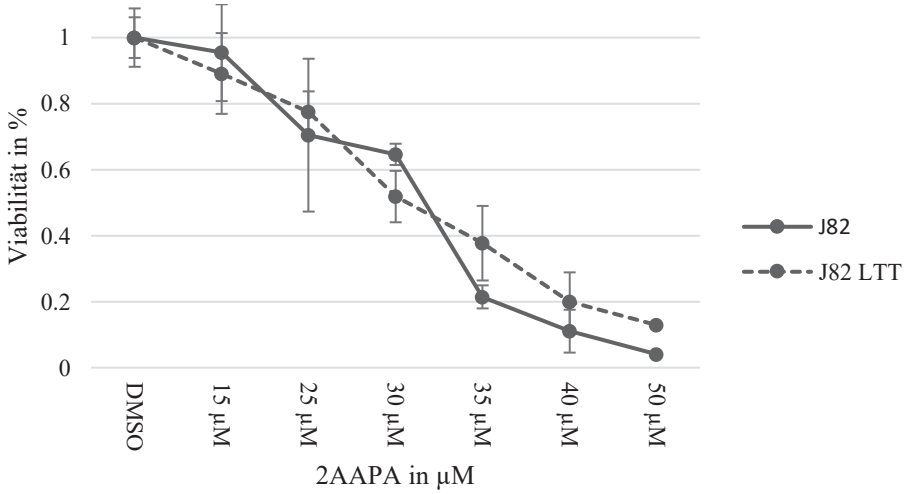

Abb. 14. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinien J82 und J82LTT unter Behandlung mit 2-AAPA**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 15 µM bis 50 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der

behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von 2-AAPA. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (µM = Mikromolar)

Analog wurde eine Viabilitätstestung mit HBLAK und HBF durchgeführt.
Bereits zu Beginn zeigte sich vor allem bei HBLAK, dass diese Zellen deutlich vulnerabler auf 2-AAPA reagierten (siehe Abb. 15). Schon bei einer Dosierung von 500 nM wurde die halbletale Dosis bereits überschritten und nur noch ca. 40 % Restviabilität konnte detektiert werden. Somit ist eine ca. 1000-fach geringere Konzentration nötig, um bei HBLAK einen ähnlichen Effekt wie bei T24LTT erreichen zu können (vgl. Abb. 13). Bei 2 µM konnte keine Restviabilität mehr erfasst werden.
Die Zellen der Linie HBF zeigten sich bis zu einer Dosis von 1 µM deutlich widerstandsfähiger. Bis zu dieser Dosis zeigte sich keine Reduktion der Viabilität. Bei Erhöhung der Dosis zeigte sich ein steiler Rückgang der Viabilität bis bei 10 µM keine Restviabilität mehr detektiert werden konnte (siehe Abb. 16).

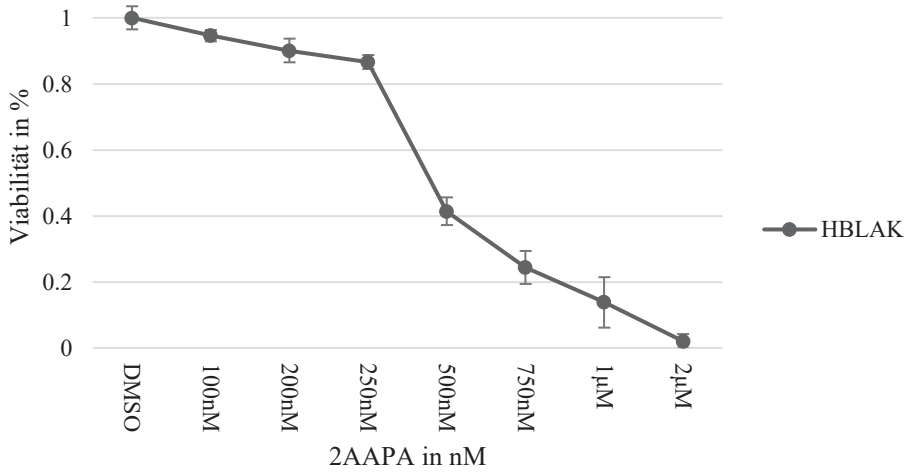

Abb. 15. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBLAK unter Behandlung mit 2-AAPA**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 100 nM bis 2 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von 2-AAPA. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

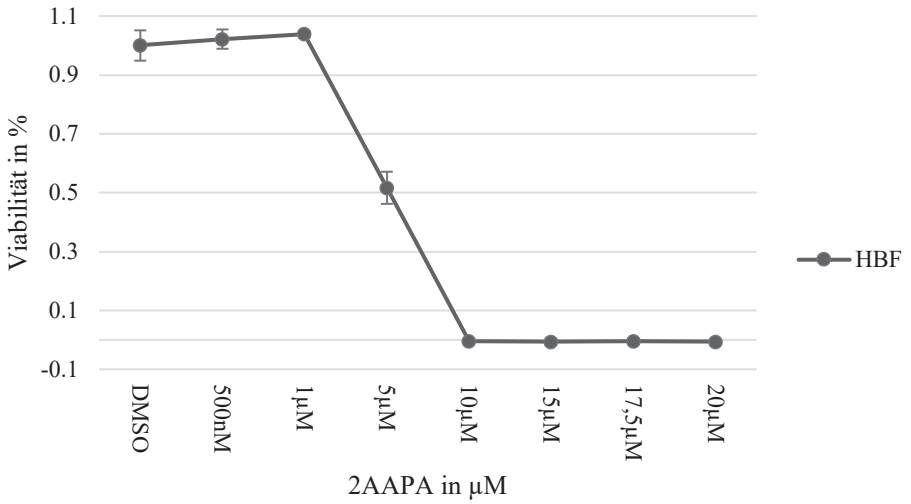

Abb. 16. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBF unter Behandlung mit 2-AAPA**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 500 nM bis 20 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von 2-AAPA. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 2-AAPA ein durchaus sehr potenter Wirkstoff für benigne Zelllinien ist, bei Tumorzellen allerdings erst in deutlich höheren Dosierungsbereichen einen wirksamen Effekt zeigte. Da dieser Effekt allerdings genau das Gegenteil von dem war, was erzeugt werden sollte, wurde eine Behandlung mit 2-AAPA nicht in den weiterführenden Experimenten fortgesetzt.

Bestimmung der HBF Cisplatinsensitivität

Die Zelllinie HBF wurde für diese Doktorarbeit erstmals in der Arbeitsgruppe verwendet. Um für die folgenden Kombinationsversuche herausfinden zu können, wie sensitiv HBF auf Cisplatin reagieren würde, wurde eine MTT-Viabilitätstestung unter Cisplatin-Behandlung durchgeführt (siehe Abb. 17). Das Dosierungsintervall wurde bewusst groß gewählt, um alle möglichen Punkte abdecken zu können.

Bei Verwendung von 100 nM ließ sich bereits ein deutlicher Rückgang der Zellviabilität, auf ca. 75 %, detektieren. Bei Verwendung von 500 nM Cisplatin wurde die Zellviabilität bereits auf die Hälfte des Ausgangswertes reduziert. Ab 10 µM gab es keine Restviabilität mehr.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass HBF Zellen sehr sensitiv auf eine Cisplatin-Behandlung reagierten.

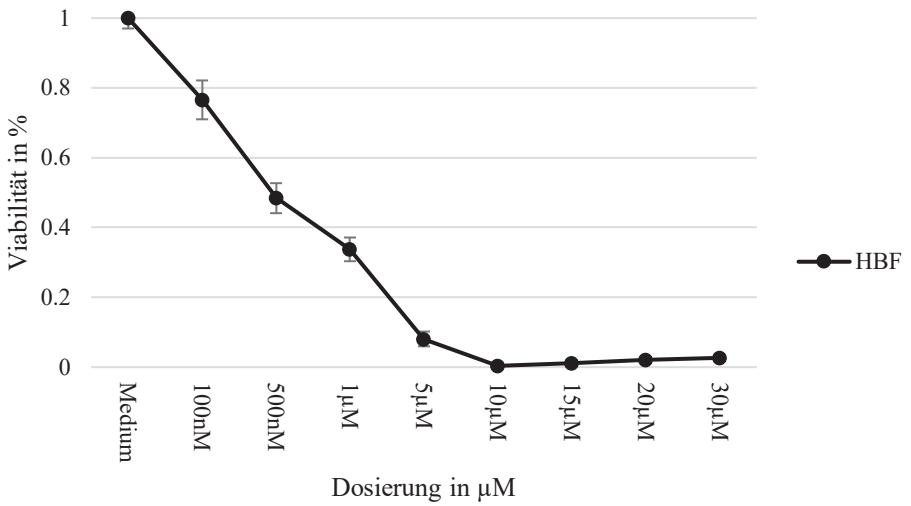

Abb. 17 **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBF unter Behandlung mit Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinie im Dosisbereich von 100 nM bis 30 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit Medium. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Cisplatin. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde zweimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

3.2.2. Berechnung der halbletalen Dosis anhand der MTT Tests

Mit Hilfe der durch MTT-Viabilitätstestung generierten Dosiswirkungskurven wurden über GraphPad Prism die exakten halbletalen Dosispunkte (IC_{50}) für 72 h Behandlung berechnet. Diese wurden in der untenstehenden Tabelle im paarweisen Vergleich von parentaler Zelllinie und zugehöriger LTT und benigner Zelllinie aufgeführt (siehe Tabelle 16). Verwendet wurden die Zelllinien T24/T24LTT, J82/J82LTT, 253JLTT, RT112LTT, HBLAK und HBF.

	T24	**T24LTT**	**J82**	**J82LTT**	**253JLTT**	**RT112LTT**	**HBLAK**	**HBF**
Daporinad in nM	1,06	0,85	4,34	11,27	10,47	4,92	15	2,5
Doxorubicin in nM	57,4	23,7	76,5	39,7	140,9	151,5	37,5	50
2-AAPA in µM	18,6	26,92	27,85	28,74	/	/	0,45	5
Cisplatin in µM	/	70	/	18	83	250	5	0,5

Tabelle 16: **Halbletale Dosierungen der Testsubstanzen**. Angegeben bei den Zelllinien T24+T24LTT, J82+J82LTT, 253JLTT, RT112LTT, HBLAK und HBF für Daporinad, Doxorubicin, 2-AAPA und Cisplatin. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

3.2.3. Kombinationsversuche von Inhibitoren mit Cisplatin

Dosis-Wirkungs-Kurven unter Cisplatinbehandlung nach Inhibitor-Vorbehandlung

Nach Ermittlung der Wirksamkeit der Inhibitoren auf die LTTs, wurden Kombinationsversuche aufgesetzt. Ziel war es bei dem Versuch mit Vorbehandlung eine mögliche Resensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin hervorzurufen.

Um eine mögliche Dosisreduktion von Cisplatin durch Resentivierung der Zellen experimentell darstellen zu können, wurde eine MTT-Viabilitätsmessung unter Behandlung mit Cisplatin durchgeführt. Als Tumorzelllinien wurden dafür T24LTT und J82LTT verwendet (siehe Abb. 18). Um die Normaltoxizität im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem Inhibitor und Cisplatin darzustellen, wurden HBLAK Zellen analog untersucht (siehe Abb. 19). Die Zellen wurden über 48 h jeweils mit der halbletalen Dosis der Inhibitoren Daporinad bzw. Doxorubicin behandelt. Als Kontrollgruppe diente eine mit DMSO behandelte Zellgruppe. Im zweiten Versuchsteil wurden die über 48 h vorbehandelten Zellen mit Cisplatin behandelt. Die Cisplatin-Behandlung erfolgte auf einer 96-Well-Platte über 72 h. Im aufgeführten Graph zeigt sich die Viabilitätsmessung nach Cisplatin-Behandlung.

Sowohl bei T24LTT als auch bei J82LTT zeigte sich in allen drei Gruppen ein Rückgang der Zellviabilität, allerdings keine vollständige Dezimierung der Zellpopulationen. Im Fall von T24LTT zeigte sich über den gesamten Kurvenverlauf nach Vorbehandlung mit Daporinad und Doxorubicin ein stärkerer Rückgang der Zellviabilität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dieser war signifikant stärker nach Daporinad Vorbehandlung mit einem p-Wert < 0,01 (ausgenommen 85 µM und 125 µM mit $p < 0,05$). Ein signifikant stärkerer Rückgang der Zellviabiliät nach Vorbehandlung mit Doxorubicin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ließ sich nicht nachweisen. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit Daporinad konnte die halbletalen Cisplatin Dosis signifikant auf circa 75-85 µM verringert werden. Im Vergleich dazu war die halbletale Dosis ohne Vorbehandlung circa 110 µM. Mit Doxorubicin ließen eine Reduktion der halbletalen Dosis auf circa 85-100 µM erreichen (Abb. 18 a).

Im Fall von J82LTT zeigte sich über den gesamten Verlauf keine signifikante Differenz zwischen den Vorbehandlungen mit Daporinad und Doxorubicin im Vergleich zur DMSO- Kontrollgruppe (siehe Abb. 18 b).

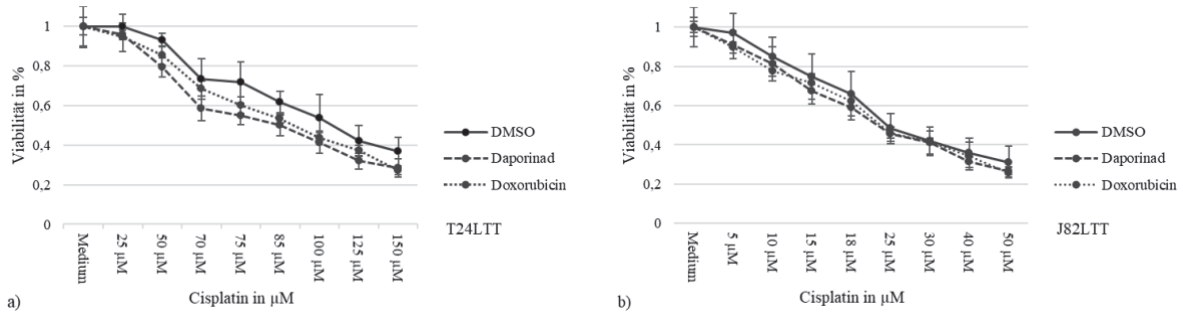

Abb. 18. **Cisplatin Dosiswirkungskurven für Zelllinien nach Vorbehandlung mit Daporinad bzw. Doxorubicin über 48h**. Die Viabilität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Dargestellt ist die Behandlung mit Cisplatin im µM Bereich. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Cisplatin in µM. Die Diagrammaufteilung erfolgt nach Zelllinie: a) T24LTT mit der Cisplatindosierung von 25 µM bis 150µM, b) J82LTT mit der Cisplatindosierung von 5 µM bis 50 µM. Die Unterschiede zwischen DMSO-Kontrolle und Daporinad-Vorbehandlung bei der Zelllinie T24LTT waren signifikant (50 µM $p < 0,01$; 70 µM $p < 0,01$; 75 µM $p < 0,001$; 85-125 µM $p < 0,05$). Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (µM = Mikromolar)

Um herauszufinden, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit anschließender Cisplatin-Behandlung eine höhere Toxizität für benigne Zellen hat, wurde das Experiment mit HBLAK Zellen durchgeführt (siehe Abb. 19). Eine verstärkte Reduktion der Zellviabilität der mit Daporinad oder Doxorubicin vorbehandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe, würde für eine stärkere Toxizität sprechen. Die Zellen wurden mit Dosispunkten von 1 µM bis 50 µM Cisplatin behandelt. Es zeigte sich eine starke Reduktion der Zellviabilität mit vollständiger Dezimierung der Zellpopulationen. Allerdings zeigte sich äquivalent zu J82LTT (siehe Abb. 18 b)) keine merkliche Differenz zwischen den drei Gruppen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass es durch sequenzielle Kombinationsbehandlung nur bei T24LTT aber nicht bei J82LTT einen erkennbaren Vorteil gibt. Allerdings ist die Toxizität der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu alleiniger Cisplatin-Behandlung nicht erhöht.

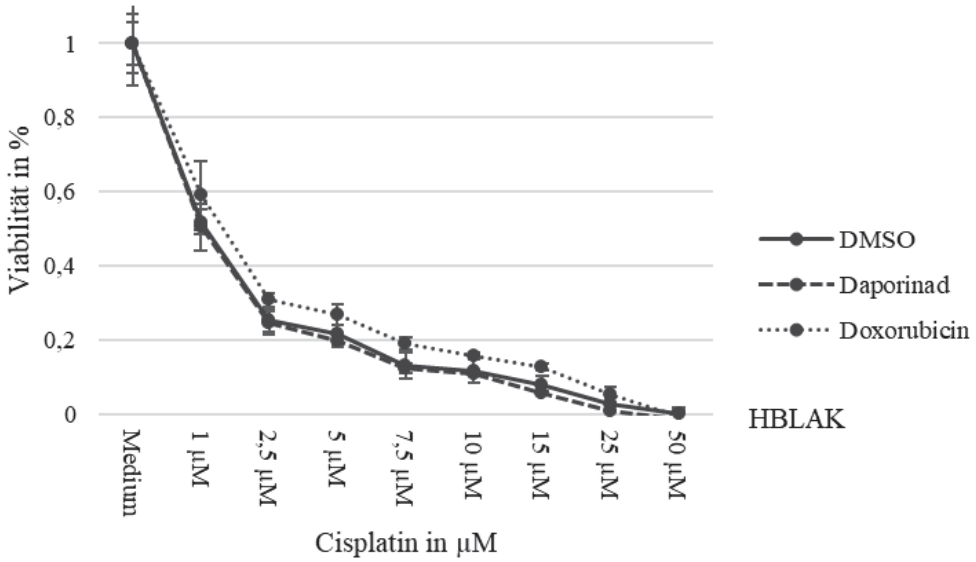

Abb. 19. **Cisplatin Dosiswirkungskurven der Viabilittätstestung der Zelllinien nach Vorbehandlung mit Daporinad bzw. Doxorubicin**. Die Viabilität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Dargestellt ist die Behandlung mit Cisplatin im µM Bereich. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Cisplatin in µM. Bei der dargestellten Zelllinie handelt es sich um die HBLAK Zelllinie mit den Dosispunkte von 1 µM bis 50 µM. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (µM = Mikromolar)

Simultane Behandlung mit Inhibitor und Cisplatin

Um zu testen, ob möglicherweise durch simultane Behandlung synergistische Effekte zwischen Cisplatin und den Inhibitoren hervorgerufen werden können, erfolgte eine entsprechende Kombinationsbehandlung. Dafür wurden die Zelllinien T24LTT, J82LTT, 253JLTT und RT112LTT mit einer Kombination aus Cisplatin und Daporinad bzw. Doxorubicin in aufsteigender Dosis behandelt. Gewählt wurden hierfür jeweils Vielfache der halbletalen Dosis der jeweiligen Zelllinie. Die halbletalen Dosispunkte wurden für Daporinad und Doxorubicin in vorherigen Experimenten berechnet (siehe Tabelle 16). Die Dosispunkte für Cisplatin wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ermittelt. Gemessen wurde die Viabilitätsreduktion erneut mittels MTT-Test. Es erfolgte eine Behandlung in drei Gruppen: eine Behandlung mit Cisplatin, eine Behandlung mit Daporinad bzw. Doxorubicin und eine Behandlung als Kombination aus Cisplatin und Daporinad bzw. Doxorubicin. Das Ergebnis wurde in drei Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Die verwendeten Dosierungen lassen sich aus Tabelle 16 ablesen.

In der Monotherapie zeigte sich Daporinad, vor allem bei T24LTT, als sehr potenter Wirkstoff zur Reduktion der Zellviabilität. Deshalb wurde zunächst eine Kombination mit Cisplatin und Daporinad durchgeführt. Bei T24LTT und bei RT112LTT zeigte die Kombination einen deutlichen Vorteil gegenüber den jeweiligen Einzelbehandlungen. Es zeigte sich eine deutlich stärkere viabilitätsreduzierende Wirkung insbesondere zwischen der 0,5- und 1-fachen halbletalen Dosis (siehe Abb. 20, Abb. 23). Bei 253JLTT zeigte sich nur ein Vorteil gegenüber der alleinigen Cisplatin-Behandlung. Bei J82LTT zeigte sich kein Vorteil der Kombination.
Bei der Behandlung von T24LTT zeigte die Kombination sowohl einen Vorteil gegenüber der Daporinad- als auch der Cisplatin-Monobehandlung.

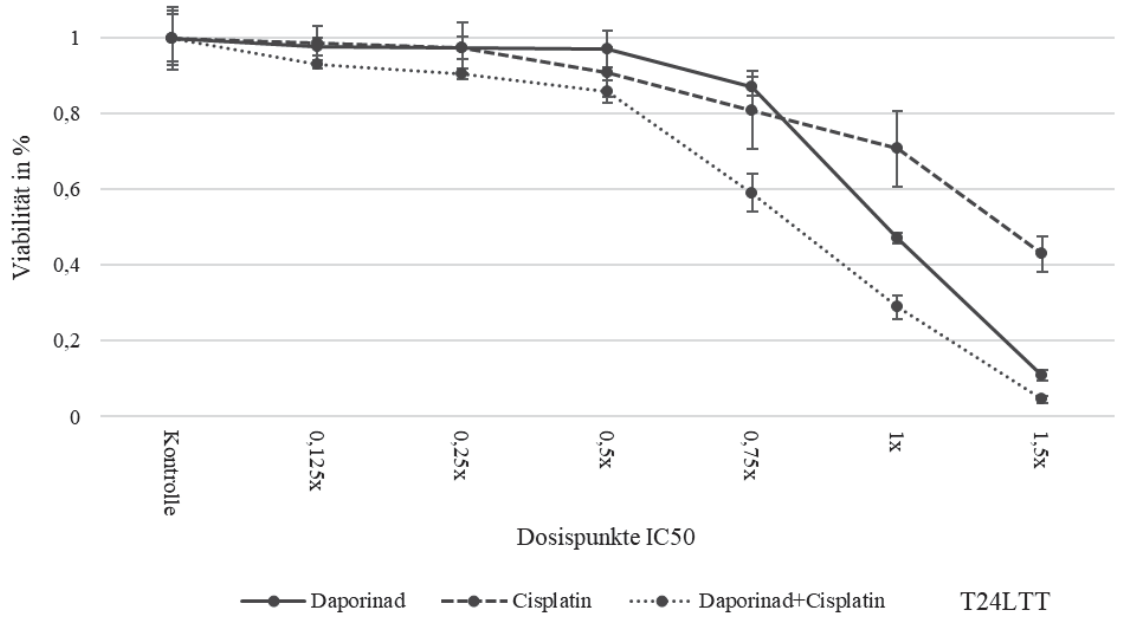

Abb. 20. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie T24LTT unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientierten. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei der Behandlung von J82LTT mit Cisplatin, Daporinad und der Kombination aus Cisplatin und Daporinad zeigte sich kein Unterschied zwischen allen drei Behandlungsoptionen (siehe Abb. 21). Es zeigte sich ein schlechteres Ansprechen der Zelllinie auf die Wirkstoffe.
Bei Verwendung der halbletalen Dosis ließ sich bei allen drei Gruppen eine Restviabilität von etwa 60 %, und bei dem 1,5-fachen der halbletalen Dosis von 50 % detektieren.

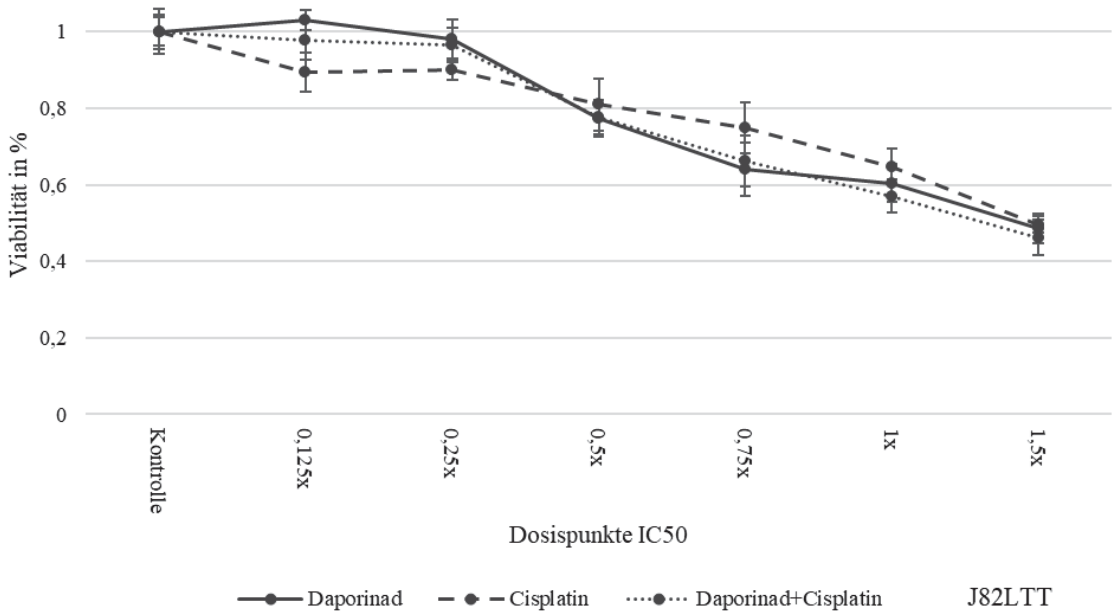

Abb. 21. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie J82LTT unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientierten. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei der Behandlung von 253JLTT mit Daporinad und Cisplatin, sowie der Kombination aus beiden, zeigte sich durch Behandlung mit der Kombination ein stärkerer Rückgang der Zellviabiliät im Vergleich zur Cisplatin-Monobehandlung. Ebenso wie bei T24LTT, zeigten sich diese Unterschiede ab einem Wert, welcher dem 0,5-fachen der halbletalen Dosis entspricht. Der Unterschied der viabilitätsreduzierenden Wirkung zwischen alleiniger Daporinad-Monobehandlung und der Kombination war nicht signifikant (siehe Abb. 22). Die Kombination zeigte somit bei 253JLTT keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Daporinad-Behandlung.

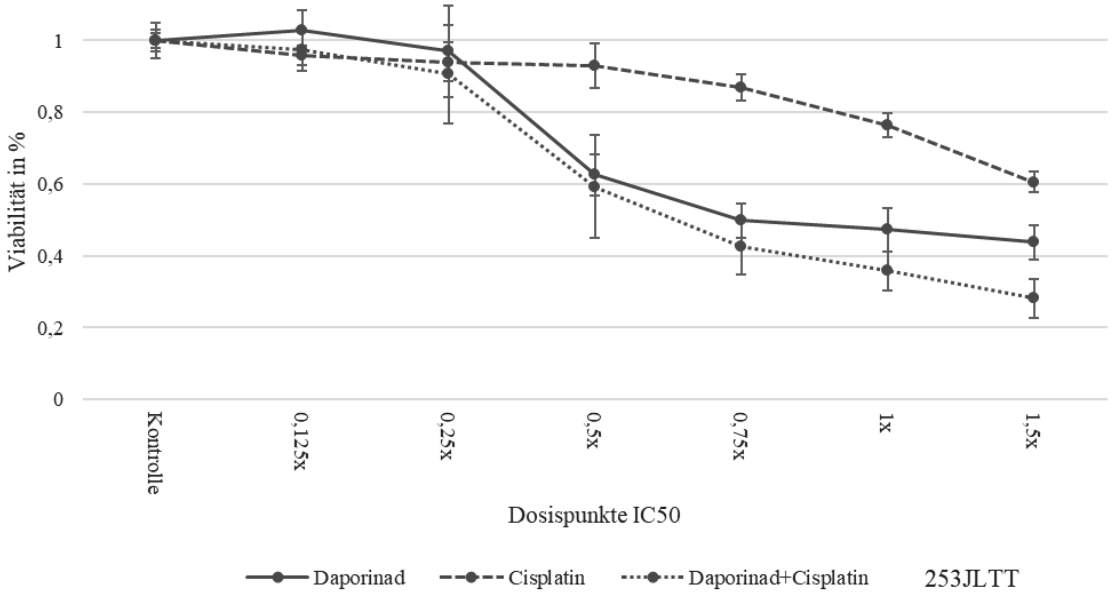

Abb. 22. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie 253JLTT unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientierten. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei Behandlung von RT112LTT zeigte sich im Vergleich zu den anderen Zelllinien die beste Wirkung. Die Kombination reduzierte die Zellviabilität bereits bei Verwendung des 0,125-fachen der halbletalen Dosis deutlich stärker als die jeweiligen Einzelbehandlungen (siehe Abb. 23). Zu beiden Einzelbehandlungen zeigte die Kombination einen signifikanten Vorteil ($p < 0,01$-$0,05$).

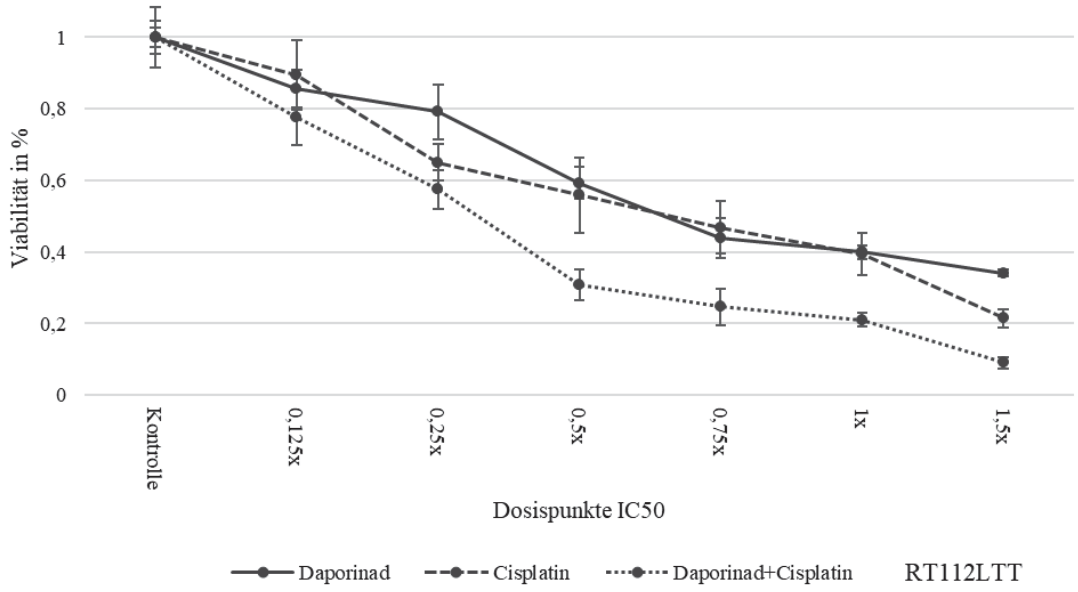

Abb. 23. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie RT112LTT unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientierten. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Somit lässt sich festhalten, dass die Kombination aus Daporinad und Cisplatin bei T24LTT, 253JLTT und RT112LTT einen deutlichen Vorteil gegenüber der Einzelbehandlung mit Cisplatin bietet. Bei J82LTT zeigte sich kein Vorteil. Bei T24LTT und RT112LTT bietet die Kombination zudem auch einen Vorteil gegenüber der Daporinad-Monobehandlung.

Im Vorversuch zeigte die Monotherapie der Zelllinien mit Doxorubicin bereits stärkere Unterschiede zwischen parentaler Zelllinie und LTT als bei Daporinad (siehe Seite 33). Bei T24LTT und J82LTT reagierten die Zellen deutlich sensitiver auf die Behandlung als ihre parentale Zelllinie. Um feststellen zu können, ob dieser positive Effekt auch Einfluss auf die Cisplatinsensitivität der Zellen hat, wurde im fortführenden Experiment die Kombinationsbehandlung mittels simultaner Behandlung durch Cisplatin und Doxorubicin analog durchgeführt.

Bei der Behandlung von T24LTT zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen allen drei Behandlungsgruppen (siehe Abb. 24). Bereits bei Verwendung der 0,25-fachen halbletalen Dosis konnte man bei der Kombinationsbehandlung eine deutlich stärkere Reduktion der Viabilität im

Vergleich zu den Monobehandlungen erkennen. Im Vergleich zur alleinigen Cisplatin-Behandlung zeigte sich die Kombination, ab Verwendung der 0,5-fachen halbletalen Dosis, signifikant effektiver ($p < 0,01$). Im Vergleich zur alleinigen Doxorubicin-Behandlung zeigte sich die Kombination bereits ab Verwendung der 0,25-fachen halbletalen Dosis signifikant effektiver ($p < 0,01$). Die Kombinationstherapie erreichte eine Reduktion der Zellviabilität auf 50 % bereits bei Verwendung der 0,25-fachen bis 0,5-fachen halbletalen Dosis. Mit Cisplatin-Monobehandlung konnte eine Reduktion der Zellviabilität auf 50 % erst bei Verwendung der 1,5-fachen halbletalen Dosis erreicht werden. Dies entspricht einem Dosisunterschied von circa 70 µM Cisplatin.

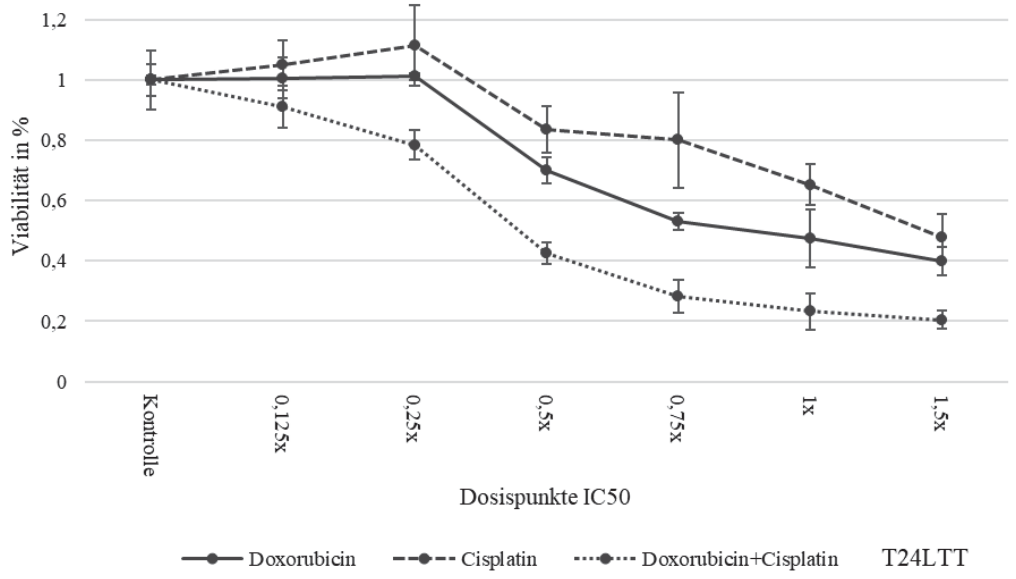

Abb. 24. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie T24LTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei der Behandlung von J82LTT zeigte sich, wie auch bei der Kombination von Daporinad und Cisplatin kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und somit kein Vorteil der Kombination gegenüber den Monobehandlungen (siehe Abb. 25). Insgesamt zeigte sich ein deutlich schlechteres Ansprechen der Zelllinie auf die Wirkstoffe als bei T24LTT (Vgl. siehe Abb. 24).

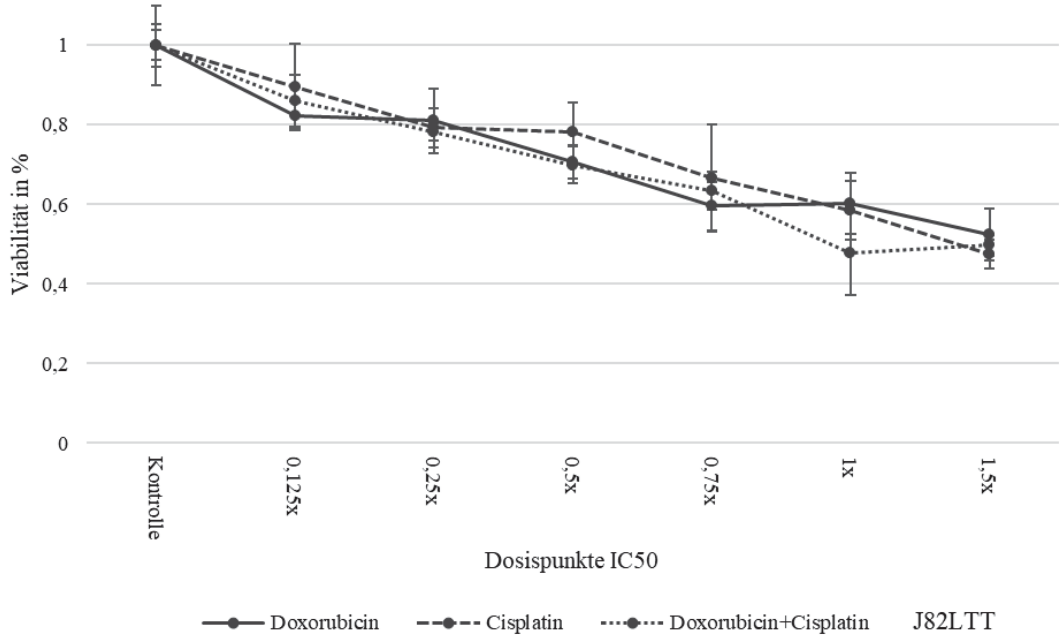

Abb. 25. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie J82LTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei der Behandlung von 253JLTT zeigte sich, ebenso wie bei der Behandlung von T24LTT eine deutlich stärkere Reduktion der Zellviabilität zu Gunsten der Kombinationsbehandlung (siehe Abb. 26). Ab Verwendung der 0,5-fachen halbletalen Dosis reduzierte sich die Ausgangsviabilität der Kombinationsbehandlung signifikant stärker ($p < 0,05$ bei 0,5-facher IC50, $p < 0,001$ ab 0,75-facher IC50) im Vergleich zur alleinigen Doxorubicin-Behandlung. Beim Vergleich von alleiniger Cisplatin-Behandlung zur Kombination zeigte sich bereits ab Verwendung der 0,125-fachen halbletalen Dosis eine signifikant ($p < 0,05$ bis 0,5-facher IC50; $p < 0,001$ ab 1-facher IC50) stärkere Reduktion der Zellviabilität bei Kombinationsbehandlung.

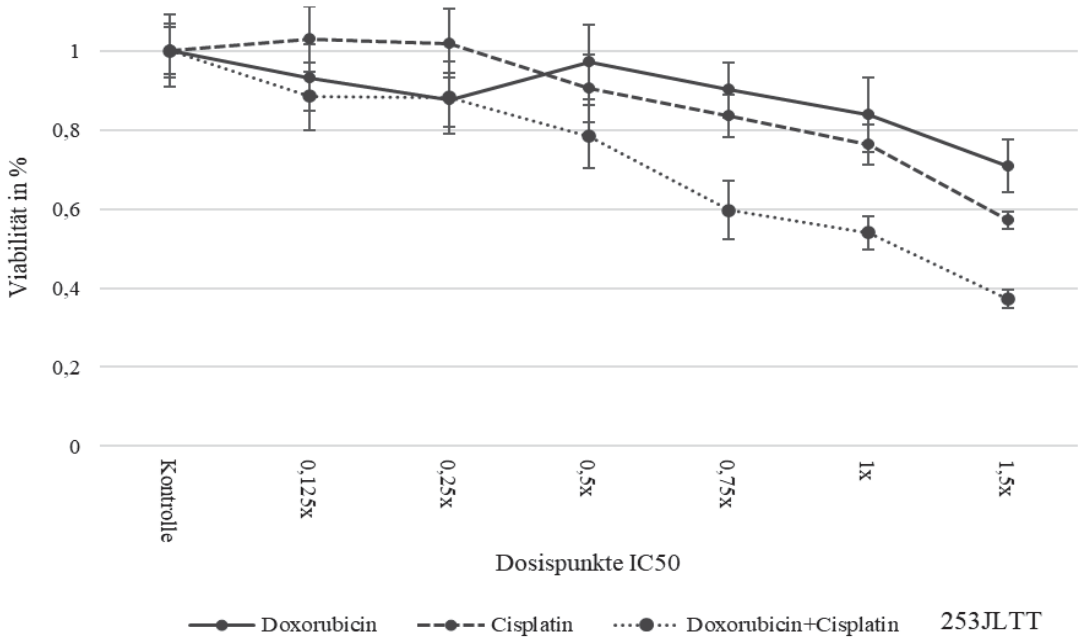

Abb. 26. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie 253JLTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei Behandlung von RT112LTT zeigte sich der stärkste Unterschied zwischen der Kombinationsbehandlung und den Einzelbehandlungen (siehe Abb. 27). Die Kombinationsbehandlung senkte die Zellviabilität ab der 0,25-fachen halbletalen Dosis signifikant ($p < 0,01$ 0,25-facher IC50; $p < 0,001$ ab 0,5-facher IC50) stärker als die alleinige Doxorubicin-Behandlung. Unter Cisplatin-Behandlung im Vergleich zur Kombination zeigte sich, ebenso wie bei 253JLTT, bereits ab Verwendung der 0,125-fachen halbletalen Dosis eine signifikant ($p < 0,05$) stärkere Reduktion der Zellviabilität unter Kombinationstherapie.

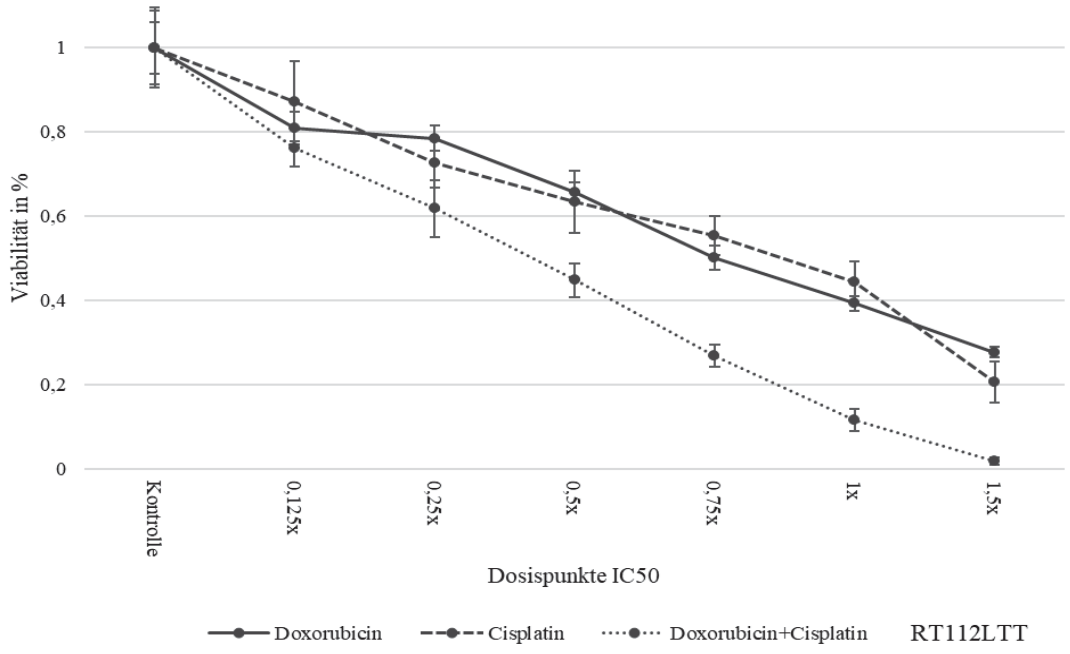

Abb. 27. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie RT112LTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Cisplatin**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Aus beiden Kombinationsbehandlungen lässt sich schlussfolgern, dass vor allem eine Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin einen deutlich stärkeren Rückgang der Zellviabilität hervorruft als die jeweiligen Einzelbehandlungen mit den Wirkstoffen. Dies lässt sich möglicherweise auf synergistische Effekte zwischen Doxorubicin und Cisplatin zurückführen. Die Kombination aus Daporinad und Cisplatin zeigte vor allem bei T24LTT und RT112LTT einen Vorteil, allerdings war dieser im Vergleich zur Doxorubicin und Cisplatin Kombination nicht so gravierend. Im Vergleich zur Daporinad-Monobehandlung war die Kombination effektiver.

Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob diese stärkeren positiven Effekte der Kombination an Tumorzellen, auch dafür sorgen könnten, dass die Kombination toxischer auf benigne Zellen wirkt. Dafür wurde die Kombinationsbehandlung ebenfalls an HBLAK und HBF durchgeführt.

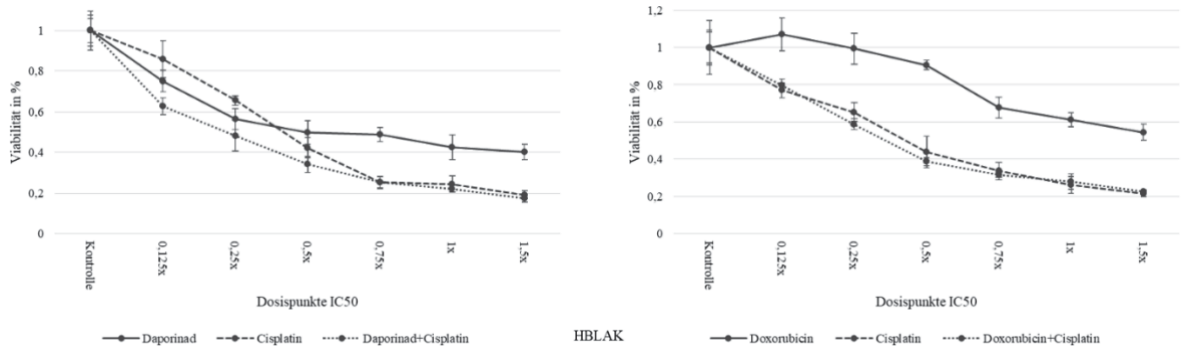

Abb. 28. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBLAK unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin (links) und Doxorubicin und Cisplatin (rechts)**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad bzw. Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-/Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-/Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei den Kombinationsbehandlungen von HBLAK zeigte sich sowohl bei der Kombination aus Daporinad und Cisplatin als auch von Doxorubicin und Cisplatin ein insgesamt deutlich stärkerer Rückgang der Zellviabilität im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Daporinad oder Doxorubicin (siehe Abb. 28). Insgesamt zeigte sich die Kombinationsbehandlung somit deutlich toxischer als die Monobehandlung mit Daporinad bzw. Doxorubicin, allerdings nicht toxischer als die alleinige Cisplatinbehandlung.

Es ließ sich also nachweisen, dass eine Kombination nicht toxischer auf HBLAK-Zellen wirkte als die Cisplatin-Monobehandlung.

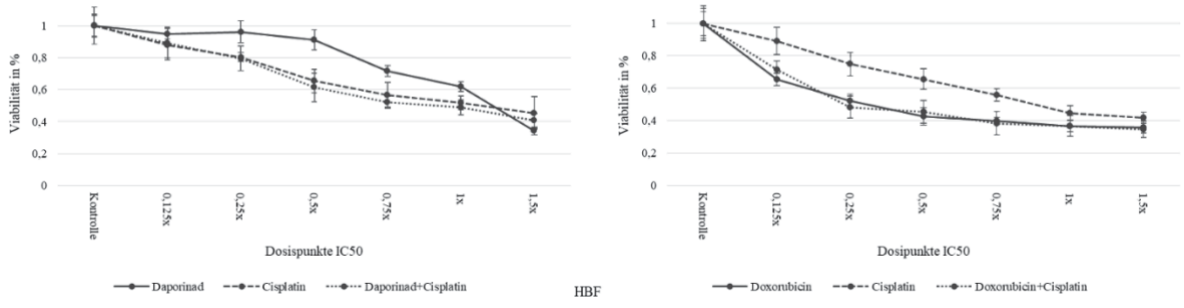

Abb. 29. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie HBF unter Kombinationsbehandlung mit Daporinad und Cisplatin (links) und Doxorubicin und Cisplatin (rechts)**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Daporinad bzw. Doxorubicin-, eine Cisplatin- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine DMSO-/Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-

/Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = halbletale Dosis)

Bei den Kombinationsbehandlungen von HBF zeigte sich ein ähnliches Verhalten zu der Behandlung von HBLAK (siehe Abb. 29).
Im Kombinationsfall von Daporinad und Cisplatin zeigte sich die Kombinationsbehandlung ähnlich toxisch, wie eine Cisplatin-Monobehandlung (siehe Abb. 29 links). Die Daporinad-Monobehandlung schien über Verlauf des Dosierungsintervalls weniger toxisch.
Im Kombinationsfall von Doxorubicin und Cisplatin zeigte sich die Cisplatin-Monobehandlung über das Dosierungsintervall initial weniger toxisch als die Doxorubicin- und Kombinationsbehandlung (siehe Abb. 29 rechts).
Es zeigte sich also auch bei HBF Behandlung, dass eine Kombinationsbehandlung von Inhibitor und Cisplatin keinen toxischeren Effekt aufwies als eine Einzelbehandlung mit einem der Wirkstoffe. Im Vergleich zu HBLAK zeigte sich allerdings, dass bei Verwendung der 1,5-fachen halbletalen Dosis kaum ein Unterschied zwischen allen drei Behandlungsoptionen bestand.

Synergistische Effekte durch simultane Kombination von Cisplatin und Inhibitor

Um feststellen zu können, ob durch die simultane Behandlung von Cisplatin mit dem jeweiligen Inhibitor synergistische antineoplastische Effekte aufgetreten sind, wurde eine CompuSyn Analyse mit den im MTT-Test gemessenen Viabilitätswerten durchgeführt. Die Software kann anhand komplexer Algorithmen berechnen, ob zwei Medikamente antagonistisch (CI > 1), additiv (CI = 1) oder synergistisch (CI < 1) aufeinander wirken (Chou & Talalay, 1984). Die *Fraction affected* (Fa), welche auf der Abszisse dargestellt ist, beschreibt den Rest an viablen Zellen bzw. den Teil an nicht mehr viablen Zellen. Eine Fa von 1 beschreibt, dass keine Restviabilität mehr vorhanden ist.

Bei drei der vier Cisplatin-resistenten Zelllinien ließ sich erkennen, dass die Effekte der Kombination von Daporinad und Cisplatin auf synergistische Effekte zurückzuführen waren. Bei T24LTT konnte ab Verwendung der 0,75-fachen halbletalen Dosis Synergie detektiert werden und bei RT112LTT über den gesamten Dosierungsbereich. Bei 253JLTT zeigten sich im Bereich von der 0,5-fachen bis zur 1-fachen halbletalen Dosis synergistische Effekte. Bei J82LTT ließ sich keine Synergie nachweisen. (siehe Abb. 31).

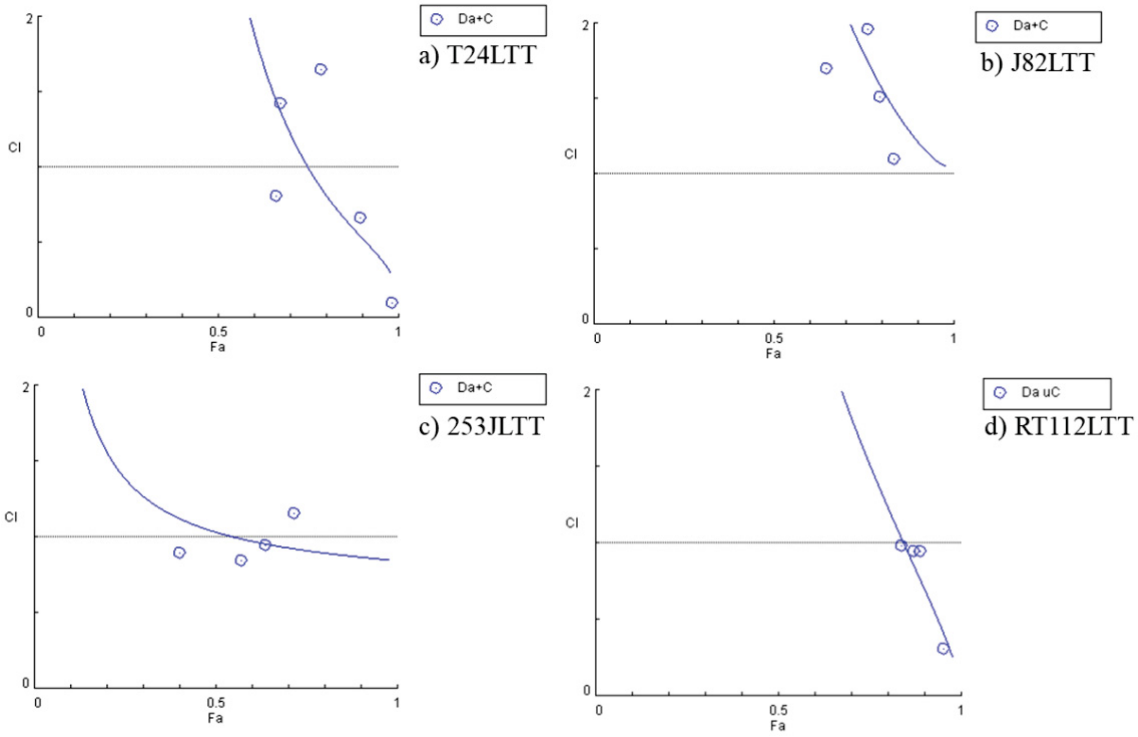

Abb. 30. ***Combination Index* Bestimmung mit Daporinad und Cisplatin**. Dargestellt ist die Synergietestung der Zelllinien a) T24LTT, b) J82LTT, c) 253JLTT, d) RT112LTT mit Hilfe von CompuSyn. Die Ordinate zeigt den *Combination Index* (CI) von 0 bis 2, wobei CI = 1 additive Effekte zeigen, CI > 1 antagonistische Effekte und CI < 1 synergistische Effekte. Die Abszisse zeigt die *Fraction Affected* (Fa) von 0 bis 1. (CI = *Combination Index*, Fa = *Fraction affected*, Da = Daporinad, C = Cisplatin)

Bei allen vier Cisplatin-resistenten Zelllinien ließ sich erkennen, dass die Effekte der Kombination von Doxorubicin und Cisplatin auf synergistische Effekte zurückzuführen waren. Bei T24LTT konnte ab Verwendung der 0,5-fachen halbletalen Dosis Synergie detektiert werden und bei RT112LTT ab Verwendung der 0,75-fachen halbletalen Dosis. Bei J82LTT und 253JLTT wurden über den gesamten Dosierungsbereich synergistische Effekte detektiert (Abb. 31). Ebenfalls von Bedeutung war, dass diese synergistischen Effekte sich vor allem in hohen Fa Bereichen abspielten, das heißt in dem Bereich, in dem die synergistischen Effekte bei dem Großteil der Tumorzellen zum Zelltod geführt haben bzw. das Wachstum inhibiert wurde.

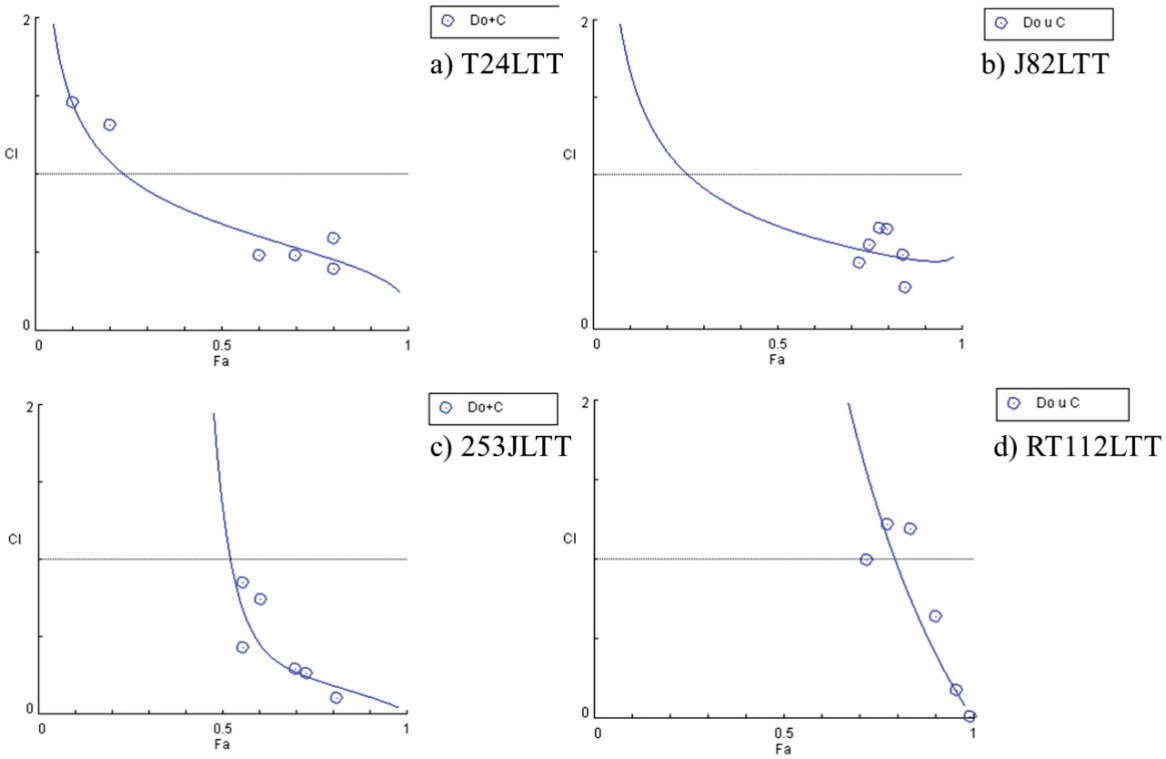

Abb. 31. ***Combination Index*** **Bestimmung mit Doxorubicin und Cisplatin**. Dargestellt ist die Synergietestung der Zelllinien a) T24LTT, b) J82LTT, c) 253JLTT, d) RT112LTT mit Hilfe von CompuSyn. Die Ordinate zeigt den *Combination Index* (CI) von 0 bis 2, wobei CI = 1 additive Effekte zeigen, CI > 1 antagonistische Effekte und CI < 1 synergistische Effekte. Die Abszisse zeigt die *Fraction Affected* (Fa) von 0 bis 1. (CI = *Combination Index*, Fa = *Fraction affected*, Do = Doxorubicin, C = Cisplatin)

Zum Vergleich wurde die Synergietestung ebenfalls bei beiden benignen Zelllinien HBLAK und HBF durchgeführt. Bei HBLAK ließen sich sowohl bei der Daporinad und Cisplatin Kombination, als auch bei der Doxorubicin und Cisplatin Kombination über den gesamten Dosierungsbereich synergistische Effekte nachweisen. Bei HBF konnten synergistische Effekte bei Daporinad und Cisplatin konstant erst ab Verwendung der 0,5-fachen halbletalen Dosis und bei Doxorubicin und Cisplatin erst ab Verwendung der 0,75-fachen halbletalen Dosis nachgewiesen werden (Abb. 32).

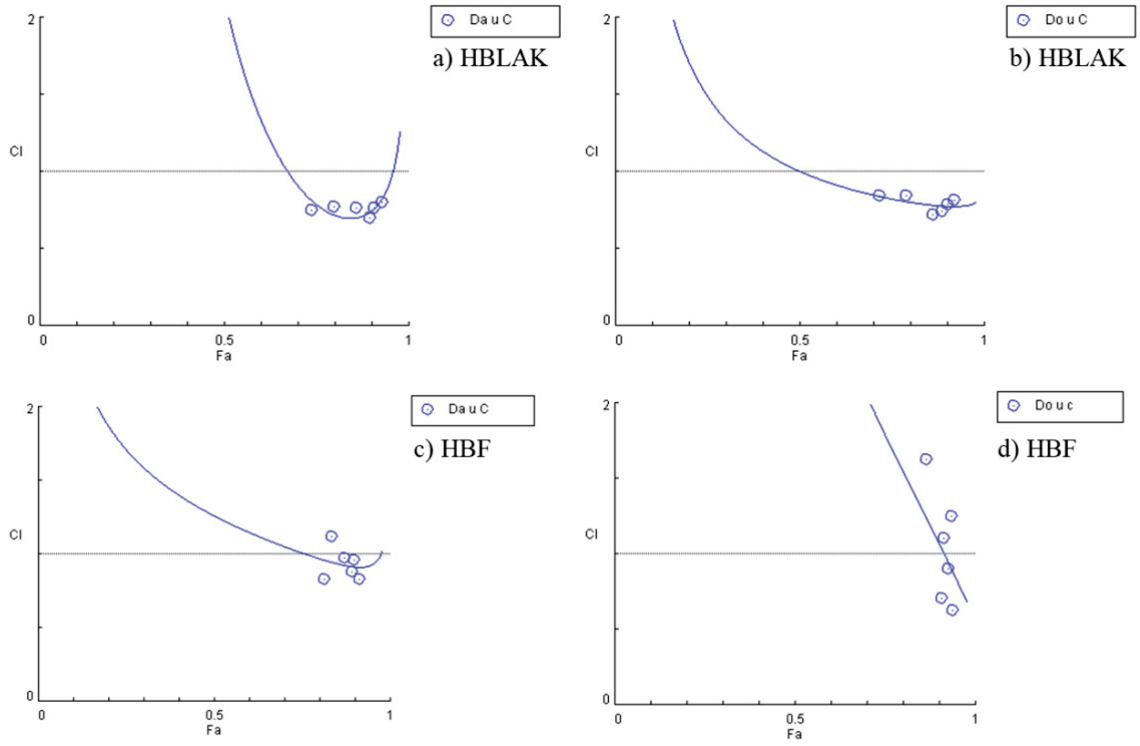

Abb. 32. ***Combination Index*** **Bestimmung mit Daporinad bzw. Doxorubicin und Cisplatin**. Dargestellt ist die Synergietestung der benignen Zelllinien a) und b) HBLAK und c) und d) HBF mit Hilfe von CompuSyn. Die jeweils linken Graphen zeigen die Testung von Daporinad und Cisplatin und die rechten die Testung von Doxorubicin und Cisplatin. Die Ordinate zeigt den *Combination Index* (CI) von 0 bis 2, wobei CI = 1 additive Effekte zeigen, CI > 1 antagonistische Effekte und CI < 1 synergistische Effekte. Die Abszisse zeigt die *Fraction Affected* (Fa) von 0 bis 1. (CI = *Combination Index*, Fa = *Fraction affected*, Da = Daporinad, Do = Doxorubicin, C = Cisplatin)

3.3. Die simultane Kombinationsbehandlung bewirkte stärkere Apoptoseinduktion

In den vorherigen Experimenten wurden mittels Viabilitätstestung mögliche synergistische Effekte der Kombination von Daporinad und Cisplatin und Doxorubicin und Cisplatin ermittelt. Um herausfinden zu können, ob eine Zelltodinduktion der Viabilitätsreduktion zu Grunde liegen könnte, wurde eine Messung der Caspaseaktivität durchgeführt. Bei hoher Caspaseaktivät wird von einer Apoptoseinduktion ausgegangen. Verwendet wurden die Zelllinien T24LTT, J82LTT und 253JLTT. Behandelt wurden die Zellen jeweils für 72 h mit der viertel- und halbletalen Dosis von Daporinad bzw. Doxorubicin, Cisplatin und der Kombination von Inhibitor und Cisplatin. Verglichen wurde die Caspaseaktivität mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. Im Fall bei Verwendung von Daporinad wurde diese Kontrollgruppe mit DMSO behandelt. Um die zellzahlunabhängige Caspaseaktivität messen zu können, wurde zusätzlich eine Viabilitätstestung mittels *Cell Titer Glo®-Assay*

durchgeführt. Die detektierte Caspaseaktiviät wurde hiermit über die Zellzahl in der Viabilitätstestung normiert. Verglichen wurden mittels Signifikanzniveaus der Unterschied zwischen Kontrolle und Kombination mit halbletaler Dosis und die jeweiligen Einzelbehandlungen mit halbletaler Dosis zur Kombination. Hochsignifikant (***) war $p \leq 0{,}001$. Mittelsignifikant (**) war $p \leq 0{,}01$. Signifikant (*) war $p \leq 0{,}05$. Alles darüber war nicht signifikant.

Bei Messung der Caspaseaktivität von T24LTT mit Daporinad und Cisplatin zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Verwendung der Kombination (IC_{50}) und der Kontrollgruppe mit DMSO (siehe Abb. 33). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich eine 3,5-fach höhere Caspaseaktivität messen. Die Kombination zeigte zudem bei Verwendung der halbletalen Dosis eine signifikant höhere Caspaseaktivität als die Daporinad- und Cisplatin-Monobehandlung. Die Caspaseaktivität war bei der Kombination (IC_{50}) fast doppelt so hoch wie mit Monobehandlung. Die Behandlung mit der viertelletalen Dosis bei allen drei Gruppen zeigte keine auffällige Erhöhung der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle.

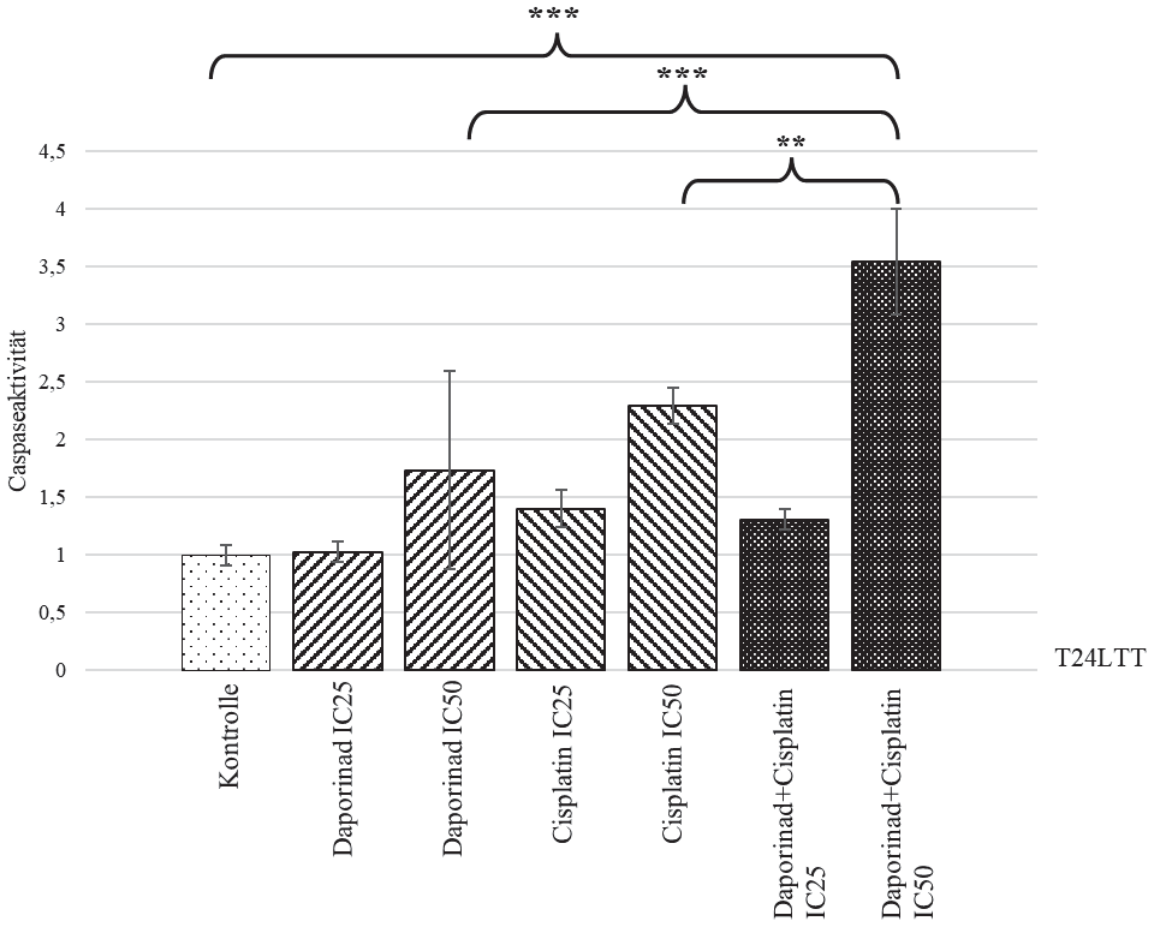

Abb. 33. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Daporinad und Cisplatin bei der Zelllinie T24LTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die

Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Daporinad, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer DMSO behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

Bei Messung der Caspaseaktivität der Zelllinie T24LTT unter Doxorubicin und Cisplatin-Kombinationsbehandlung zeigte sich eine signifikant stärkere Caspaseaktivität bei allen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 34). Die Kombination mit halbletaler Dosis zeigte eine hochsignifikant stärkere Caspaseaktivität. Diese war fast 5-fach so hoch, wie bei der mit Medium behandelte Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zur jeweiligen Monobehandlung war der Anstieg der Caspaseaktivität nach Kombinationsbehandlung signifikant stärker. Es ließ sich nach Kombinationsbehandlung eine fast doppelt so hohe Caspaseaktivität detektieren im Vergleich zur alleinigen Monobehandlung. Insgesamt unterschied sich die Stärke der Caspaseaktivität der jeweiligen Monobehandlungen (IC_{50}) hochsignifikant von der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigte sich bei T24LTT bei beiden Kombinationsbehandlungen mit halbletaler Dosis eine deutlich erhöhte Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelbehandlungen. Die Aktivitätserhöhung ließ sich nochmals deutlicher unter Doxorubicin und Cisplatin Kombination, als bei der Daporinad und Cisplatin Kombination erkennen (vgl. Abb. 33, Abb. 34).

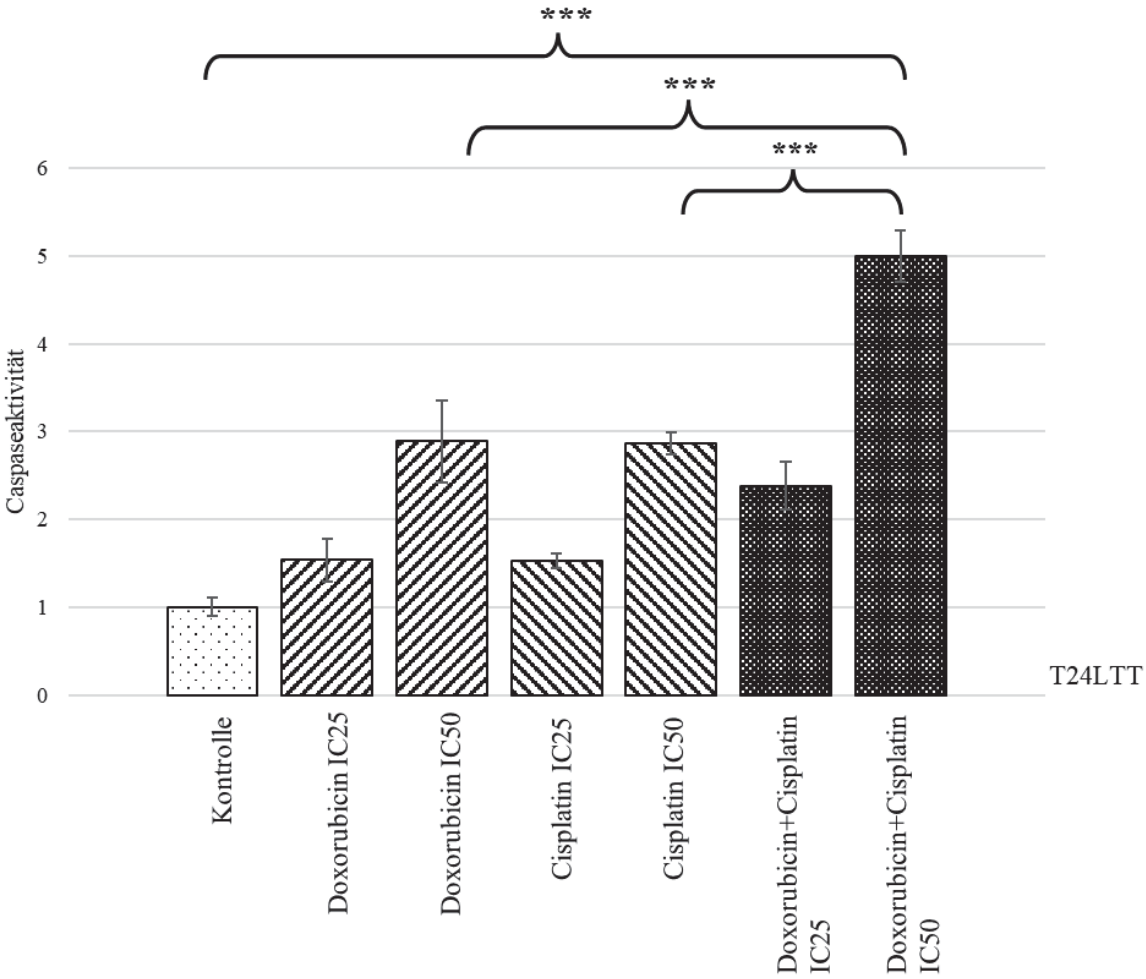

Abb. 34. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Doxorubicin und Cisplatin bei der Zelllinie T24LTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Doxorubicin, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer mit Medium behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

Bei Bestimmung der Caspaseaktivität bei J82LTT zeigte sich bei beiden Kombinationsexperimenten, wie auch schon bei der MTT-Kombinationsbehandlung, ein deutlich schwächeres Ergebnis als bei den anderen beiden Zelllinien.

Bei Bestimmung der Caspaseaktivität der Kombination (IC_{50}) zeigte sich eine signifikant stärkere Erhöhung der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle und der Daporinad-Monobehandlung (siehe Abb. 35). Diese war 1,4-fach höher als bei der Kontrollgruppe und der Daporinad-Monobehandlung mit halbletaler Dosis. Die Cisplatin-Behandlung mit halbletaler Dosis zeigte ebenfalls eine 1,4-fache stärkere Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Es zeigte somit

keinen signifikanten Unterschied zwischen Kombination und Cisplatin-Monobehandlung. Die Behandlung bei allen drei Gruppen mit der viertelletalen Dosis zeigte keine bis kaum stärkere Caspaseaktivitätserhöhung. Insgesamt war die maximale Caspaseaktivität mit 1,4-facher Erhöhung deutlich schwächer als die im Vergleich zu T24LTT mit 3,5-facher Erhöhung und zu 253JLTT mit 2,75-facher Erhöhung (vgl. Abb. 33, Abb. 37).

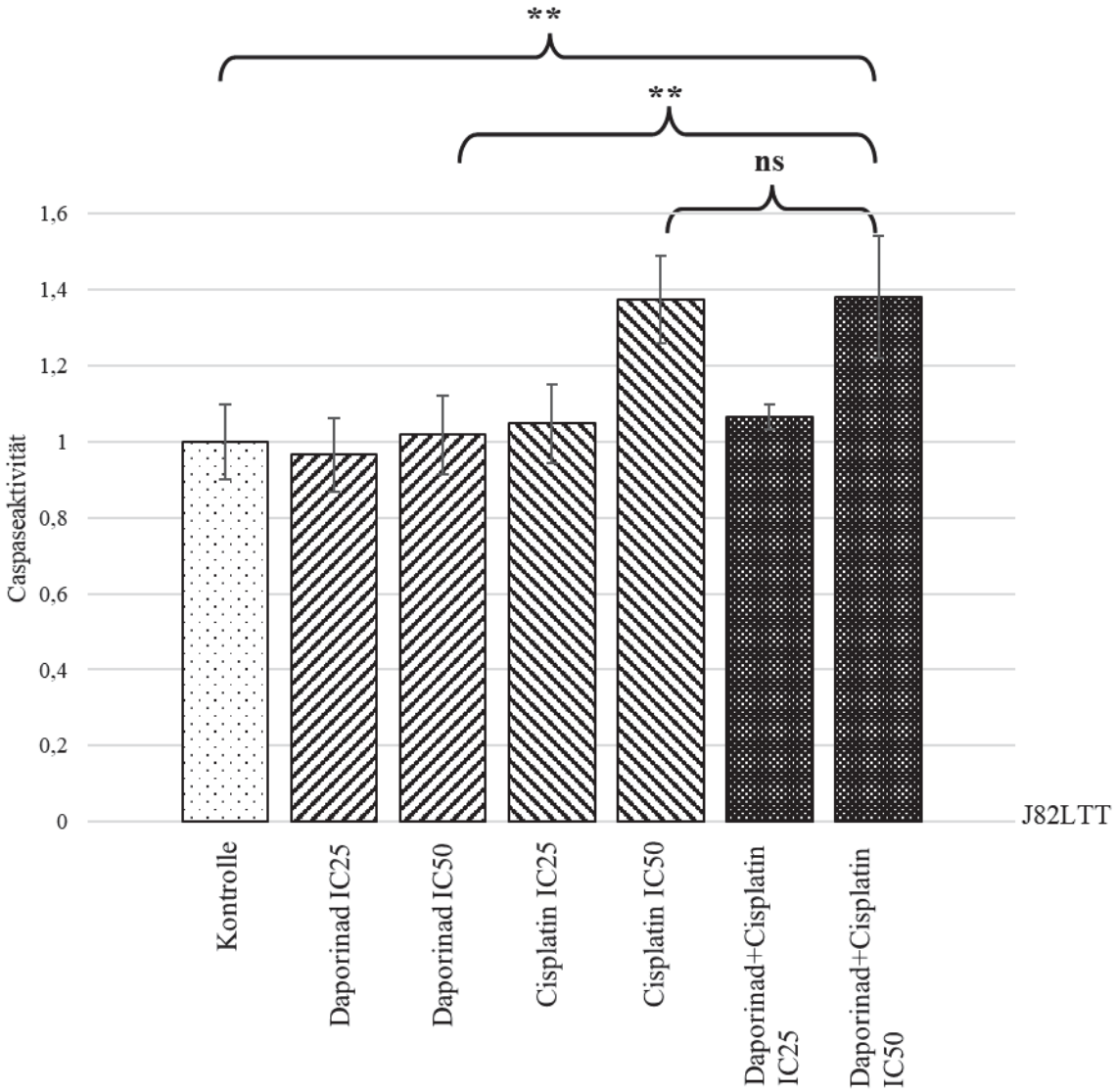

Abb. 35. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Daporinad und Cisplatin bei der Zelllinie J82LTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Daporinad, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer mit Medium behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$, ns = nicht signifikant. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale

Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

Für die Doxorubicinkombination zeigte sich bei Bestimmung der Caspaseaktivität von J82LTT unter Kombinationsbehandlung (IC_{50}) ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle. Es zeigte sich eine doppelt so hohe Caspaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Eine ähnlich starke Caspaseaktivitätserhöhung ließ sich auch bei der Behandlung mit der halbletalen Doxorubicindosis detektieren, weshalb sich kein signifikanter Unterschied zwischen Doxorubicin-Behandlung und Kombinationsbehandlung nachweisen ließ. Die Behandlung mit der halbletalen Cisplatin Dosis wies eine ca. 1,5-fach stärkere Caspaseaktivität auf als die Kontrolle. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied von Cisplatin-Monobehandlung zur Kombinationsbehandlung. Die Behandlungen mit der viertelletalen Dosis wiesen in allen drei Behandlungsgruppen ca. eine 1,25-fach erhöhte Caspaseaktivität auf. Auch in der Doxorubicin-Kombinationsbehandlung war die maximale Caspaseaktivität mit einer 2-fachen Erhöhung immer noch deutlich niedriger als die 5-fache Erhöhung bei T24LTT (siehe Abb. 34).

Zusammenfassend kann man für die Zelllinie J82LTT festhalten, dass sich in beiden Kombinationsbehandlungen eine deutlich geringer Caspaseaktivitätserhöhung nachweisen ließ als bei den anderen beiden Zelllinien. Zwischen den beiden Versuchen zeigte jedoch die Behandlung mit Doxorubicin und Cisplatin einen deutlicheren Unterschied zur Kontrollgruppe und der Einzelbehandlung mit Cisplatin als die Kombination von Daporinad und Cisplatin. Ein Vorteil zur alleinigen Doxorubicinbehandlung ließ sich jedoch nicht nachweisen.

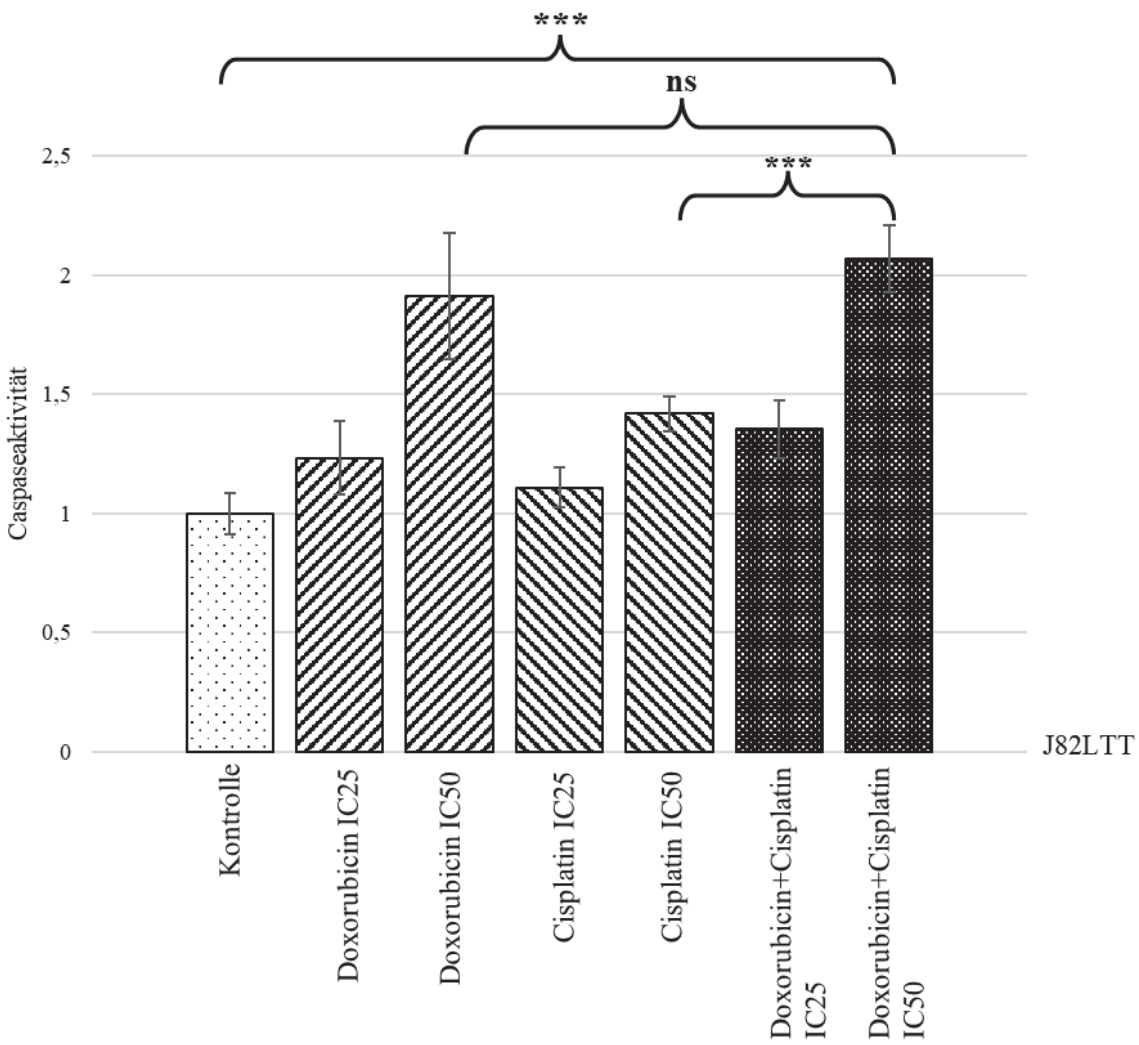

Abb. 36. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Doxorubicin und Cisplatin bei der Zelllinie J82LTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Doxorubicin, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer mit Medium behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$, ns = nicht signifikant. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

Bei der Zelllinie 253JLTT zeigte sich bei Bestimmung der Caspaseaktivität ein Unterschied zu den anderen Zelllinien. Die maximale Aktivitätserhöhung war sowohl bei T24LTT als auch bei J82LTT deutlich höher bei der Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin. Bei 253JLTT zeigte sich die höchste maximale Aktivitätserhöhung bei der Kombination von Daporinad und Cisplatin. Bei Verwendung der Kombination von Daporinad und Cisplatin ließ sich bei halbletaler Dosis eine Caspaseaktivitätserhöhung um das 2,75-fache im Vergleich zur Kontrolle detektieren. Bei alleiniger

Daporinadbehandlung (IC_{50}) eine 2,25-fache Erhöhung der Aktivität und unter Cisplatin-Monobehandlung nur eine um das 1,5-fache. Somit zeigte sich die Caspaseaktivitäserhöhung bei Verwendung der Kombination hochsignifikant zur Kontrollgruppe und zu den Einzelbehandlungen. Bei Verwendung der viertelletalen Dosis ließ sich bei Einzelbehandlung eine Caspaseaktivitätserhöhung um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe detektieren. Bei Behandlung der Zellen mit der viertelletalen Dosis der Kombination um das 1,75-fache.

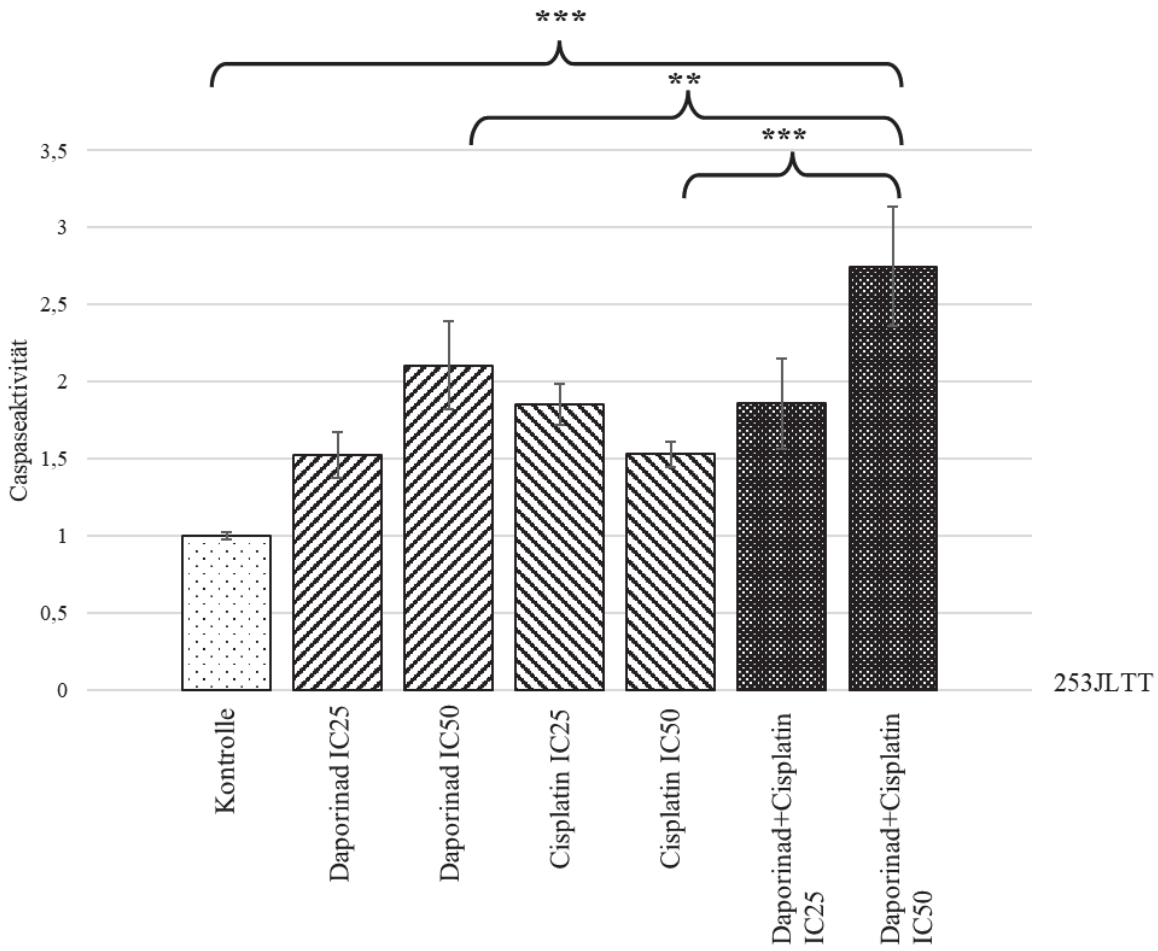

Abb. 37. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Daporinad und Cisplatin bei der Zelllinie 253JLTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Daporinad, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer mit Medium behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

Bei Behandlung von 253JLTT mit der Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin zeigte sich ein deutlich geringerer Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (siehe Abb. 38). Bei

Einzelbehandlungen der Zellen mit Doxorubicin und Cisplatin zeigte sich kein Unterschied in der Caspaseaktivität zwischen Verwendung der viertel- oder der halbletalen Dosis. Die Doxorubicin-Behandlung zeigte eine Erhöhung der Aktivität um das 1,75-fache im Vergleich zur Kontrolle. Dies war sogar eine schwächere Erhöhung als bei Cisplatin-Behandlung. Die Cisplatin-Monobehandlung zeigte eine Erhöhung um das 2-fache. Bei Verwendung der halbletalen Dosis bei Kombinationsbehandlung konnte eine 2,5-fach Erhöhung der Caspaseaktivität festgestellt werden. Bei Verwendung der viertelletalen Dosis erhöhte sich die Caspaseaktivität um das 1,75-fache. Der Unterschied zwischen Verwendung der Kombination zur Einzelbehandlung mit Doxorubicin und der Kontrolle war hochsignifikant. Der Unterschied zur Einzelbehandlung mit Cisplatin war zwar signifikant, allerdings nur mit einem P-Wert von $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend lässt sich für die Caspaseaktivitätsbestimmung bei Behandlung der Zelllinie 253JLTT festhalten, dass eine Kombinationsbehandlung mit halbletaler Dosis aus Daporinad und Cisplatin, sowie Doxorubicin und Cisplatin den jeweiligen Einzelbehandlungen deutlich überlegen ist. Durch Verwendung einer Kombinationsbehandlung kommt es zu signifikant höherer Zelltodinduktion durch Apoptose.
Insgesamt kann man aber nach Vergleich aller Zelllinien festhalten, dass die Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin sowohl in der Viabilitätstestung, als auch in der Caspase-Aktivitätsbestimmung der Kombination von Daporinad und Cisplatin überlegen war und sich ein deutlicherer Unterschied im Vergleich zu den Monobehandlungen zeigte.

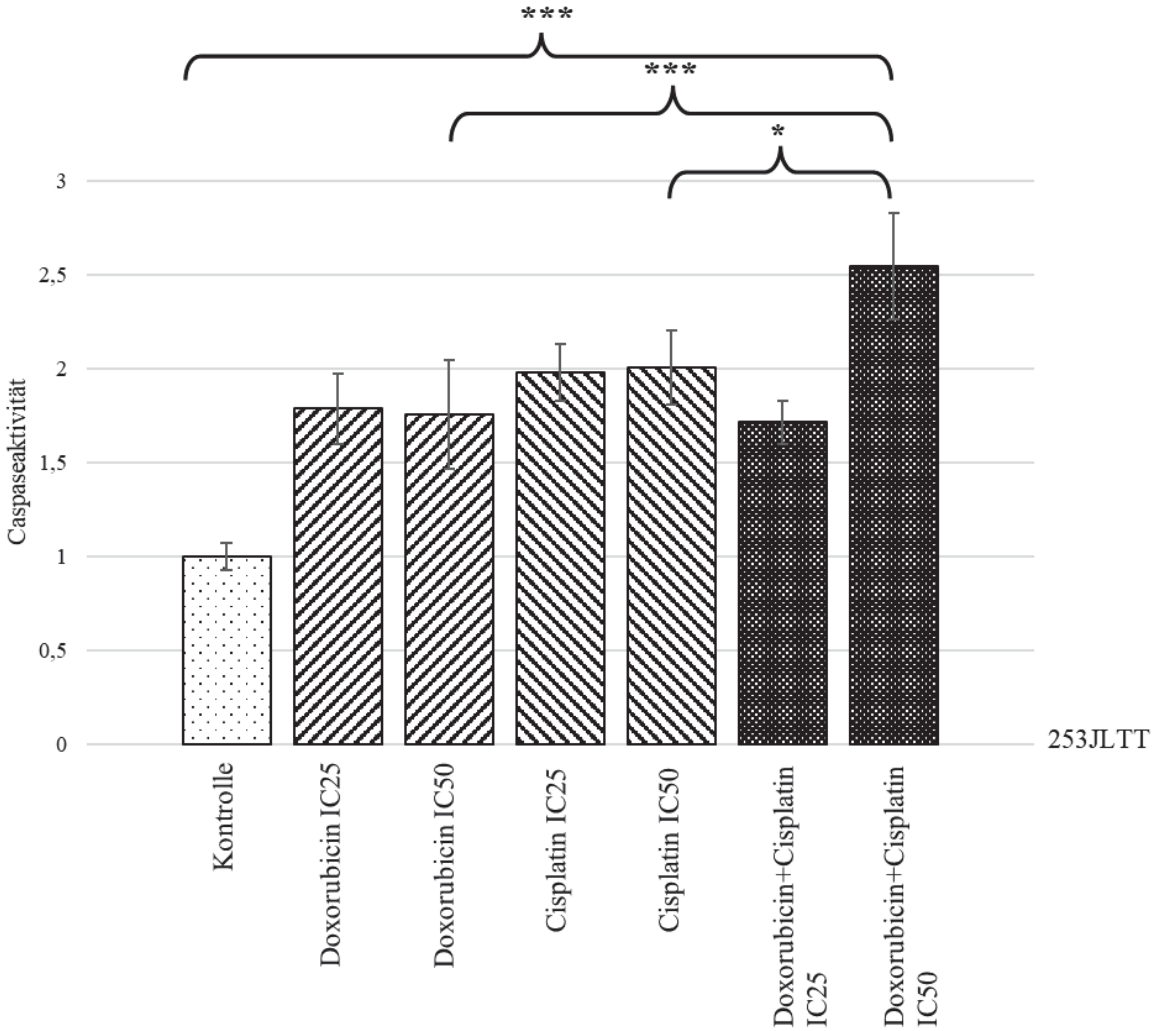

Abb. 38. **Messung der zellzahlunabhängigen Caspaseaktivität unter Behandlung mit Doxorubicin und Cisplatin bei der Zelllinie 253JLTT**. Gemessen wurde die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Test der Firma Promega und normiert durch Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiterGlo®. Behandelt wurden die Zellen jeweils mit der viertel- und halbletalen Dosis von Doxorubicin, Cisplatin und der Kombination aus beidem. Verglichen wurde dies mit einer mit Medium behandelten Kontrollgruppe (gleich 1 gesetzt). Signifikanzniveaus: ***: $p \leq 0{,}001$, **: $p \leq 0{,}01$, *: $p \leq 0{,}05$. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC25 = Viertelletale Dosis, IC50 = Halbletale Dosis)

3.4. Ganetespib – ein HSP90 Inhibitor als neuer Therapieansatz in der Cisplatin-resistenten Situation?

3.4.1. Sensitivitätsvergleich von parentalen und LTT Zelllinien gegenüber Ganetespib

Mit Hilfe eines *Drug Screens* aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden klinisch zugelassene Substanzen identifiziert, die eine stärkere Wirkung auf LTT-Zellen im Vergleich zu ihren parentalen Zelllinien hatten. In dieser Arbeit sollte der Hsp90-Inhibitor Ganetespib validiert werden. Es zeigte sich in den Vorarbeiten, dass sowohl T24LTT als auch J82LTT deutlich sensitiver auf den Wirkstoff reagierten als ihre parentalen Zelllinien (siehe Abb. 45).

Hierfür wurde eine MTT-Viabilitätstestung unter Ganetespib-Behandlung durchgeführt. Verglichen wurde jeweils die parentale Zelllinie mit der zugehörigen LTTs. Das Ergebnis der Viabilitätstestung wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve aufgeführt.
Die Behandlung des Zelllinienpaars T24 und T24LTT ergab bereits ab Verwendung einer Dosis von 5 nM einen stärkeren Rückgang der Zellviabilität bei T24 als bei T24LTT. Dieses deutlich sensitivere Ansprechen von T24 auf Ganetespib als T24LTT ließ sich über den gesamten Dosierungsbereich feststellen. Somit konnte das Screeningergebnis für das T24 Paar im MTT nicht validiert werden.

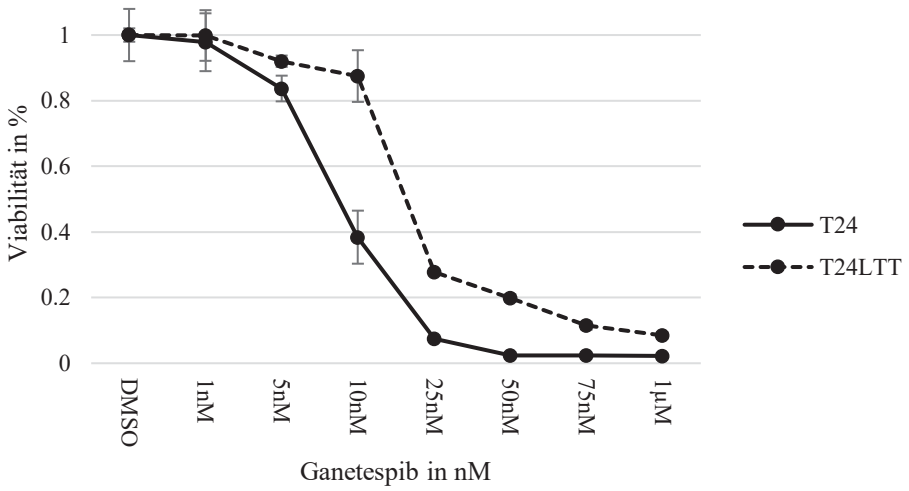

Abb. 39. **Dosiswirkungskurve mit den Zelllinien T24 und T24LTT unter Behandlung mit Ganetespib**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 1 nM bis 1 µM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Ganetespib. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar, µM = Mikromolar)

Bei Behandlung des Zelllinienpaars J82 und J82LTT ließ sich die stärkere Sensitivität der parentalen Zelllinie auf Ganetespib ebenfalls darstellen, auch wenn nicht so stark ausgeprägt wie bei T24 und T24LTT. Erst ab der Verwendung von einer Dosis von mehr als 10 nM unterschieden sich LTT und parentale Zelllinie im Vergleich. Die Viabiliät von J82 wurde mit aufsteigender Dosierung deutlich schneller und stärker reduziert als die von J82LTT. Somit konnte auch in diesem Versuch das Screeningergebnis nicht validiert werden.

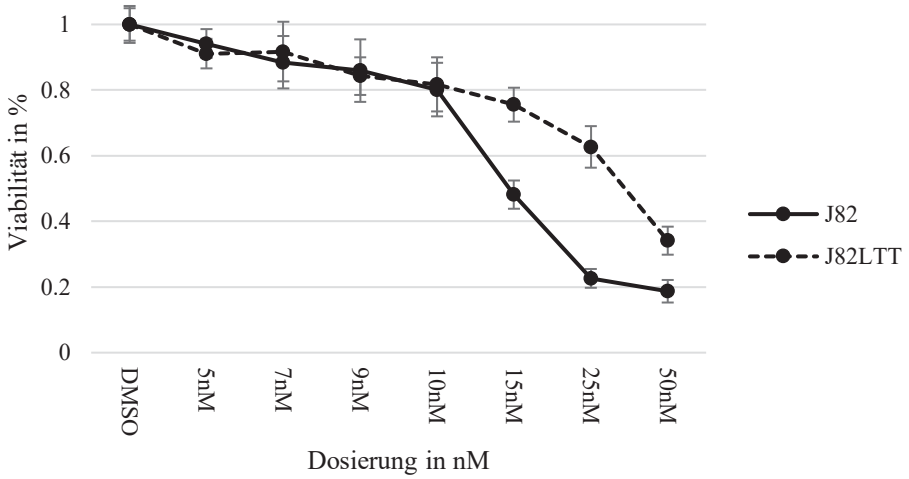

Abb. 40. **Dosiswirkungskurve mit den Zelllinien J82 und J82LTT unter Behandlung mit Ganetespib**. Durchgeführt wurde eine Viabilitätstestung der Zelllinien im Dosisbereich von 5 nM bis 50 nM mittels MTT-Test. Als Referenz diente eine Kontrolle mit DMSO äquivalent zum höchsten Dosispunkt. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der DMSO-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosierung von Ganetespib. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (nM = Nanomolar)

Mit Hilfe der Kurven wurden die halbletalen Dosispunkte von T24LTT und J82LTT für Ganetespib errechnet. Der IC_{50} von T24LTT betrug 20 nM und der von J82LTT 22,5 nM.

Anders als in den Vorarbeiten gezeigt wurde, lässt sich abschließend festhalten, dass die LTTs deutlich weniger sensitiv auf die Ganetespib-Behandlung reagierten als die parentalen Zellen. Somit scheint dieser Ansatz als Monobehandlung nicht für die Therapie von Cisplatin-resistenten UCs geeignet zu sein.

3.4.2. Kombination von Ganetespib und Doxorubicin als Cisplatinersatz?

In der Literatur gab es Hinweise, dass eine Kombination von Hsp90-Inhibitoren mit Doxorubicin eine hohe antineoplastische Effizienz gegenüber verschiedenen Tumorarten bewirken kann (Mohammadian et al., 2020). Wegen des schlechteren Ansprechens der LTTs auf Ganetespib im

Vergleich zu den parentalen Zellen in der Einzeltestung, wurde daher im Folgenden eine Kombinationstherapie durchgeführt. Der Versuchsaufbau war hierbei der gleiche, wie bei der Cisplatin-Kombination (siehe Seite 22). Verglichen wurde die Kombination aus Doxorubicin und Ganetespib mit der jeweiligen Einzelbehandlung mit beiden Medikamenten. Gemessen wurde die Zellviabilität aller drei Versuchsgruppen im MTT-Test.

Bei Behandlung von T24LTT zeigte sich bereits bei Verwendung der 0,125-fachen halbletalen Dosis eine stärkere Reduktion der Zellviabilität mit Kombinationsbehandlung (siehe Abb. 41). Bei Erhöhung der Dosis reduzierte sich die Zellviabilität bei Kombinationsbehandlung über den gesamten Kurvenverlauf deutlich stärker als die der Einzelbehandlungen. Im Vergleich von Doxorubicin-Einzelbehandlung zur Kombination zeigte sich bereits ab Verwendung der 0,25-fachen halbletalen Dosis eine signifikant ($p < 0,05$; ab 0,75-fache IC50 $p < 0,001$) stärkere Reduktion der Zellviabilität unter der Kombinationsbehandlung. Im Vergleich zur Ganetespib-Einzelbehandlung war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,01$) ab Verwendung der 0,5-fachen halbletalen Dosis.

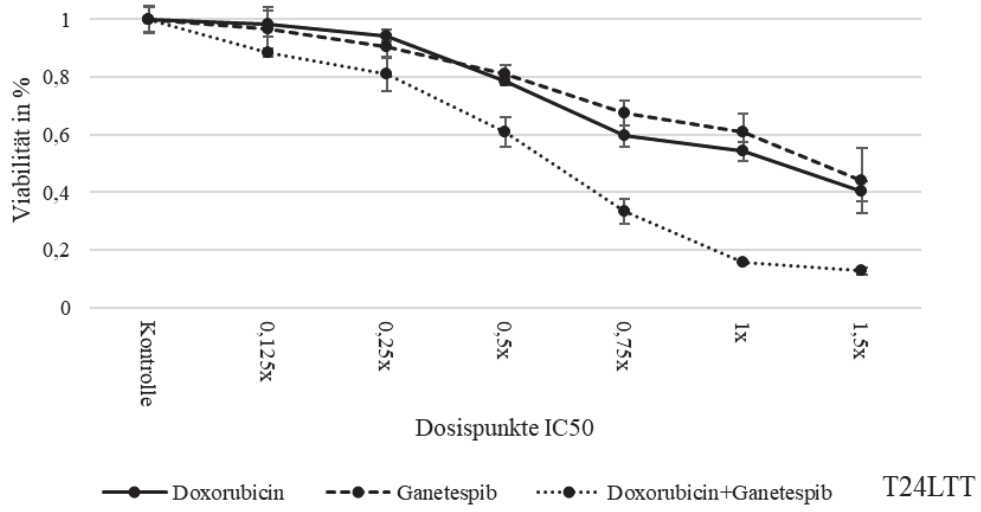

Abb. 41. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie T24LTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Ganetespib**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Ganetespib- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert. Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = Halbletale Dosis)

Bei der Behandlung von J82LTT zeigte sich nicht ein so eindeutiges Ergebnis, wie bei der Behandlung von T24LTT. Hier konnte durch die Kombinationsbehandlung kein Vorteil erreicht werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede von Kombinationsbehandlung zu den jeweiligen Einzelbehandlungen (siehe Abb. 42).

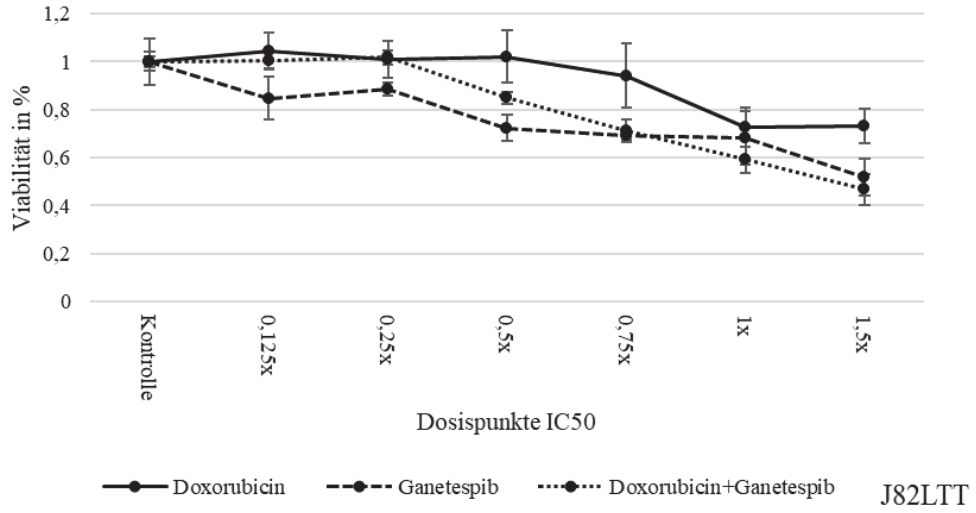

Abb. 42. **Dosiswirkungskurve mit der Zelllinie J82LTT unter Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Ganetespib**. Durchgeführt wurde eine MTT-Viabilitätstestung der Zelllinie mit Dosispunkten, welche sich an Vielfachen der halbletalen Dosis orientieren. Verglichen wurden drei Gruppen: eine Doxorubicin-, eine Ganetespib- und eine Kombinationsgruppe. Als Referenz diente eine Mediums-Kontrolle. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde auf die der Mediums-Kontrolle (gleich 1 gesetzt) normiert Die Ordinate zeigt die Viabilität in % und die Abszisse die Dosispunkte anhand der halbletalen Dosis. Berechnet wurde das Ergebnis aus dem Mittelwert von Quadruplicaten. Verwendet wurde als Streuungsmaß die normale Standardabweichung SD. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. (IC50 = Halbletale Dosis)

Um zu überprüfen, ob die erzielten Effekte durch die Kombinationstherapie zufällig waren oder auf möglichen synergistischen Effekten basierten, wurde ebenfalls eine CompuSyn Analyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich sowohl für T24LTT als auch für J82LTT deutliche synergistische Effekte. Bei T24LTT traten diese Effekte ab einer Dosis der 0,75-fachen halbletalen Dosis auf. Obwohl bei J82LTT in der MTT Viabilitätstestung kein Vorteil der Kombination gegenüber den Einzelbehandlungen gezeigt werden konnte, ließen sich in der CompuSyn Analyse über fast den gesamten Dosierungsbereich, mit Ausnahme der 0,25-fachen halbletalen Dosis, synergistische Effekte nachweisen (siehe Abb. 43).

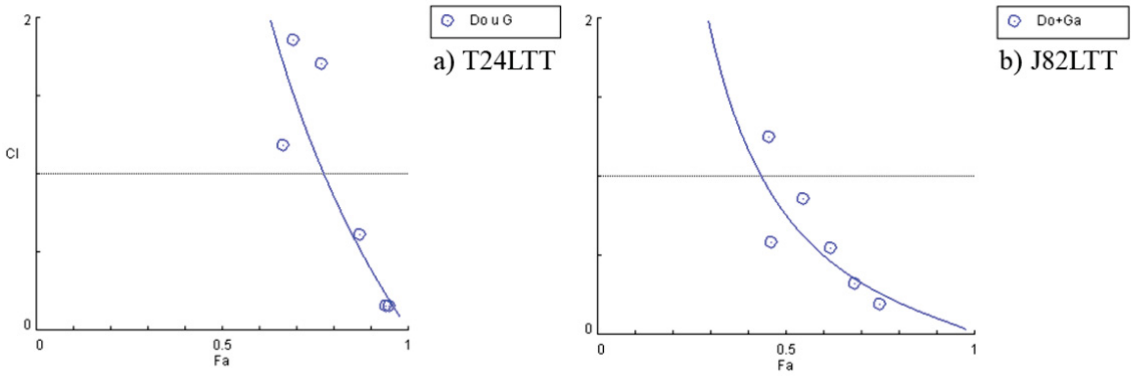

Abb. 43. ***Combination Index* Bestimmung mit Doxorubicin und Ganetespib**. Dargestellt ist die Synergietestung der Zelllinien a) T24LTT und b) J82LTT mit Hilfe von CompuSyn. Die Ordinate zeigt den *Combination Index* (CI) von 0 bis 2, wobei CI = 1 additive Effekte zeigen, CI > 1 antagonistische Effekte und CI < 1 synergistische Effekte. Die Abszisse zeigt die *Fraction Affected* (Fa) von 0 bis 1. (CI = *Combination Index*, Fa = *Fraction Affected*, Do = Doxorubicin, G = Ganetespib)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass diese Kombinationsbehandlung starke synergistische Effekte aufwies und vor allem positiv auf die Cisplatin-resistente T24 Linie wirkte. Zukünftig soll die Kombination von Ganetespib und Doxorubicin noch an weiteren Zelllinien untersucht werden.

Exkurs: Sind zugelassene Antibody Drug Conjugates eine therapeutische Option für Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen

Um festzustellen, ob Zielproteine für *Antibody Drug Conjugates* (ADC) in Cisplatin-resistenten Zellen abundant sind, wurden Westernblots durchgeführt um das Proteinniveau darzustellen. Klinisch bereits implementierte ADCs zielen auf TROP2 und Nectin-4 ab. Dafür wurden Westernblots mit Lysaten aller vier Zelllinienpaare und HBLAK angefertigt (siehe Abb. 44).

Bei TROP2 zeigte sich ein inhomogenes Bandenmuster. Bei T24, J82 und RT112 zeigte sich für die Cisplatin-resistenten Zelllinien (LTTs) ein deutlich reduziertes Proteinniveau. Als Konsequenz könnten Cisplatin-resistente Zellen auch deutlich weniger sensitiv gegenüber dem TROP2 basierten ADC sein. Dies müsste zukünftig mittels Dosis-Wirkungskurven untersucht werden. Im Vergleich dazu zeigte sich bei der benignen Zelllinie HBLAK eine deutlich stärkere Expression, trotz niedrigerer Proteinbeladung, so dass die Kontrollzellen besonders empfindlich gegenüber dem ADC sein könnten.

Bei Nectin-4 zeigten sich, trotz Detektion mit einen hochsensitiven Chemolumineszenzdetergenz, langer Expositionszeit und adäquater Proteinbeladung, keine Banden bei den Tumorzellen. Bei HBLAK ließ sich eine schwache Doppelbande darstellen.

Somit ließ sich schlussfolgern, dass das Proteinniveau von TROP2 in LTTs eher vermindert ist. Das von Nectin-4 war über Western Blot kaum nachweisbar.

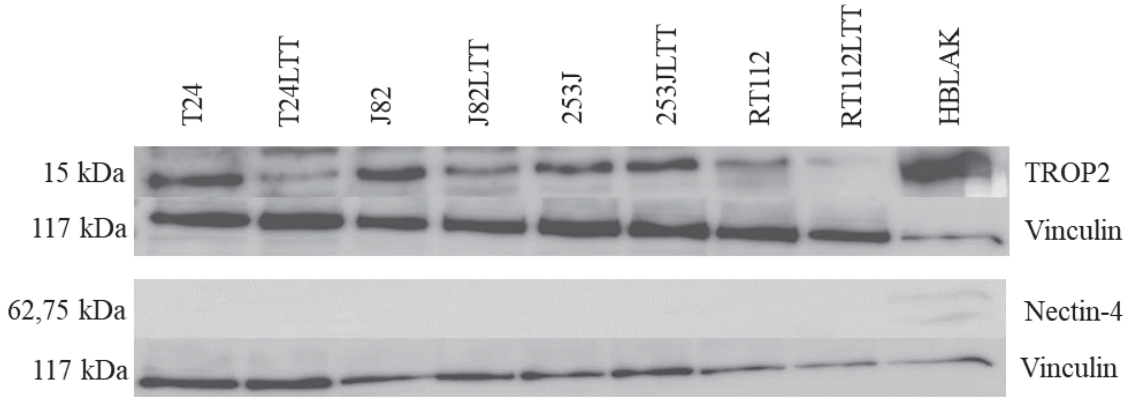

Abb. 44. **Proteinnachweis von ADC Zielproteinen mittels Western Blot**. Dargestellt wurden diese Zielproteine TROP2 (n=2) und Nectin-4 (n=2) jeweils mit Vinculin als Ladekontrolle. Verglichen wurden die vier Zelllinienpaare, jeweils die sensitive und resistente Zelllinie, im Vergleich zur benignen Zelllinie HBLAK. (ADC = *Antibody Drug Conjugate*, TROP2 = *Trophoblast cell-surface antigen 2,* kDa = Kilodalton)

4. Diskussion

4.1. Ist die alleinige Inhibition der ermittelten Zielproteine ein sinnvoller Ansatz für die Behandlung des Cisplatin-resistenten MIUC?

Therapieresistenzen, z.B. gegenüber Cisplatin erschweren und limitieren erheblich eine effiziente Behandlung des MIUCs. Die Cisplatin-basierte Chemotherapie ist immer noch Teil der Erstlinientherapie zur Behandlung des MIUCs (Zacharis & Grullich, 2020), ((AWMF), 2025). Somit ist die Identifizierung neuer Therapieoptionen zur Umgehung der Resistenz immer noch relevant und könnte zu einer verbesserten Patientenprognose beitragen.
Nachdem sich in Vorarbeiten neue Zielproteine mit Relevanz für die Cisplatinresistenz des MIUCs herausgestellt hatten und diese pharmakologisch targetierbar waren, sollte der Effekt der entsprechenden Inhibitoren auf UC-Zellen festgestellt werden. Im Folgenden wird für TOP2A, GSR und NAMPT die Inhibition als möglicher Therapieansatz diskutiert.

Bei Betrachtung des Proteinniveaus der Zielproteine in Zelllinien-Modellen zeigten sich vor allem bei GSR und TOP2A eine deutlich stärkere Abundanz bei den LTTs als bei ihren parentalen Zellen. Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) ist bereits bei einer Vielzahl von Tumorentitäten dafür bekannt, zur Cisplatinresistenz beizutragen. Zargar et al., fanden 2022 zusätzlich heraus, dass eine Behandlung mit Acriflavine, welches Topoisomerase 1 und 2 herunter reguliert, resistente Urothelkarzinom-Zellen für eine Cisplatin-Behandlung resensitivieren kann (Zargar et al., 2022). Dies verdeutlicht nochmals den signifikanten Einfluss von TOP2A in der Resistenzentstehung.
In der vorliegenden Arbeit ließ sich bei Behandlung der Urothelkarzinom-Zellen mit Doxorubicin als TOP2A-Inhibitor eine Korrelation zu dem erhöhten Proteinniveau bei den LTTs feststellen. Sowohl T24LTT als auch J82LTT reagierten deutlich sensitiver auf die Behandlung als parentale T24 und J82. Allerdings zeigten sich 253JLTT und RT112LTT im Vergleich zu T24LTT und J82LTT deutlich resistenter. Auf benigne Zellen wie HBLAK und HBF zeigte sich ein deutlich geringerer Einfluss als auf T24LTT und J82LTT. Im Vergleich zu 253JLTT und RT112LTT reagierte HBLAK allerdings vulnerabler.
Cisplatin-resistente UC-Zellen weisen somit nicht nur ein erhöhtes Proteinniveau auf, sondern reagieren auf Inhibition von TOP2A mit Doxorubicin deutlich sensibler als Cisplatin-naive Zellen. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Proteinniveau und Sensitivität.

Dieser Zusammenhang konnte bei der Inhibition von GSR durch 2-AAPA nicht beobachtet werden. Obwohl das GSR-Niveau in den LTT-Zellen erhöht war, waren sie nur wenig empfindlich gegenüber dem GSR-Inhibitor 2-AAPA. Andere Studien, unter anderem beschrieben von Skowron et al. 2017 für das UC, berichten auch davon, dass in Cisplatin-resistenten Zellen eine erhöhte GSH-

Konzentration vorliegt (Skowron et al., 2017). Mit erhöhten GSH-Konzentrationen sind die Tumorzellen in der Lage reaktive Sauerstoffspezies abzufangen. In dem Kontext wurde ebenfalls erwähnt, dass die erhöhte GSH-Konzentration essenziell notwendig für das Überleben von Tumorzellen sei, und auch mit Resistenzentwicklung in Verbindung stehen würde (Traverso et al., 2013). Die GSH-Konzentration wird durch die GSR-Aktivität reguliert. Folglich müsste eine Inhibition von GSR zu geringeren GSH-Leveln führen und so mit einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress der Zellen in Verbindung stehen. Dieser Zusammenhang ließ sich durch unsere Experimente mit GSR-Inhibition nicht nachweisen. In der Literatur wurden aber auch Möglichkeiten beschrieben, wie Tumorzellen eine GSR-Inhibition umgehen können. Benannt wurden Optionen von verstärkter GSH-Neusynthese oder anderen antioxidativen Wege um GSH, unabhängig von GSR, zu regenerieren (Harris et al., 2015). Wie auch in unseren Versuchen mussten teilweise in anderen Arbeiten 2-AAPA Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich zur Reduktion der Zellviabilität verwendet werden. Hierbei handelte es sich um Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Li et al., 2017). Es stellt sich somit auch die Frage, ob ein hohes GSR-Proteinniveau überhaupt mit der Stärke des Rückgangs der Zellviabilität durch Inhibition des Enzyms korreliert oder ob durch hohe GSR-Level automatisch auch andere Optionen zur GSH-Regenerierung entstehen.
Durch die hohe toxische Wirkung auf die benignen Kontrollzelllinien HBLAK und HBF scheint diese Substanz wenig geeignet für neue Therapieansätze des MIUCs zu sein. Zu einer Kombinationstherapie von Cisplatin und 2-AAPA gibt es in der Literatur zudem auch keine Daten.
Obwohl also eine erhöhte GSR-Aktivität und eine erhöhten GSH-Konzentration in Tumorzellen mit einer Chemoresistenz assoziiert sein kann (Traverso et al., 2013), ist die pharmakologische GSR-Inhibition in UC-Zellen offenbar wenig effektiv. Ein erhöhtes Proteinniveau korrelierte nicht mit einem besseren Ansprechen der Zellen auf 2-AAPA.

Daporinad, ein NAMPT-Inhibitior, auch bekannt als FK866, wird durch die prokanzeröse Funktion von NAMPT in Tumorzellen als wichtiger Kandidat zur Therapie beschrieben. NAMPT und erhöhte NAD^+ Level werden mit stärkerer Chemoresistenz in Tumorzellen assoziiert (Lin, 2022). Auch durch die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde Cisplatinresistenz in Urothelkarzinomzellen mit stärkerer NAMPT-Proteinabundanz assoziiert. Dies bildete die Grundlage für die Hypothese, dass eine Inhibition des Enzyms mit einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin in Verbindung stehen könnte.
In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Detektion des Proteinniveaus im Vergleich zu TOP2A und GSR keine stärkere Abundanz in den LTTs im Vergleich zu ihren parentalen Zellen. Bei der Behandlung von dem Zelllinienpaar T24 und T24LTT mit dem NAMPT-Inhibitor Daporinad zeigte sich, dass T24LTT deutlich sensitiver reagierte als T24. Anhand des im Western Blot detektierten Proteinniveaus konnte sich somit kein Zusammenhang zum deutlich sensitiveren Ansprechen der

LTT herstellen lassen. Einen richtigen erklärenden Zusammenhang zwischen einer sensitiveren Reaktion von T24LTT auf Daporinad als bei den anderen LTTs ließ sich auch nicht finden. In der Literatur findet sich allerdings eine Option, dass Zellen eine NAMPT-Inhibition durch einen hoch regulierten NAPRT-vermittelten Weg umgehen könnten. Durch NAPRT (Nicotinat-Phosphoribosyltransferase) kann ebenfalls NAD regeneriert werden und zwar NAMPT unabhängig. Man fand heraus, dass Zellen deutlich sensitiver mit einer stärkeren Viabilitätsreduktion auf eine NAMPT-Inhibition reagierten, wenn man zusätzlich den NAPRT-Signalweg inhibierte (Navas et al., 2023). So könnte eine spontane Mutation mit einem Funktionsverlust oder einer Funktionseinschränkung des NAPRT-Weges in den Zelllinien T24 und T24LTT eventuell das sehr sensitive Ansprechen und somit die sehr effektive Wirksamkeit von Daporinad erklären. Um dies zu klären, müssten weitere Untersuchungen der Zelllinien erfolgen. Im Vergleich dazu, war das Ergebnis bei J82 und J82LTT genau umgekehrt. J8LTT benötigte eine fast dreimal so hohe Dosierung wie J82. Allerdings muss dazu angeführt werden, dass das J82 Paar, im Vergleich zu den anderen drei Zelllinienpaaren und insbesondere zu T24 und T24LTT, auf die verschiedenen Behandlungen insgesamt deutlich schlechter ansprach. Das Zelllinienpaar, vor allem die LTT, brauchte bei Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren grundsätzlich höhere Dosierungen. Im Vergleich zu den in Studien verwendeten Dosierungen von Daporinad konnten allerdings bei allen vier unserer LTTs geringere Dosierungen verwendet werden. Pant et al. beschrieben in ihrer Studie aus dem Jahr 2023 ein erhöhtes NAMPT-Proteinniveau in Cisplatin-sensitiven Choleangiozellulären-Karzinomzellen. Die hierfür zur Daporinad-Monotherapie verwendete halbletale Dosis betrug ca. 20 nM (Pant et al., 2023). Trotz des erhöhten Proteinniveau waren in dem Versuch der Studie höhere Dosierungen von Daporinad nötig, um die halbletale Dosis zu erreichen als in unseren Experimenten mit Cisplatin-resistenten UC-Zellen. Auch hier zeigte sich wieder keine Korrelation zwischen Proteinniveau und Sensisitivität.

Benigne HBLAK hatten eine schwächeres NAMPT-Proteinniveau und waren deutlich toleranter der Daporinadbehandlung als alle vier LTTs. Hier zeigte sich somit wieder eine Korrelation zwischen vermindertem Proteinniveau und resistenterem Verhalten gegenüber der Behandlung. Schlussfolgernd könnte Daporinad somit eine gute Alternative zur Behandlung von Cisplatin-resistenten UC-Zellen sein, ohne gleichzeitig zu schädigend auf benigne Zellen zu wirken. Ob eine mögliche Korrelation zwischen Proteinniveau und Sensitivität der Zellen besteht, ist fraglich.

4.2. Sind Kombinationsbehandlungen mit Inhibitor und Cisplatin eine Lösung für das Resistenzproblem?

Bereits in der Einzelbehandlung der Cisplatin-resistenten UC-Zellen zeigten sich Daporinad und Doxorubicin als potente Inhibitoren, die sich positiv auf die Hemmung des Zellwachstums auswirkten. Zur Entwicklung eines neuen chemosensitivierenden Ansatzes standen also zwei

Inhibitoren für weitere Untersuchungen von Kombinationsbehandlungen mit Cisplatin zur Verfügung.

Resensitivierung durch Vorbehandlung

Als erster Kombinationsansatz bestand der Versuch Cisplatin-resistente UC-Zellen mittels Daporinad bzw. Doxorubicin vorzubehandeln. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Cisplatin in der Hoffnung, die Zellen durch die Vorbehandlung auf Cisplatin resensitiviert zu haben. In der Literatur wurden bereits resensitivierende Effekte für die Cisplatinbehandlung bei Urothelzellkarzinomen durch eine Vorbehandlung mittels Topoisomeraseinhibitor beschrieben (Zargar et al., 2022). Das Vorbehandlungsschema der Studie war dem aus dieser Arbeit ähnlich. Der wichtigste Unterschied bestand darin, dass es sich in der Studie von Zargar et al., 2022 um Cisplatin-naive und nicht resistente Zellen handelte. Aus diesem Grund konnten in dieser Studie bis zu 10-fach geringere Cisplatin-Dosen verwendet werden. Zudem war die Konzentration der Vorbehandlung mit dem Topoisomeraseinhibitor geringer als die unserer Arbeit. Bei dem hierfür von Zargar et al. verwendeten Topoisomeraseinhibitor handelte es sich um Acriflavin, ein antiseptischer Farbstoff, welcher in Deutschland nicht zur Therapie zugelassen ist. (Zargar et al., 2022).
Bei dem von uns verwendeten TOP2A-Inhibitor Doxorubicin handelt es sich im Gegensatz sowohl um ein zugelassenes Medikament, als auch um ein viel verwendetes Zytostatikum, was den praktischen Nutzen deutlich verbessert. Zudem sind Kombinationen von Cisplatin und Doxorubicin bereits in vielen Therapieschemata zur Behandlung von nicht-resistenten Urothelkarzinomen etabliert und auch in der Literatur keine Seltenheit (Zacharis & Grullich, 2020). Der wichtige Unterschied in der vorliegenden Arbeit ist somit zu zeigen, ob auch Cisplatin-resistente UC-Zellen von einer Vorbehandlung mit Doxorubicin profitieren würden und sich resensitivierende Effekte für Cisplatin zeigen könnten.
In der Monobehandlung der LTTs zeigten sich hervorragende Ergebnisse, was den Rückgang der Zellviabilität der LTTs im Vergleich zu den parentalen Zellen betraf. Im Kombinationsversuch nach Vorbehandlung von T24LTT und J82LTT mit der halbletalen Doxorubicindosis zeigte sich im direkten Vergleich zur Kontrolle allerdings kein signifikanter Vorteil.
Schlussfolgernd zeigte eine Vorbehandlung auf Cisplatin-resistente Urothelkarzinomzellen mit Doxorubicin keinen so starken Erfolg, wie es nach den Monobehandlungen erhofft war. Im Vergleich zu den vorliegenden positiven Resensitivierungsversuchen in der Literatur muss allerdings beachtet werden, dass es sich dort nicht um Cisplatin-resistente Zellen handelte.
Dies lässt somit keinen direkten Schluss auf unsere Daten zu.

Als weitere mögliche inhibitorische Substanz stand Daporinad noch zur Vorbehandlung zur Verfügung. Auch hier zeigte sich in der Monobehandlung vor allem bei T24LTT ein großer Vorteil mit stärkerem Ansprechen bei LTTs. Nach Vorbehandlung von T24LTT mit der halbletalen

Daporinad-Dosis ließ sich ein signifikanter Vorteil im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Bei Vorbehandlung von J82LTT ließ sich dieser Vorteil nicht detektieren. Zum direkten Vergleich ließ sich in der Literatur zur Vorbehandlung von Zellen mit Daporinad und anschließender Cisplatinbehandlung nicht viel finden. Xu et al., zeigten 2017, dass mit Daporinad vorbehandelte Zellen deutlich anfälliger für oxidativen Stress waren. Nach Vorbehandlung von Lungenadenokarzinom-Zellen waren allerdings Dosierungen von Cisplatin im hohen mikromolaren Bereich nötig, um Unterschiede zwischen Kontrolle und Daporinad-Vorbehandlung zu zeigen (Xu et al., 2017). Allerdings handelte es auch hierbei um Cisplatin-naive Zellen. Zur Vorbehandlung wurden ebenfalls 10-fach höhere Mengen an Daporinad verwendet, als bei der Vorbehandlung von T24LTT in unserer Arbeit. Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass Cisplatin-resistente UC-Zellen noch sensitiver auf eine NAMPT-Inhibition durch Daporinad reagieren als Cisplatin-naive Zellen und eine Resensitivierung für Cisplatin deutlich signifikanter sein könnte.

Beim Toxizitätstest der benignen HBLAK zeigten sich sowohl nach Daporinad- als auch nach Doxorubicin-Vorbehandlung keinerlei Unterschiede zwischen allen drei Behandlungsgruppen. Dies unterstreicht möglicherweise den Punkt, dass die Inhibition vor allem durch Daporinad im Cisplatin-resistenten Setting einen deutlichen Mehrwert bringen könnte. Um erneut den Bogen zurück zu einem erhöhten Proteinniveau von NAMPT und TOP2A in LTTs zu ziehen lässt sich hier keine Korrelation feststellen. TOP2A lag mit einem deutlich höheren Proteinniveau in LTTs vor. Es zeigte sich jedoch kein positiver Effekt durch eine Vorbehandlung mit Doxorubicin. NAMPT lag nicht verstärkt exprimiert in LTTs vor, doch hier ließ sich bei Vorbehandlung mit Daporinad bei T24LTT ein signifikanter Vorteil feststellen.
Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Kombinationsversuch durch Vorbehandlung von Cisplatin-resistenten UC-Zellen nicht so erfolgsversprechend wie erhofft war und in dieser Arbeit nicht die Lösung für das Problem der Cisplatin-Resistenz zu sein scheint. Zudem müsste der signifikante Vorteil durch Vorbehandlung mit Daporinad in weiteren Experimenten mit Cisplatin-resistenten UC-Zellen validiert werden.

<u>Resensitivierung durch simultane Kombination</u>

Durchaus vielversprechender erwies sich die Möglichkeit der direkten Kombination von inhibitorischer Substanz und Cisplatin als simultane Behandlung.
Die direkte Kombination von Doxorubicin und Cisplatin ergab einen signifikant stärkeren Rückgang der Zellviabilität in drei der vier getesteten LTTs. Sowohl zur alleinigen Doxorubicin- als auch zur alleinigen Cisplatin-Behandlung zeigte die Kombinationsbehandlung einen signifikant stärkeren Rückgang der Zellviabilität bei T24LTT, RT112LTT und 253JLTT. Zudem konnten in der Behandlung bei allen vier Zelllinien synergistische Effekte zwischen Doxorubicin und Cisplatin nachgewiesen werden. Die starke Ausprägung der synergistischen Effekte bei allen vier LTTs lässt

sich eventuell auf die Wirkweise beider Substanzen zurück führen. Da sowohl mit Cisplatin als auch mit Doxorubicin ein therapeutischer Effekt über Interaktion mit der DNA bzw. der DNA-Synthese erzielt wird, scheint sich dies besonders positiv auf den Synergismus beider Substanzen auszuwirken (Dasari & Tchounwou, 2014).

Diese positiven synergistischen Effekte in der Behandlung von Cisplatin-resistenten UC-Zellen ließen sich auch in anderen Studien zeigen. Bei den jeweils mit Cisplatin verwendeten Kombinationspartner, Cordycepin und Prodigiosin konnte gezeigt werden, dass die alleinige Kombination von Cisplatin mit einer dieser Substanzen synergistische Effekte hervorrief und resistente Urothelkarzinomzellen anfälliger für die Cisplatin-Behandlung machte, als eine alleinige Behandlung. Sowohl Cordycepin als auch Prodigiosin interagieren nicht mit der DNA, NAMPT oder GSR und sind somit keine für diese Arbeit relevanten Inhibitoren. Hiermit soll nur verdeutlicht werden, dass eine Kombination von Cisplatin mit weiteren Inhibitoren zu synergistischen Effekten führen kann (Oh et al., 2020), (Berning et al., 2021). Dies unterstreicht nochmals, dass eine Kombinationsbehandlung der Schlüssel zur Umgehung der Cisplatinresistenz sein könnte.

Die Nutzung von Doxorubicin und Cisplatin als direkte Kombination ist klinisch bereits etabliert. Die Kombination ist zum Beispiel wichtiger Bestandteil im MVAC-Therapieschema des MIUCs und geht somit im Vergleich zu Daporinad und Cisplatin weit über das experimentelle *Setting* hinaus. Da sich in der Literatur nichts zu experimentellen Studien finden lässt, welche die Kombination von Cisplatin und Doxorubicin im Cisplatin-resistenten Setting bei UCs umfasst, werden hier Vergleiche zu klinischen Studien gezogen. Bei der Frage, ob die Kombination von Doxorubicin und Cisplatin effektiv wäre, wird das größte Augenmerk auf den Vergleich beider möglichen Chemotherapieregime für das UC gelegt. Im direkten Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen GC- und MVAC-Therapie, wodurch nach Empfehlungen durch eine nebenwirkungsärmere Therapie weiterhin eher GC als MVAC empfohlen wird (Pfister et al., 2024; von der Maase et al., 2005). Für die simultane Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin lässt sich schlussfolgern, dass sie in unseren Experimenten im Cisplatin-resistenten Setting eindeutig positiv signifikante Ergebnisse zeigte. Dies spiegelte sich in einem signifikant stärkeren Rückgang der Zellviabilität durch stärkere Apoptoseinduktion und synergistische Effekten wieder. Die zwischen Inhibitor und Cisplatin wirkende Synergie könnte eine mögliche Dosisreduktion der Medikamente bei der Behandlung bewirken, was sich positiv auf das Nebenwirkungsprofil auswirken könnte. Dennoch ist es fraglich, wie sich dies auf die klinische Einsetzbarkeit anwenden lässt und ob im Cisplatin-resistenten Setting der Therapie des MIUCs die Vorteile den Nebenwirkungen überlegen sein könnten.

Die Kombination von Daporinad und Cisplatin zeigte sich ebenfalls als sehr effektiv. Vor allem bei der Behandlung von T24LTT und 253JLTT war sie der alleinigen Cisplatin-Therapie, gerade im

höheren Dosierungsbereich, signifikant überlegen. Allerdings war der Unterschied zwischen Kombination und Daporinad-Monotherapie nicht ganz so deutlich, wie der Vergleich zwischen Kombination und Doxorubicin-Monotherapie. Alleine bei RT112LTT zeigte sich ein Vorteil der Kombination gegenüber Daporinad- und auch Cisplatin-Monobehandlung. Bei J82LTT zeigte sich erneut kein Vorteil. Auch ließen sich durch diese Kombinationsbehandlung bei T24LTT, 253JLTT und RT112LTT synergistische Effekte detektieren. Diese waren im Vergleich zur Doxorubicin-Kombination allerdings deutlich schwächer.

Daporinad scheint trotzdem eine sehr vielversprechende inhibitorische Substanz in der Therapie der Cisplatinresistenz zu sein. Pant et al, zeigten 2023, dass eine Kombination von Daporinad (FK866) mit Cisplatin, der alleinigen Cisplatin-Therapie, aber auch der alleinigen Daporinad-Therapie bei choleangiozellulären Karzinomen deutlich überlegen war. Es waren nur Daporinad-Dosierungen im niedrig nanomolaren Bereich nötig, um einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität zu bewirken (Pant et al., 2023). Auch bei Behandlung von T24LTT in unserer Arbeit reichten Daporinad-Dosierungen um 1 nM aus, um viabilitätsreduzierende Effekte zu erreichen. Allerdings ist anzumerken, dass es sich bei den verwendeten Choleangiozellulären-Karzinomzellen der Pant Studie nicht, wie bei den hier verwendeten UCCs, um Cisplatin-resistenten Zellen, sondern um naive Zellen handelte (Pant et al., 2023). Dieser deutliche Vorteil der Daporinad-Kombination gegenüber der Daporinad- und der Cisplatin-Monobehandlung aus der Studie ließ sich in unseren Experiementen nicht so eindeutig reproduzieren. Doch auch hier muss erneut der Unterschied zwischen Cisplatin-naiven und Cisplatin-resistenten Zellen beachtet werden. In unseren Experimenten überwog zwar der Vorteil der Kombination gegenüber der alleinigen Cisplatin-Behandlung, doch der Vorteil zur alleinigen Daporinad-Behandlung war wie erwähnt nicht bei allen LTTs so klar erkennbar. In der Studie zeigte sich die Kombination allerdings auch der alleinigen Daporinad-Behandlung deutlich überlegen (Pant et al., 2023). Dafür zeigten sich bei Pant et al. kaum Unterschiede im MTT zwischen Daporinad- und Cisplatin-Einzelbehandlung, bei ungefähr äquivalenter Dosis (Pant et al., 2023). In dem bei uns gezeigten Versuch schien allerdings bereits die Daporinad-Einzelbehandlung weitaus effektiver zu sein als eine alleinige Cisplatin-Therapie. Zudem war bei Daporinad-Behandlung eine deutlich geringere Dosis nötig, um bei den LTTs in einem therapeutischen Bereich Effekte zu erzielen als mit Cisplatin. Diese niedrige Daporinad-Dosis war gleichzeitig für mögliche toxische Effekte an benignen Urothelzellen deutlich zu niedrig. Bei Cisplatin Behandlung war es genau umkehrt. Halbletale Dosierungen von Cisplatin der LTTs waren fast 100-fach höher als bei benignen Urothelzellen. Es stellt sich somit die Frage, ob dies wirklich an einem starken resensitivierenden Effekt durch die NAMPT-Inhibition liegt, oder ob Daporinad, beziehungsweise die NAMPT-Inhibition, ein neuer Weg der effektiven UC-Therapie darstellen könnte. Wäre dies der Fall könnten durch Daporinad-Behandlung vielleicht unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf benigne Gewebe reduziert werden. Zudem wäre es wichtig vor Therapie zu wissen, ob die jeweiligen resistenten

Tumorzellen einen zusätzlichen Weg zur NAD-Regeneration ausgebildet haben, wie den NAPRT-Weg, da dies die Effektivität eines NAMPT- Inhibitors wieder stark einschränken könnte. Zu Kombinationen von einem NAMPT-Inhibitor mit Cisplatin im Falle von Cisplatin-resistenten Zellen ließ sich in der Literatur nichts zum Vergleich finden.
Für eine simultane Daporinad-Kombination lässt sich somit festhalten, dass sie der alleinigen Cisplatin-Behandlung durchaus überlegen ist. Auch lassen sich synergistische Effekte detektieren, was ein Argument für die Kombination beider Substanzen wäre. Allerdings zeigte sich kein so großer Vorteil der Kombination gegenüber der alleinigen Daporinad-Behandlung im Cisplatin-resistenten Setting.

Zusätzlich zu den positiven Effekten beider Kombinationen lässt sich auch vermerken, dass keine der Kombinationen, weder mit Doxorubicin noch mit Daporinad, toxischer auf benigne Zellen zu wirken schien, als die jeweiligen Einzelbehandlungen. Die hierbei erwähnten toxischen Wirkungen beziehen sich allerdings nur auf die Gewebe der jeweiligen Zelllinie. Wie sich die Kombinationen, insbesondere Daporinad und Cisplatin, auf andere Organsysteme auswirken würde, ist fraglich. Trotz der äquivalenten Toxizität der Kombination zur Cisplatin- bzw. Doxorubicin-Monobehandlung ließen sich bei beiden benignen Zelllinien synergistische Effekte nachweisen. Diese synergistischen Effekte waren nochmals deutlicher bei HBLAK als bei HBF zu erkennen. Sowohl bei NAMPT und gerade auch bei TOP2A ließ sich bei HBLAK wenig bis kein erhöhtes Proteinniveau detektieren. Dies lässt möglicherweise die Schlussfolgerung zu, dass Synergie zwischen Cisplatin und einer inhibitorischen Substanz nicht zwingend ein erhöhtes Proteinniveau benötigt.

Als Erklärungsansatz für die Effektivität der simultanen Kombination wollten wir nachweisen, ob der stärkere Rückgang der Zellviablität durch Apoptoseiniitierung hervorgerufen wurde. Gemessen werden konnte dies durch die Stärke der Caspaseaktivität nach Kombinationsbehandlung. Sowohl bei der Kombination aus Daporinad und Cisplatin, als auch bei Doxorubicin und Cisplatin, konnte im Vergleich zur Kontrolle und den Monobehandlungen eine stärkere Apoptoseinitiierung detektiert werden. Bei beiden Kombinationen im Vergleich war dieser Effekt bei Doxorubicin und Cisplatin deutlich ausgeprägter. Dies könnte eine Erklärung für die effektivere Reduktion der Zellviabilität im MTT sein. Somit würde eine stärkere Reduktion der Zellviabilität im MTT mit einer stärkeren Apoptoseinitiierung korrelieren. Zudem unterstreicht es die Relevanz der durch Doxorubicin und Cisplatin hervorgerufenen synergistischen Effekte. Der Nachweis durch stärkere Apoptoseinduktion bedeutet möglicherweise, dass die Kombinationsbehandlung zu einer Reduktion der Tumorgröße führen könnte. Das würde heißen, dass eine Therapie nicht nur zum Stopp der Tumorzellteilung führen würde, sondern tatsächlich einen Rückgang der Tumorgröße und gegebenenfalls sogar zur vollständigen Regression führen können. Bereits 2003 konnte durch Hasmann et al. nachgewiesen

werden, dass durch Verwendung von Daporinad (FK866) Zelltod durch Apoptoseinduktion ausgelöst wird (Hasmann & Schemainda, 2003). Auch in weiteren Studien ähnlich wie bei Behandlung der LTTs, konnte detektiert werden, dass bei Behandlung von Ovarialkarzinom-Zellen mit Doxorubicin und Cisplatin eine verstärkte Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte (Fabbri et al., 2016). Betrachtet man somit die Effekte die in Studien nachgewiesen wurden, sowie die Ergebnisse in unseren Experimenten, wird insgesamt unterstrichen, dass durch die Kombinationen synergistische Effekte entstehen, welche als Erklärungsansatz für die stärkere Zelltodinduktion dienen könnten.

Als abschließendes Fazit scheinen beide Kombinationsmöglichkeiten auf ihre eigene Art und Weise erfolgsversprechend für die Therapie des MIUCs zu sein. Doxorubicin zeigte in der direkten Kombination stärkere Effekte als Daporinad, sowohl im Vergleich zur Einzelbehandlung, als auch auf den stärkeren Rückgang der Zellviabilität durch Zelltodinduktion. Dies lässt sich auf starke Induktion synergistischer Effekte zwischen Doxorubicin und Cisplatin beziehen. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass man bei der Therapie mit Doxorubicin als gängiges Zytostatikum bereits, ebenso wie mit Cisplatin, auf Patienten mit Resistenzen trifft (Meinag et al., 2024). Auf der anderen Seite zeigte die Kombination von Daporinad als NAMPT-Inhibitor und Cisplatin nach Vorbehandlung signifikante Vorteile zu nicht vorbehandelten Zellen. In der direkten Kombination von Daporinad und Cisplatin waren zwar auch positive Effekte detektierbar, doch überwogen sie nicht der Effektivität der Daporinad-Monobehandlung. Möglicherweise bestünde mit Daporinad die Möglichkeit einer Monotherapie ohne Cisplatin. Dies würde in gewisser Weise das Cisplatin-Resistenzproblem ebenfalls umgehen. Doch es ist festzuhalten, dass Daporinad noch nicht klinisch zugelassen ist und man somit noch nicht genug über mögliche Effektivität oder Toxizität des Wirkstoffes im *Patientensetting* weiß, um sagen zu können, wie die Einsetzbarkeit in der Therapie wäre.
Sowohl eine Kombination durch Vorbehandlung als auch eine simultane Kombination wirkte nicht signifikant toxischer auf benigne Zellen. Somit zeigten beide getesteten Wirkstoffe in jeweils einer der beiden Kombinationsoptionen einen deutlichen Vorteil ohne gleichzeitig zu schädlich auf benigne Zellen zu wirken.

4.3. Gibt es neue Therapieansätze, um Cisplatin-resistente UC-Zellen effizient zu behandeln?

Es wurde bereits mehrfach das Augenmerk auf die Relevanz von Cisplatin in der Therapie des MIUCs, sowie die, durch die immer häufiger auftretende Resistenz, eingeschränkte Einsetzbarkeit in der Klinik gelegt (Drayton & Catto, 2012). Zeitgleich ist der Einsatz des Medikaments aber auch durch seine starken Nebenwirkungen, gerade bei multimorbiden Patienten, stark limitiert (Romani,

2022). In neuen Auflagen der aktuellen Leitlinie zur Therapie des Urothelkarzinoms besteht bereits für Patienten mit metastasiertem oder nicht-resezierbarem Urothelkarzinom eine platinfreie Erstlinientherapieoption (Bundesausschuss, 2025). Somit wird zwar primär eine platinhaltige Erstlinientherapie vorgesehen, ist allerdings nicht mehr die einzige bestehende Option. Andererseits ist der Einsatz von platinfreien Medikamenten oftmals durch verschiedene Faktoren, wie das Expressionsmuster der Zielstrukturen, eingeschränkt, sodass nicht alle Patienten von einer Therapie profitieren könnten (Lewerich et al. (2023)).

Ein neues therapeutisches Angriffsziel könnten *Heat-Shock-Proteine* (Hsp) sein, da sie auch in der Tumorentstehung relevant sein können (Youssef et al., 2023). Auch in der Genese von Urothelkarzinomen, sowie deren Prognose und Therapieoption spielen sie eine immer größere Rolle (Ischia & So, 2013). Möglicherweise ließe sich Cisplatin für die Therapie des MIUC durch einen geeigneten Hsp-Inhibitor ersetzen? Um diese Hypothese zu testen, wurde die simultane Kombinationsversuchsreihe mit Ganetespib als Hsp90 Inhibitor wiederholt. Als Hsp-Inhibitor eignete sich Ganetespib wegen seines besseren Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu anderen Inhibitoren (Youssef et al., 2023). Zudem zeigte Ganetespib ein gutes Ansprechen der LTTs im *Drug Screen* der Arbeitsgruppe. Außerdem konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass LTTs deutlich sensitiver in einem Zellviabilitätsassay reagierten als ihre parentalen Zelllinien.

In den hier durchgeführten MTT-Einzeltestungen konnte das sensitivere Ansprechen der LTTs allerdings nicht rekonstruiert werden. T24LTT und J82LTT benötigten deutlich höhere Mengen von Ganetespib als T24 und J82. Fraglich war nach diesen Experimenten, ob es sich um methodische Ungenauigkeiten oder Behandlungsfehler handeln könnte. Es lagen somit positive Daten aus der Literatur, sowie positive Ergebnisse aus Vorarbeiten, als auch das gegenteilige Ergebnis aus dieser Arbeit vor. Zur weiterführenden Überprüfung der obigen Frage wurde ein Kombinationsversuch mit Ganetespib aufgesetzt.

Lai et al, zeigten 2014, dass bei der Kombination von Ganetespib und Doxorubicin synergistische Effekte in der Therapie bei kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) auftraten. Die verwendeten Ganetespib Dosierungen waren mit einem IC_{50} von 31 nM zudem ähnlich zu den von uns verwendeten Dosierungen (Lai et al., 2014). Doxorubicin bot sich somit als optimaler Kombinationspartner an. Denn einerseits zeigten sich vorbeschriebene Synergien (Lai et al., 2014) und zum anderen zeigt Doxorubicin als bestehendes und erprobtes Zytostatikum in der UC-Therapie bereits Verwendung. Gleichzeitig war Doxorubicin ein effektives Medikament in der von uns durchgeführten simultanen Kombination mit Cisplatin.

Bei der Behandlung von J82LTT zeigte sich wie in den anderen Experimenten kaum bis kein Ansprechen auf die Therapie. Bei Auswertung des Versuches mit T24LTT konnte man allerdings erkennen, dass die Verwendung der Kombination mit Ganetespib und Doxorubicin stärkere Effekte aufwies als beide Einzelbehandlungen. Dies ist möglicherweise auf die bereits von Lai et al

beschriebenen synergistischen Effekte in SCLC-Zellen zurückzuführen. Dass diese synergistischen Effekte auf UC-Zellen übertragbar sind, ließ sich in unserer Synergietestung nachweisen. Paradoxerweise waren diese synergistischen Effekte bei J82LTT stärker ausgeprägt als bei T24LTT. Eine Kombination beider Medikamente schien bei T24LTT sogar effektiver zu sein als eine Kombination von Doxorubicin und Cisplatin. Dies lässt auf die ursprüngliche Vermutung rückschließen, dass Cisplatin wohlmöglich in der Therapie durch Ganetespib, oder andere Hsp90-Inhibitoren ersetzbar wäre. Bisher liegt noch keine klinische Zulassung, doch bereits mehrere klinische Studien, für Hsp90-Inhibitoren vor (Li & Luo, 2023).

Die hier aufgeführten Versuche mit Ganetespib dienten nur als Ausblick, welche weiteren Möglichkeiten sich bieten würden, um eine Cisplatinresistenz umgehen zu können. Um wirklich bestätigen zu können, dass Ganetespib ein möglicher Kandidat wäre, um Cisplatin zu ersetzen, müssten die Versuche wiederholt und zusätzlich an anderen resistenten UC-Zellen, wie 253JLTT und RT112LTT durchgeführt werden.

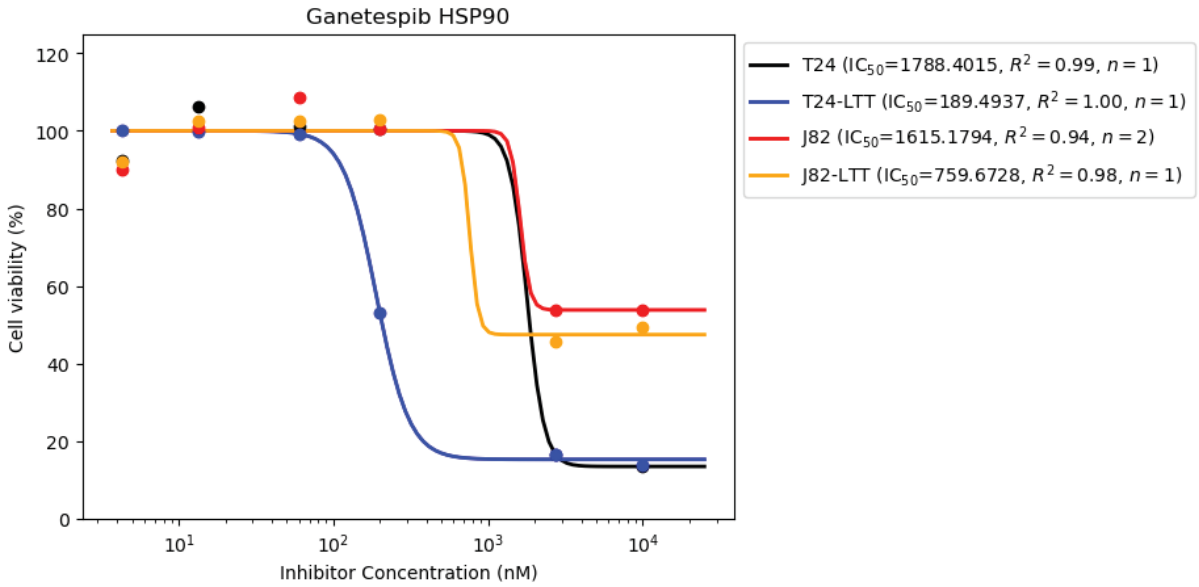

Abb. 45. **Ergebnisse aus Vorarbeiten der AG zu Ganetespib aus dem *Drug Screen***. Verglichen wurden die Viablität der beiden Zelllinienpaare T24 und T24LTT und J82 und J82LTT nach einer 72 stündigen Behandlung mit Gantespib. Die Abszisse zeigt die Konzentration von Ganetespib in nM an und die Ordinate die Zellviabiliät in %. (Hsp = *Heat-Shock-Protein*, nM = Nanomolar, IC50 = halbletale Dosis)

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Mit Hilfe der Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sowie Vergleiche zur Literatur, lässt sich die Fragestellung vom Anfang der Arbeit wie folgt beantworten:

Die in Vorarbeiten ermittelten abundanten Proteine in LTTs waren NAMPT, GSR und TOP2A. Es war uns möglich herauszufinden, dass diese in der Tat stärker exprimiert in Cisplatin-resistenten

Tumorzellen vorlagen. Auch war es uns möglich zu zeigen, dass Cisplatin-resistente UC-Zellen empfindlicher auf die Inhibitoren von NAMPT (Daporinad) und TOP2A (Doxorubicin) reagierten als ihre Cisplatin-naiven Parentalzelllinien. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Effekte vor allem auf einer Aktivierung von Apoptose beruhten.

Durch Vorbehandlung der Cisplatin-resistenten UC-Zellen mit Doxorubicin war es nicht möglich sie ausreichend für Cisplatin zu resensitivieren. Durch Vorbehandlung mit Daporinad ließ sich bei T24LTT ein Vorteil erzielen, dieser müsste allerdings in weiteren Experimenten validiert werden. Durch simultane Behandlung mit Daporinad bzw. Doxorubicin und Cisplatin konnte allerdings eine stärkere Reduktion der Zellviabilität erreicht werden als mit ihren Monobehandlungen. Dies beruhte auf synergistischen Effekten sowie Apoptoseinduktion. Hier zeigte sich vor allem die Kombination aus Doxorubicin und Cisplatin erfolgreicher. Da es sich bei Daporinad um eine noch nicht klinisch zugelassene Substanz handelt, wäre eine Kombinationsbehandlung von Daporinad und Cisplatin außerhalb von zellulären Experimenten - z.B. in Tierexperimenten – empfehlenswert, um mögliche Nebenwirkungen zu ermitteln.

Zudem konnten durch die Untersuchungen von Ganetespib erste Ergebnisse zu einer wirksamen Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin für das UC erarbeitet werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass wir durch die Erkenntnisse dieser Arbeit dem Verständnis und auch Möglichkeiten zur Überwindung der Cisplatinresistenz in Urothelkarzinom Zellen um einiges nähergekommen sind.

4.5. Exkurs: Bieten *Antibody Drug Conjugates* einen Ausweg aus der platinhaltigen Erstlinientherapie

Eine weitere Hoffnung bei Therapieversagen der konventionellen platinhaltigen Chemotherapie und der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, stellt die Therapie mit *Antibody Drug Conjugates* (ADC) dar. Enfortumab vedotin (EV), als Nectin-4 ADC, und Sacituzumab govitecan (SG), als TROP2 ADC, sind bereits beide für die Therapie zugelassen (Kim & Chang, 2022). Nach neusten Änderungen der Leitlinie steht nun auch in Deutschland die Kombination von EV und Pembrolizumab als PD-1 Inhibitor für Patienten mit metastasiertem und nicht-resezierbarem Urothelkarzinom als Erstlinientherapie zur Verfügung (Bundesausschuss, 2025). Standardempfehlung bleibt allerdings bis auf Weiteres die platinhaltige Kombinationschemotherapie ((AWMF), 2025).

Anders als bei der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren müssen Patienten mit MIUCs keinen positiven immunhistochemischen Nachweis aufweisen, um ADCs als Therapieoption nutzen zu können (Singh et al., 2023). Nichtsdestotrotz wäre es, auch für die Option einen prädiktiven Marker zu haben, interessant zu wissen, ob sich die Nectin-4 und TROP2 Expression in UCCs als Biomarker nutzen lassen würden.

Im Test mit den in der Arbeit verwendeten UCCs, sowohl Cisplatin-sensitive als auch -resistente Zelllinien, ließ sich keine Nectin-4 Proteinexpression mittels Western Blot in den UCCs nachweisen. Dass es sich hierbei um einen methodischen Fehler handeln könnte, oder der Antikörper versagt haben könnte, wurde nahezu ausgeschlossen, da sich bei der Zelllinie HBLAK, als positiv Kontrolle, eine Proteinexpression detektieren ließ.

Für TROP2 hingegen ließen sich in allen getesteten UCCs Proteinnachweise feststellen. In den LTTs ließ sich ein geringeres Proteinniveau darstellen als in den Cisplatin-sensitiven Zelllinien. Ob dies Rückschluss auf die Effektivität einer ADC-Therapie bei resistenten UCCs gibt, ist allerdings unklar. In Studien zeigten sich EV und SG bereits als effektive Therapieoption bei therapierefraktären UCC-Patienten unter Cisplatin-haltiger Chemotherapie (Singh et al., 2023). Singh et al., berichteten zudem, dass TROP2 als potenzieller Biomarker verwendet werden könnte, ob eine Korrelation zwischen Expressionsmuster und Ansprechen auf das jeweilige ADC bestehen würde, sei allerdings noch unklar (Singh et al., 2023).

Brunelli et al., berichteten wiederum 2024, dass UCCs in verschiedenen Differenzierungsstadien ein sehr heterogenes Muster der Biomarker Expression für TROP2 und Nectin-4 aufwiesen, was sowohl die Nutzung eines prädiktiven Markers als auch die Wirksamkeit der Therapie beeinflussen könnte (Brunelli et al., 2024).

Zukünftig müssten die in dieser Arbeit verwendeten LTT-Zelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber ADCs überprüft werden und das Proteinniveau erneut über Antikörperfärbung vitaler Zellen und anschließende Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

(AWMF), A. d. W. M. F. (2025). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms*. https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-038OLl_S3_Frueherkennung-Diagnose-Therapie-Nachsorge-Harnblasenkarzinom_2025-04.pdf (17.06.2026)

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

Ali, Y., & Abd Hamid, S. (2016). Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumour Biol*, *37*(1), 47–55. https://doi.org/10.1007/s13277-015-4270-9

Babjuk, M., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E. M., Dominguez Escrig, J. L., Gontero, P., Liedberg, F., Masson-Lecomte, A., Mostafid, A. H., Palou, J., van Rhijn, B. W. G., Roupret, M., Shariat, S. F., Seisen, T., Soukup, V., & Sylvester, R. J. (2022). European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol*, *81*(1), 75–94. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.010

Berning, L., Schlutermann, D., Friedrich, A., Berleth, N., Sun, Y., Wu, W., Mendiburo, M. J., Deitersen, J., Brass, H. U. C., Skowron, M. A., Hoffmann, M. J., Niegisch, G., Pietruszka, J., & Stork, B. (2021). Prodigiosin Sensitizes Sensitive and Resistant Urothelial Carcinoma Cells to Cisplatin Treatment. *Molecules*, *26*(5). https://doi.org/10.3390/molecules26051294

Brunelli, M., Gobbo, S., Malpeli, G., Sirgiovanni, G., Caserta, C., Munari, E., Francesconi, S., Calio, A., Martignoni, G., Cimadamore, A., Veccia, A., Antonelli, A., Tucci, M., Pierconti, F., Hattab, I. M., Eccher, A., Ascani, S., Milella, M., Buffoni, L.,…Bracarda, S. (2024). TROP-2, NECTIN-4 and predictive biomarkers in sarcomatoid and rhabdoid bladder urothelial carcinoma. *Pathologica*, *116*(1), 55–61. https://doi.org/10.32074/1591-951X-937

Bundesausschuss, G. (2025). *Nutzenbewertung Enfortumab Vedotin (Erstlinie, metastasiertes oder nicht resezierbares Urothelkarzinom), Kombination mit Pembrolizumab – Beschluss nach § 35a SGB V*. (/). Berlin: G-BA Retrieved from https://www.g-ba.de/bewertungsverfahren/nutzenbewertung/1133/#beschluesse (17.06.2026)

Chan, Y. Y., Kalpana, S., Chang, W. C., Chang, W. C., & Chen, B. K. (2013). Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator enhances cisplatin resistance by upregulating MDR1 expression in cancer cells. *Mol Pharmacol*, *84*(4), 591–602. https://doi.org/10.1124/mol.113.087197

Chou, J., Trepka, K., Sjostrom, M., Egusa, E. A., Chu, C. E., Zhu, J., Chan, E., Gibb, E. A., Badura, M. L., Contreras-Sanz, A., Stohr, B. A., Meng, M. V., Pruthi, R. S., Lotan, Y., Black, P. C., Porten, S. P., Koshkin, V. S., Friedlander, T. W., & Feng, F. Y. (2022). TROP2 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma and Enfortumab Vedotin-resistant Cells. *Eur Urol Oncol*, *5*(6), 714–718. https://doi.org/10.1016/j.euo.2021.11.005

Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, *22*, 27–55. https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4

Dabholkar, M., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V. A., Egwuagu, C., & Reed, E. (1992). ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, *84*(19), 1512–1517. https://doi.org/10.1093/jnci/84.19.1512

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, *740*, 364–378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025

de Souza, L. F., Schmitz, A. E., da Silva, L. C. S., de Oliveira, K. A., Nedel, C. B., Tasca, C. I., de Bem, A. F., Farina, M., & Dafre, A. L. (2017). Inhibition of reductase systems by 2-AAPA modulates peroxiredoxin oxidation and mitochondrial function in A172 glioblastoma cells. *Toxicol In Vitro*, *42*, 273–280. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.028

Dobruch, J., Daneshmand, S., Fisch, M., Lotan, Y., Noon, A. P., Resnick, M. J., Shariat, S. F., Zlotta, A. R., & Boorjian, S. A. (2016). Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of

Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*, *69*(2), 300–310. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.037

Drayton, R. M., & Catto, J. W. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, *12*(2), 271–281. https://doi.org/10.1586/era.11.201

Elfadadny, A., Ragab, R. F., Hamada, R., Al Jaouni, S. K., Fu, J., Mousa, S. A., & El-Far, A. H. (2023). Natural bioactive compounds-doxorubicin combinations targeting topoisomerase II-alpha: Anticancer efficacy and safety. *Toxicol Appl Pharmacol*, *461*, 116405. https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116405

Fabbri, R., Macciocca, M., Vicenti, R., Paradisi, R., Klinger, F. G., Pasquinelli, G., Spisni, E., Seracchioli, R., & Papi, A. (2016). Doxorubicin and cisplatin induce apoptosis in ovarian stromal cells obtained from cryopreserved human ovarian tissue. *Future Oncol*, *12*(14), 1699–1711. https://doi.org/10.2217/fon-2016-0032

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, *31*(15), 1869–1883. https://doi.org/10.1038/onc.2011.384

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K.,…Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, *25*(3), 486–541. https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4

Hafeez, U., Parakh, S., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2020). Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*, *25*(20). https://doi.org/10.3390/molecules25204764

Hagymasi, A. T., Dempsey, J. P., & Srivastava, P. K. (2022). Heat-Shock Proteins. *Curr Protoc*, *2*(11), e592. https://doi.org/10.1002/cpz1.592

Harris, I. S., Treloar, A. E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K. C., Yung, K. Y., Brenner, D., Knobbe-Thomsen, C. B., Cox, M. A., Elia, A., Berger, T., Cescon, D. W., Adeoye, A., Brustle, A., Molyneux, S. D., Mason, J. M., Li, W. Y., Yamamoto, K.,…Mak, T. W. (2015). Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell*, *27*(2), 211–222. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019

Hasan, A. A., Kalinina, E., Nuzhina, J., Volodina, Y., Shtil, A., & Tatarskiy, V. (2023). Potentiation of Cisplatin Cytotoxicity in Resistant Ovarian Cancer SKOV3/Cisplatin Cells by Quercetin Pre-Treatment. *Int J Mol Sci*, *24*(13). https://doi.org/10.3390/ijms241310960

Hasmann, M., & Schemainda, I. (2003). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*, *63*(21), 7436–7442.

Ischia, J., & So, A. I. (2013). The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nat Rev Urol*, *10*(7), 386–395. https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.108

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(22), 14298–14302. https://doi.org/10.1073/pnas.162491399

Janson, V., Johansson, A., & Grankvist, K. (2010). Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell Death Dis*, *1*(9), e78. https://doi.org/10.1038/cddis.2010.54

Kim, J. H., & Chang, I. H. (2022). A novel strategy for treatment of bladder cancer: Antibody-drug conjugates. *Investig Clin Urol*, *63*(4), 373–384. https://doi.org/10.4111/icu.20220061

Lai, C. H., Park, K. S., Lee, D. H., Alberobello, A. T., Raffeld, M., Pierobon, M., Pin, E., Petricoin Iii, E. F., Wang, Y., & Giaccone, G. (2014). HSP-90 inhibitor ganetespib is synergistic with doxorubicin in small cell lung cancer. *Oncogene*, *33*(40), 4867–4876. https://doi.org/10.1038/onc.2013.439

Lebret, T., Watson, R. W., Molinie, V., O'Neill, A., Gabriel, C., Fitzpatrick, J. M., & Botto, H. (2003). Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*, *98*(5), 970–977. https://doi.org/10.1002/cncr.11594

Lenis, A. T., Lec, P. M., Chamie, K., & Mshs, M. D. (2020). Bladder Cancer: A Review. *JAMA*, *324*(19), 1980–1991. https://doi.org/10.1001/jama.2020.17598

Lewerich, J., Schmid, S. C., Gschwend, J. E., & Retz, M. (2023). [Value of immunotherapy in the perioperative treatment of localized muscle invasive bladder cancer]. *Urologie*, *62*(3), 279–287. https://doi.org/10.1007/s00120-022-01983-5

Li, X., Jiang, Z., Feng, J., Zhang, X., Wu, J., & Chen, W. (2017). 2-Acetylamino-3-[4-(2-acetylamino-2-carboxyethylsulfanylcarbonylamino) phenyl carbamoylsulfanyl] propionic acid, a glutathione reductase inhibitor, induces G(2)/M cell cycle arrest through generation of thiol oxidative stress in human esophageal cancer cells. *Oncotarget*, *8*(37), 61846–61860. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18705

Li, X. Q., Lei, J., Mao, L. H., Wang, Q. L., Xu, F., Ran, T., Zhou, Z. H., & He, S. (2019). NAMPT and NAPRT, Key Enzymes in NAD Salvage Synthesis Pathway, Are of Negative Prognostic Value in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, *9*, 736. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00736

Li, Z. N., & Luo, Y. (2023). HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncol Rep*, *49*(1). https://doi.org/10.3892/or.2022.8443

Lin, T. C. (2022). Updated Functional Roles of NAMPT in Carcinogenesis and Therapeutic Niches. *Cancers (Basel)*, *14*(9). https://doi.org/10.3390/cancers14092059

Liu, Y., Shi, L., Yuan, C., Feng, Y., Li, M., Liu, H., Chen, X., Yao, D., & Wang, Q. (2023). Downregulation of ITIH3 contributes to cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian carcinoma via the Bcl-2 mediated anti-apoptosis signaling pathway. *Oncol Lett*, *25*(2), 61. https://doi.org/10.3892/ol.2022.13646

Lobo, N., Afferi, L., Moschini, M., Mostafid, H., Porten, S., Psutka, S. P., Gupta, S., Smith, A. B., Williams, S. B., & Lotan, Y. (2022). Epidemiology, Screening, and Prevention of Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol*, *5*(6), 628–639. https://doi.org/10.1016/j.euo.2022.10.003

Lugones, Y., Loren, P., & Salazar, L. A. (2022). Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved. *Biomolecules*, *12*(10). https://doi.org/10.3390/biom12101365

Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*, *53*(2), 148–158. https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018

Meinag, F. E., Fatahi, M., Vahedian, V., Maroufi, N. F., Mosayyebi, B., Ahmadi, E., & Rahmati, M. (2024). Modulatory effects of miRNAs in doxorubicin resistance: A mechanistic view. *Funct Integr Genomics*, *24*(5), 150. https://doi.org/10.1007/s10142-024-01431-x

Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*, *251*, 3–7. https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)51106-7

Mierzejewska, P., Gawlik-Jakubczak, T., Jablonska, P., Czajkowski, M., Kutryb-Zajac, B., Smolenski, R. T., Matuszewski, M., & Slominska, E. M. (2018). Nicotinamide metabolism alterations in bladder cancer: Preliminary studies. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, *37*(12), 687–695. https://doi.org/10.1080/15257770.2018.1535124

Mohammadian, M., Feizollahzadeh, S., Mahmoudi, R., Toofani Milani, A., Rezapour-Firouzi, S., & Karimi Douna, B. (2020). Hsp90 Inhibitor; NVP-AUY922 in Combination with Doxorubicin Induces Apoptosis and Downregulates VEGF in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*, *21*(6), 1773–1778. https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.6.1773

Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N., & Takebayashi, Y. (2002). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*, *101*(5), 488–495. https://doi.org/10.1002/ijc.10608

Navas, L. E., Blanco-Alcaina, E., Suarez-Martinez, E., Verdugo-Sivianes, E. M., Espinosa-Sanchez, A., Sanchez-Diaz, L., Dominguez-Medina, E., Fernandez-Rozadilla, C., Carracedo, A., Wu, L. E., & Carnero, A. (2023). NAD pool as an antitumor target against cancer stem cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, *42*(1), 55. https://doi.org/10.1186/s13046-023-02631-2

Oh, S. S., Lee, K. W., Madhi, H., Jeong, J. W., Park, S., Kim, M., Lee, Y., Han, H. T., Hwangbo, C., Yoo, J., & Kim, K. D. (2020). Cordycepin Resensitizes T24R2 Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells to Cisplatin by Inactivating Ets-1 Dependent MDR1 Transcription. *Int J Mol Sci*, *21*(5). https://doi.org/10.3390/ijms21051710

Pant, K., Richard, S., Peixoto, E., Yin, J., Seelig, D. M., Carotenuto, P., Salati, M., Franco, B., Roberts, L. R., & Gradilone, S. A. (2023). The NAMPT Inhibitor FK866 in Combination with Cisplatin Reduces Cholangiocarcinoma Cells Growth. *Cells*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/cells12050775

Park, M., Lee, B. I., Choi, J., Park, Y., Park, S. J., Lim, J. H., Lee, J., & Shin, Y. G. (2022). Quantitative Analysis of Daporinad (FK866) and Its In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Using Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules*, *27*(6). https://doi.org/10.3390/molecules27062011

Patel, V. G., Oh, W. K., & Galsky, M. D. (2020). Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin*, *70*(5), 404–423. https://doi.org/10.3322/caac.21631

Pfister, C., Gravis, G., Flechon, A., Chevreau, C., Mahammedi, H., Laguerre, B., Guillot, A., Joly, F., Soulie, M., Allory, Y., Harter, V., Culine, S., & Investigators, V. T. (2024). Perioperative dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in muscle-invasive bladder cancer (VESPER): survival endpoints at 5 years in an open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, *25*(2), 255–264. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00587-9

Powles, T., Valderrama, B. P., Gupta, S., Bedke, J., Kikuchi, E., Hoffman-Censits, J., Iyer, G., Vulsteke, C., Park, S. H., Shin, S. J., Castellano, D., Fornarini, G., Li, J. R., Gumus, M., Mar, N., Loriot, Y., Flechon, A., Duran, I., Drakaki, A.,…Investigators, E. V. T. (2024). Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. *N Engl J Med*, *390*(10), 875–888. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2312117

Regimbeau, M., Abrey, J., Vautrot, V., Causse, S., Gobbo, J., & Garrido, C. (2022). Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics. *Semin Cancer Biol*, *86*(Pt 1), 46–57. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.07.014

Riccardi, F., Dal Bo, M., Macor, P., & Toffoli, G. (2023). A comprehensive overview on antibody-drug conjugates: from the conceptualization to cancer therapy. *Front Pharmacol*, *14*, 1274088. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1274088

Romani, A. M. P. (2022). Cisplatin in cancer treatment. *Biochem Pharmacol*, *206*, 115323. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115323

Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S. M. A., Hosseini-Fard, S. R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'Byrne, K., & Kulasinghe, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol*, *29*(5), 3044–3060. https://doi.org/10.3390/curroncol29050247

Singh, A. M., Guevara-Patino, J. A., Wang, X., Li, R., Sonpavde, G., & Jain, R. K. (2023). Antibody-Drug Conjugates in the Treatment of Urothelial Cancer. *BioDrugs*, *37*(4), 505–520. https://doi.org/10.1007/s40259-023-00606-5

Skowron, M. A., Melnikova, M., van Roermund, J. G. H., Romano, A., Albers, P., Thomale, J., Schulz, W. A., Niegisch, G., & Hoffmann, M. J. (2018). Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*, *19*(2). https://doi.org/10.3390/ijms19020590

Skowron, M. A., Niegisch, G., Albrecht, P., van Koeveringe, G., Romano, A., Albers, P., Schulz, W. A., & Hoffmann, M. J. (2017). Various Mechanisms Involve the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like (NRF2) to Achieve Cytoprotection in Long-Term Cisplatin-Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*, *18*(8). https://doi.org/10.3390/ijms18081680

Sorahan, T. (2008). Bladder cancer risks in workers manufacturing chemicals for the rubber industry. *Occup Med (Lond)*, *58*(7), 496–501. https://doi.org/10.1093/occmed/kqn104

Su, M., Qiu, F., Li, Y., Che, T., Li, N., & Zhang, S. (2024). Mechanisms of the NAD+ salvage pathway in enhancing skeletal muscle function [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *Volume 12 - 2024*. https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1464815

Timerbaev, A. R., Hartinger, C. G., Aleksenko, S. S., & Keppler, B. K. (2006). Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev*, *106*(6), 2224–2248. https://doi.org/10.1021/cr040704h

Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., & Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*, *2013*, 972913. https://doi.org/10.1155/2013/972913

von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A., & Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, *23*(21), 4602–4608. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.757

Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, *65*, 635–692. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.003223

Xu, Q., Liu, X., Mohseni, G., Hao, X., Ren, Y., Xu, Y., Gao, H., Wang, Q., & Wang, Y. (2022). Mechanism research and treatment progress of NAD pathway related molecules in tumor immune microenvironment. *Cancer Cell Int*, *22*(1), 242. https://doi.org/10.1186/s12935-022-02664-1

Xu, R., Yuan, Z., Yang, L., Li, L., Li, D., & Lv, C. (2017). Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress. *Oncol Rep*, *38*(3), 1767–1773. https://doi.org/10.3892/or.2017.5793

Youssef, M. E., Cavalu, S., Hasan, A. M., Yahya, G., Abd-Eldayem, M. A., & Saber, S. (2023). Role of Ganetespib, an HSP90 Inhibitor, in Cancer Therapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Practice. *Int J Mol Sci*, *24*(5). https://doi.org/10.3390/ijms24055014

Zacharis, A., & Grullich, C. (2020). [First-line treatment of metastatic urothelial carcinoma : Update immuno-oncology]. *Urologe A*, *59*(7), 797–803. https://doi.org/10.1007/s00120-020-01235-4

Zameer, U., & Shaikh, W. (2024). A new era for bladder cancer: Enfortumab vedotin and pembrolizumab milestone approval. *Tumori*, *110*(4), 295–296. https://doi.org/10.1177/03008916231221508

Zargar, P., Koochakkhani, S., Hassanzadeh, M., Ashouri Taziani, Y., Nasrollahi, H., & Eftekhar, E. (2022). Downregulation of topoisomerase 1 and 2 with acriflavine sensitizes bladder cancer cells to cisplatin-based chemotherapy. *Mol Biol Rep*, *49*(4), 2755–2763. https://doi.org/10.1007/s11033-021-07087-1

Zeng, S., Liu, A., Dai, L., Yu, X., Zhang, Z., Xiong, Q., Yang, J., Liu, F., Xu, J., Xue, Y., Sun, Y., & Xu, C. (2019). Prognostic value of TOP2A in bladder urothelial carcinoma and potential molecular mechanisms. *BMC Cancer*, *19*(1), 604. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5814-y