

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Chirurgie  
Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Otto Bechstein

**Etablierung innovativer Strategien zur Resistenzumgehung bei  
der Therapie des Urothelkarzinoms**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Ramin Najafi

aus Kabul

Frankfurt am Main, 2017

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Roman Blaheta

Korreferent: Prof. Dr. Wolf Otto Bechstein

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	i
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	iii
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	iiii
<b>IV</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	v
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	Krebs.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
1.1.1	Blasenkarzinom und Einteilung.....	1
1.1.2.	Epidemiologie .....	2
1.1.3.	Risikofaktoren .....	3
1.1.4.	Diagnose.....	3
1.1.5.	Therapiemethoden.....	4
1.2.	Neue Therapiewege .....	5
1.2.1.	PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade.....	5
1.2.1.1.	mTOR im Blasenkarzinom.....	6
1.2.1.2.	Inhibition der mTOR Signalkaskade .....	7
1.2.1.3.	Temsirolimus.....	7
1.2.2.	Histondeacetylase-Inhibitoren.....	8
1.2.2.1.	Histone.....	8
1.2.2.2.	Histondeacetylase.....	9
1.2.2.3.	HDAC – Aktivität in Tumoren .....	9
1.2.2.4.	Valproat.....	10
1.2.3.	Kombinationstherapie TEM + VPA .....	11
1.3.	Ziele und Fragestellung .....	12
<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	13
2.1.	Apparaturen .....	13
2.2.	Verbrauchsmaterial.....	14
2.3.	Chemikalien und Agenzien .....	15
2.4.	Nährmedien .....	17
2.4.1.	Nährlösungen und Zusätze.....	17
2.4.2.	Zusammensetzung .....	17
2.5.	Zellkulturen .....	18
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	19
3.1.	Zellkulturarbeiten .....	19
3.1.1.	Das Umsetzen konfluenter Zellen.....	19
3.1.2.	Das Einfrieren von Zellen.....	19
3.1.3.	Das Auftauen von Zellen.....	20
3.1.4.	Behandlung mit TEM und VPA .....	20
3.1.4.1.	Resistenzinduktion.....	20
3.1.4.2.	Valproat-Behandlung .....	21
3.2.	Analyse des Tumorwachstums in vitro .....	21
3.2.1.	Zellzahlbestimmung der Urothel-Zellen - MTT-Test .....	22
3.2.2.	BrdU- Zell Proliferations Assay .....	24
3.2.3.	Analyse des Zellzyklus.....	26
3.2.4.	Apoptose.....	26
3.2.5.	Intrazelluläre Expression von Zellzyklusproteinen und Zielproteinen – Western Blot Analyse.....	27

## Inhaltsverzeichnis

3.2.5.1.	Proteinextraktion aus Urothelkarzinom-Zellen .....	27
3.2.5.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry .....	28
3.2.5.3.	Proteintrennung .....	29
3.2.5.4.	Western-Hybridisierung .....	31
3.2.5.5.	Immunfärbung und Chemolumineszenz .....	31
3.2.5.6.	Stripping .....	36
3.2.6.	Blockadestudie .....	36
3.2.6.1.	siRNA Transfektion in 96-Well Platten zur MTT-Messung .....	36
3.2.7.	Microarray-Analyse .....	37
3.2.7.1.	Target Preparation .....	38
3.2.7.2.	Hybridisierung .....	38
3.2.7.3.	Färbung .....	38
3.2.7.4.	Scan und Qualitätskontrolle der Chips .....	39
3.2.7.5.	Normalisierung der Daten .....	39
3.2.7.6.	Unsupervised Analyse .....	39
3.2.7.7.	Supervised Analyse .....	39
3.2.8.	Statistik .....	41
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1.	Vorstudien – Resistenzinduktion und Dosisfindung .....	42
4.2.	Proliferationsanalysen .....	43
4.2.1.	MTT- Assay .....	43
4.2.2.	BrdU- Assay .....	46
4.3.	Zellzyklusanalyse .....	49
4.4.	Apoptose .....	52
4.5.	Western Blot .....	53
4.5.1.	Expression von Zellzyklusproteinen .....	53
4.5.2.	Expression von Zielproteinen relevanter intrazellulärer Signalsysteme... ..	54
4.5.3.	Expression von Histone .....	56
4.6.	Blockadestudien .....	57
4.7.	Microarray .....	60
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1.	Wachstumsmodulation .....	62
5.2.	Zellzyklusanalyse .....	64
5.2.1.	Modulation der Zellzyklusproteine durch VPA .....	64
5.2.2.	Blockade von Cyclin A und Cdk2 .....	66
5.2.3.	Unterschiede in der Modulation TEM-sensibler vs. TEM-resistenter Zellen .....	67
5.3.	Modulation nach chronischer mTOR-Inhibition .....	67
5.3.1.	Expressionsmodulation von Zielproteinen relevanter Signalsysteme nach VPA Behandlung .....	68
5.4.	HDAC-Inhibition und Phosphorylierung der Substrate .....	70
5.5.	Proliferationshemmung durch Kombinationstherapie TEM + VPA .....	72

**Inhaltsverzeichnis**

<b>6. Zusammenfassung</b> .....	74
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	78
<b>Danksagung</b> .....	90
<b>Lebenslauf</b> .....	91
<b>Schriftliche Erklärung</b> .....	95
<b>Anhang</b>	

### II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Strukturformel von Valproat
- Abbildung 2:** RT112 Zellen
- Abbildung 3:** UMUC3 Zellen
- Abbildung 4:** Schema einer Neubauer-Zählkammer
- Abbildung 5:** Wachstum der RT112 nach VPA Behandlung: MTT
- Abbildung 6:** Wachstum der UMUC3 nach VPA Behandlung: MTT
- Abbildung 7:** Wachstum der RT112 nach VPA Behandlung: BrdU
- Abbildung 8:** Wachstum der UMUC3 nach VPA Behandlung: BrdU
- Abbildung 9:** Darstellung der Zellzyklusphasen der RT112
- Abbildung 10:** Darstellung der Zellzyklusphasen der UMUC3
- Abbildung 11:** Darstellung der Apoptose mittels FACS
- Abbildung 12:** Analyse der Zellzyklusproteine mittels Western Blot
- Abbildung 13:** Analyse der Zielproteine mittels Western Blot
- Abbildung 14:** Analyse der Histone 3 und 4 (acetyliert) mittels Western Blot
- Abbildung 15:** Blockadestudie mittels Western Blot
- Abbildung 16:** Wachstum nach Suppression von Cyclin A bzw. Cdk2 - MTT

**III Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms

**Tabelle 2:** Annexin V-FITC Apoptose Detektions Kit I

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Lysispuffers (100 ml)

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des Sammelgels 4 %

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Trenngel 7-15 %

**Tabelle 6:** Western Blot: Pufferlösungen

**Tabelle 7:** Western Blot: Zellzyklusproteine

**Tabelle 8:** Western Blot: Zielproteine

**Tabelle 9:** Western Blot: Sekundärantikörper

**Tabelle 10:** Blockadestudie: Antikörper

### IV Abkürzungsverzeichnis

aH	acetyliertes Histon
Akt	Serin/Threonin Kinase, auch Proteinkinase B
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumin = Albumin aus Rinderserum
Cdk	Cyclin-dependent Kinase
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNA
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (bzw. -acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Foetal Bovine Serum = fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
HDAC	Histondeacetylase
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	milliMol
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-[4,5 -dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumiodid



## Inhaltsverzeichnis

PI3K	Phosphatidylinositol-3-KinaseVIII
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Temsirolimus
TEMED	Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin
V	Volt
VPA	Valproat bzw. Valproinsäure
µl	Mikroliter

## **Einleitung**

### **1. Einleitung**

#### **1.1. Krebs**

Krebs, ein Sammelbegriff für die Gruppe der bösartigen Tumorerkrankungen, stellt eines der größten Gesundheitsprobleme der entwickelten Länder dar. Allein in Deutschland sind jährlich mehr als 500.000 Menschen betroffen ([www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de)). Dabei können alle Gewebe und Organe des Menschen von Krebs befallen sein. Das häufigste Tumorleiden bei Frauen ist der Brustkrebs, bei den Männern das Prostatakarzinom. Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. Im Jahre 2010 waren ca. 25 % aller Todesfälle durch Krebs bedingt ([www.krebsinformationsdienst.de](http://www.krebsinformationsdienst.de)).

Die genauen Ursachen der Tumorgenese sind bis heute noch unklar. Fest steht, dass es durch genetische Störungen zu einer Disbalance zwischen Zellwachstum und Zelltod kommt. Die Situation ist fatal und Wissenschaftler sehen sich mit der Herausforderung konfrontiert, intelligente Behandlungsansätze zu entwickeln, die eine Heilungschance bieten.

##### **1.1.1. Blasenkarzinom und Einteilung**

Blasenkarzinom ist ein maligner Tumor der Harnblase epithelialen Ursprungs. Es gibt drei Arten von Blasenkrebs, je nach Ort der Entstehung in den verschiedenen Schichten der Harnblasenwand. Mit ca. 95% ist das Urothelkarzinom die häufigste Form. Der Rest wird von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen gebildet. Die Entstehung des Blasenkarzinoms ist ein komplexer, multifaktoriell bedingter Prozess, bei dem durch Aktivierung und/oder Hemmung von Signalwegen verschiedene zelluläre Aktivitäten betroffen sind (De-Lin Wang et al. 2012).

Die Einteilung der Tumore erfolgt nach der TNM Klassifikation (siehe Tab. 1), welche von der American Joint Committee designiert ist (AJCC Cancer Staging Manual 2010). Die Definition des klinischen Gradings hängt von der Tiefe der Tumorinvasion in die Harnblasenwand ab, wobei Screening-Methoden wie

## Einleitung

Zytoskopie oder Biopsie zur Bewertung des Tumors einbezogen werden (z.B. Wilson et al. 1991, Skinner et al. 1977, Mostofi et al. 1973).

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms

<b>Ta</b>	Nicht invasives papilläres Carcinoma in situ des Urothels
<b>T-cis</b>	Nicht invasives Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Einwachsen unter die Schleimhaut in das submuköse Bindegewebe  <b>T1a:</b> oberhalb der Schleimhautmuskelschicht <b>T1b:</b> unterhalb der Schleimhautmuskelschicht
<b>T2</b>	Einwachsen in die Muskelschicht der Harnblase  <b>T2a:</b> innere Hälfte  <b>T2b:</b> bis in die äußere Hälfte
<b>T3</b>	Hinauswachsen über die Muskelschicht der Harnblase  <b>T3a:</b> nur mikroskopisch erkennbar  <b>T3b:</b> makroskopisch sichtbar
<b>T4</b>	Einwachsen in Nachbarorgane  <b>T4a:</b> Prostata, Gebärmutter, Scheide  <b>T4b:</b> Becken- oder Bauchwand
<b>N0</b>	Keine lokalen Lymphknoten befallen
<b>N1</b>	Einzelner befallener Lymphknoten kleiner als 2 cm
<b>N2</b>	Einzelner Lymphknoten von 2–5 cm Durchmesser, oder mehrere befallene Lymphknoten < 5 cm
<b>N3</b>	Lymphknoten über 5 cm
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen nachgewiesen
<b>M1</b>	Fernmetastasen nachgewiesen

## **Einleitung**

### **1.1.2. Epidemiologie**

Das Blasenkarzinom ist die fünfthäufigste Tumorerkrankung des Menschen. Im Jahr 2008 traten weltweit mehr als 380.000 neue Fälle auf und ca. 15.000 Patienten verstarben an ihrer Erkrankung (Jemal et al. 2011).

In Deutschland wird jedes Jahr bei etwa 16.000 Menschen eine Tumorerkrankung der Harnblase diagnostiziert. Männer sind dabei rund dreimal so häufig betroffen wie Frauen. Das Durchschnittsalter des Auftretens beträgt 73 Jahre für Männer und 75 Jahre für Frauen. Patienten unter 50 Jahre sind seltener betroffen ([www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de)).

### **1.1.3. Risikofaktoren**

Es gibt verschiedene Faktoren, die das Risiko des Blasenkarzinoms steigern. Wie in vielen anderen Krebsarten kann Rauchen aufgrund der kanzerogenen Substanzen die Wahrscheinlichkeit, am Blasenkarzinom zu erkranken, erhöhen. In der Tat ist davon auszugehen, dass Rauchen die Hauptursache für das Blasenkarzinom darstellt (Yuge et al. 2015). Darüber hinaus spielen andere kanzerogene Chemikalien wie aromatische Amine und Nitrosamine, die in der chemischen, pharmazeutischen und Textilindustrie eingesetzt werden, eine wichtige Triggerrolle. Die Inzidenz in den Industrieländern ist folglich höher als diejenige auf dem Land (Huland & Friedrich 2006). Außerdem kann eine chronische Entzündung durch einen Katheter zum Blasenkarzinom führen (Die blauen Ratgeber; Blasenkrebs Deutsche Krebs Hilfe 2011).

### **1.1.4. Diagnose**

Patienten mit einem Blasenkarzinom leiden an Schmerzen während des Urinierens, Schmerzen im unteren Abdomenbereich und klagen über Blut im Urin. Diese Symptome treten ebenfalls bei vielen anderen Krankheiten auf und erschweren die frühe Erkennung. Da ein Frühdetektionsmarker für Blasenkrebs bislang nicht etabliert ist, wie beispielsweise beim Brust- oder Hautkrebs, wird

## **Einleitung**

die Erkrankung oft zufällig diagnostiziert. Oftmals befindet sich der Tumor schon in einem fortgeschrittenen Stadium. Eine genaue Diagnose kann dann mittels Zytoskopie gestellt werden.

Im Labor können Urinproben nach Bakterien und Karzinomzellen untersucht werden. Eine Biopsie und anschließende mikroskopische Untersuchung liefert ebenfalls Information über den Krankheitszustand. Andere Methoden wie die Magnetresonanztomographie, Computertomographie oder Urographie liefern eine detaillierte Übersicht über die inneren Organe, so dass abnormales Wachstum identifiziert und lokalisiert werden kann ([www.krebsinformationsdienst.de](http://www.krebsinformationsdienst.de)).

### **1.1.5. Therapiemethoden**

Es gibt verschiedene Therapiemethoden, die vom Stadium und Lokalisation des Tumors abhängen. Oberflächliche bösartige Tumore mit einem Anteil von etwa 70-85 % können mittels einer Transurethralen Resektion (TUR-B) entfernt werden ([www. Krebsinformationsdienst.de](http://www.Krebsinformationsdienst.de)). Bei den restlichen 15-25% Tumoren mit invasivem und fortgeschrittenem Charakter ist eine Resektion der betroffenen Stelle der Harnblase unausweichlich. Allerdings kann auch nach TUR-B bei mehr als der Hälfte der Patienten nach radikaler Chirurgie ein Rezidiv auftreten (Goebell et al. 2006, Tolley et al.1996, Schulman et al. 1976). Es ist denkbar, die Harnblase komplett zu entfernen. Dieser Schritt ist invasiv, aber sichert vor einer metastatischen Ausbreitung in die gesunden Körperregionen. Anschließend kann die Harnblase entweder durch einen Katheter oder einer sogenannten Neoharnblase ersetzt werden.

Andere mögliche Therapien für tiefe, invasive oder regionale Metastasen sind Radio- oder Chemotherapie. Hierzu werden verschiedene Chemotherapeutika und biologische aktive Substanzen wie Epirubicin und Interferon in Addition zu einer endoskopischen Resektion verwendet (Tolley et al. 1996). Ein Nachteil dieser Chemotherapeutika ist, dass zusätzlich zu den Krebszellen auch gesunde Zellen mit einer hohen Teilungsrate wie z.B. Haarzellen angegriffen werden. Ein zusätzliches Problem spezifisch der Harnblase ist, dass sie die

## **Einleitung**

Substanzen absorbiert, was zu einer Medikamentenresistenz führt, zu beobachten insbesondere unter Chemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (Goebell et al. 2006).

Insgesamt ist die Prognose bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung sehr schlecht. Im metastasierten Stadium liegt die 5-Jahres-Überlebensrate weit unter 10%. Trotz Einsatzes verschiedener Chemotherapie-Regime konnten keine wesentlichen Verbesserungen erzielt werden. Neue Behandlungsansätze, die dem Patienten eine realistische Heilungschance bieten, sind dringend notwendig.

## **1.2. Neue Therapiewege**

Die Idee des „molekularen Targetings“ bietet ein innovatives Lösungskonzept mit dem neue Wege in der Tumorthherapie bestritten werden können. Hierzu werden Zielstrukturen in der Tumorzelle direkt pharmakologisch angegriffen, um so effektiven Einfluss auf die Onkogenese, auf das Wachstum und die invasive Ausbreitung nehmen zu können.

Im Nachfolgenden werden tumorspezifische Angriffspunkte, die bei der gezielten Therapie des Blasenkarzinoms eine Rolle spielen könnten, vorgestellt.

### **1.2.1. PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade**

Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg ist entscheidend in Prozesse wie Zellwachstum, Zellproliferation und Angiogenese eingebunden (Morgan et al. 2009).

Einige Tyrosinkinaserzeptoren, wie der EGFR (epidermal growth factor receptor) und der IGFR (insulin-like growth factor receptor) aktivieren die nachgeschaltete PI3K (Phosphatidylinositol-3 OH Kinase), die anschließend PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) phosphoryliert.

## **Einleitung**

PIP3 fungiert als Second Messenger und verlagert Akt (Proteinkinase B) und PDK1 (phosphoinositide dependent protein kinase 1) in die Zellmembran, wo sie phosphoryliert werden (Rameh et al. 1999).

Die phosphorylierte Proteinkinase Akt wirkt regulierend auf zelluläre Prozesse, indem sie andere Substrate phosphoryliert wie z.B. das mTOR (mechanistic Target of Rapamycin). mTOR repräsentiert eine Serin/Tyrosin-Kinase, die funktionell die Tumorgenese vorantreibt, indem Zellwachstum und Teilungsprozesse aktiviert, gleichzeitig apoptotische Prozesse supprimiert werden (Raught et al. 1998).

mTOR entfaltet seine Wirkung über zwei verschiedene Komplexe, dem mTORC1 und mTORC2. Zunächst bindet mTOR das Enzym LST8, gemeinsam binden sie dann Raptor und bilden mTORC1. mTORC2 besteht dagegen aus mTor, Rictor und LST8 (Loewith R. et al. 2002).

mTORC1 steigert die Translation durch Phosphorylierung des Moleküls p70S6K. Die Funktion von mTORC2 ist noch nicht ganz klar. Es ist bei der Phosphorylierung des Akt am Ser473 beteiligt und zusammen mit der Phosphorylierung durch PDK1 am Thy308 führt es zur vollen Aktivität des Akt (Sarbasov et al. 2005).

### **1.2.1.1. mTOR im Blasenkarzinom**

Neueste Untersuchungen belegen eine zentrale Rolle der mTOR-Kinase auch beim Blasenkarzinom (Sun et al. 2011, Ching et al. 2010). Im Vergleich zum Normalgewebe ist eine vermehrte Expression der mTOR assoziierten Akt-Kinase und ihre erhöhte Aktivität im Tumorgewebe nachgewiesen (Korkolopoulou et al. 2012, Zhou et al. 2012). Puzio-Kuter und Mitarbeiter verweisen auf den Zusammenhang zwischen mTOR/Akt-Expression und Tumorprogression (Puzio-Kuter et al. 2009). Im Tier- und Zellkulturmodell lassen sich durch eine mTOR-Blockade Invasion und Wachstum von Blasenkarzinomzellen deutlich hemmen (Chiong et al. 2011, Schedel et al. 2011, Fechner et al. 2009).

## Einleitung

### 1.2.1.2. Inhibition der mTOR Signalkaskade

Mittlerweile sind verschiedene, pharmakologisch aktive Substanzen entwickelt und in die Klinik eingeführt worden, die in diese Signalkaskade eingreifen und inhibierend wirken. Bekannte mTOR-Inhibitoren sind Rapamycin und seine Analoga Everolimus, Temsirolimus und Deforolimus. Beim Nierenzellkarzinom sind Everolimus und Temsirolimus als Erst- und Zweitlinientherapie bereits zugelassen. Im Folgenden wird Temsirolimus näher beschrieben.

### 1.2.1.3 Temsirolimus (TEM)

Klinische Studien mit TEM (Torisel<sup>®</sup>) belegen die Verlängerung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit schlechter Prognose. In Deutschland wird TEM momentan zur Behandlung des Mantelzelllymphoms und aller Prognosestadien des metastasierten Nierenzellkarzinom eingesetzt. Konsequenterweise wurde die Anwendung von mTOR-Inhibitoren auch beim fortgeschrittenen Blasenkarzinom eingefordert (Mansure et al. 2009). Zu Recht wird jedoch kritisiert, dass die Datenlage bislang äußerst rudimentär ist. Eine große Unbekannte ist die Frage nach den Langzeiteffekten einer mTOR-Inhibition. Tatsächlich können mTOR-Inhibitoren das Fortschreiten einer Tumorerkrankung nur für begrenzte Zeit aufhalten. In einer kürzlich publizierten Studie wurde erstmalig am in vitro Modell nachgewiesen, dass eine chronische mTOR-Blockade kompensatorische Mechanismen in der Tumorzelle auszulösen vermag, die mit einer nachlassenden Medikamentenwirkung einhergehen (Juengel et al. 2012). Darunter fällt insbesondere die Aktivierung der Akt-Kinase, die unmittelbar die mTOR-Funktion reguliert (Juengel et al. 2012, O'Reilly et al. 2006, Sun et al. 2005). Die Bedeutung dieser Feedback-Abläufe ist im Einzelnen nicht verstanden, sie stehen jedoch in engem Zusammenhang mit einer sich entwickelnden Medikamenten-Resistenz (Juengel et al. 2012).

Neue Therapiestrategien sind einzufordern, mit denen durch TEM bedingte Resistenzen umgegangen werden können.



## Einleitung

### 1.2.2. Histondeacetylase-Inhibitoren

#### 1.2.2.1. Histone

Das Erbgut eukaryotischer Zellen liegt im Kern als Chromatin dicht verpackt vor. Der Verpackungsgrad des Chromatins ist durch regulierende Faktoren beeinflussbar, sodass es für Transkriptionsfaktoren in variablem Maße zugänglich gemacht werden kann.

Das Chromatin besteht aus vielen Nukleosomen-Einheiten, jeweils zusammengesetzt aus 146 Basenpaaren DNA und einem Histonen-Oktamer. Histone sind basische Proteine, wobei 5 verschiedene Haupt-Histon-Proteine beschrieben sind (H1, H2A, H2B, H3, H4). Zwei von jedem der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Oktamer. H1 verbindet die Nukleosomen miteinander und sorgt so für eine dicht aufspiralisierte DNA- Struktur (Chakravarthy et al. 2005).

Das N-terminale Ende eines Histones, das aus dem Nukleosom hinausragt, ist reich an basischen, positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin und Serin. Dies ist eine Bindungsstelle für die negativ geladene Phosphatgruppe der DNA. Dadurch resultiert eine dichte Verpackung des Chromatins. Die DNA ist weniger zugänglich für Transkriptionsfaktoren (Eberharter et al. 2005).

Der N-Terminus kann von Enzymen modifiziert werden. Durch Acetylierung, Ubiquitylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Sumoylierung kann Einfluss auf das Chromatingerüst ausgeübt und die Genexpression reguliert werden (Chakravarthy et al. 2005).

Die am besten bekannte Histonmodifikation ist die Acetylierung. Sie neutralisiert die positive Ladung der Aminosäuren, wodurch eine Bindung zur negativ geladenen DNA nicht mehr möglich ist. Die DNA liegt aufgelockert vor und Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Faktoren finden direkten Zugang.

Der Acetylierungsgrad der Histone wird durch Histonacetyltransferasen - im Gegenspiel mit Histondeacetylasen (siehe unten) – kontrolliert (Kuo et al. 1998).

## Einleitung

### 1.2.2.2. Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDAC) repräsentieren Enzyme, die Acetylgruppen von acetyliertem Lysin am N-terminalen Histondenende entfernen. Sie befinden sich im Kern, im Cytoplasma oder an beiden Orten.

Durch das Freisetzen der positiven Ladung des Lysins hat das Histonprotein wieder eine erhöhte Affinität für das Phosphatgerüst der DNA, die so für Transkriptionsfaktoren geblockt wird.

Es sind 18 HDACs bekannt, die in vier Klassen eingeteilt werden:

Klasse 1: HDAC 1-3 und HDAC 8

Klasse 2: HDAC 4-7 und HDAC 9-10

Klasse 3: SIRT 1-7

Klasse 4: HDAC 11

### 1.2.2.3. HDAC – Aktivität in Tumoren

HDAC-Enzyme wirken auf das Histongerüst der DNA ein und regeln damit direkt die Transkription von genetischer Information. Während der Tumorentstehung und -progression kommt es zu einer gesteigerten HDAC-Aktivität (z.B. Wilson et al. 2006, Bolden et al. 2006, Zhang et al. 2005, Halkidou et al. 2004, Zhu et al. 2004). Die DNA wird „fehlerhaft“ abgelesen. Vor allem Gene, die für die Bildung von Onkoproteinen verantwortlich sind sowie Gene, die die invasive Aktivität der Zellen steuern, werden vermehrt transkribiert. Hemmende Einflüsse auf das Zellwachstum hingegen werden unterdrückt. Die ursprünglich normale Körperzelle beginnt in unkontrollierbarem Maße zu wachsen und metastatische Eigenschaften zu entwickeln (Weichert et al. 2008).

Da eine Überexpression von Histondeacetylasen in Tumorzellen eine Tumorprogression zu fördern scheint, sollen HDAC-Inhibitoren diesen Vorgang revertieren und die entartete Tumorzelle wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückführen. An zahlreichen Tumorentitäten ist belegt, dass eine HDAC-

## Einleitung

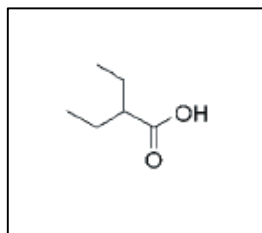
Inhibition zum Wachstumsstopp chemo- und hormonresistenter Zellen führt (z.B. Lee et al. 2012, Cooper et al. 2012, Ozaki et al. 2008).

Mittlerweile sind zahlreiche HDAC-Inhibitoren entwickelt worden und befinden sich in der präklinischen und klinischen Prüfung. Frühere Untersuchungen haben ihre günstigen Wirkprofile belegt. Vor allem zeigten sie gegenüber gesunden Zellen eine geringe Toxizität (Carew et al. 2008, Liu et al. 2006, Marks et al. 2001).

Im vorliegenden Arbeitsprotokoll war geplant, den HDAC-Inhibitor VPA einzusetzen.

### 1.2.2.4. Valproat (VPA)

VPA ist eine klinisch etablierte Substanz, die seit Jahrzehnten Anwendung in der Behandlung der Epilepsie findet. Sie kann oral verabreicht werden und ist im Plasma chemisch stabil mit einer Halbwertszeit von 9-16 Std (Blaheta et al 2005, Blaheta et al. 2005).



**Abbildung 1:** Strukturformel von VPA

Zudem ist VPA ein potenter HDAC-Inhibitor. Eine Studie hat demonstriert, dass VPA über eine Blockade der HDAC-Aktivität die Redifferenzierung von aus Patienten isolierten Tumorzellen einleitet und im Tierexperiment Tumorwachstum und -ausbreitung verhindert (Gottlicher et al. 2001). VPA übt dabei nicht nur direkte anti-tumorale Effekte aus (Juengel et al. 2013, Hudak et al. 2012, Jones et al. 2009). Zusätzlich re-sensibilisiert es auch resistent gewordene Tumorzellen (Lin et al. 2008, Tang et al. 2004).

## **Einleitung**

Ergebnisse aus dem urologischen Forschungslabor der Goethe-Universität weisen darauf hin, dass unter VPA die malignen Eigenschaften chemoresistenter Tumorzellen revertiert werden können (Blaheta et al. 2007, Kotchetkov et al. 2003). Tendenzen zur Resistenzbildung sind bei VPA gering (Fedier et al. 2007). Aktuelle Studien belegen die Wirksamkeit von VPA anhand zahlreicher Tumorentitäten (z.B. Kanamoto et al. 2016, Chelluri et al. 2016, Hornig et al. 2016, Kwiecińska et al. 2016).

### **1.2.3. Kombinationstherapie TEM + VPA**

Durch den Einsatz von Kombinationen verschiedener zielgerichteter Agenzien erhoffte man sich eine Verbesserung der Wirksamkeit (Kerbel et al. 2002). Die mehrfache Blockade von Signalwegen sollte dabei die Entstehung von kompensatorischen Rückkopplungsschleifen vermeiden (Longo et al. 2007).

Aufgrund der vorliegenden Daten wird postuliert, dass die Anwendung von VPA in der Behandlung des Blasenkarzinoms die Gefahr einer durch TEM induzierten Resistenz abzuwenden vermag. Am Prostata-Modell konnte bereits der Benefit einer mTOR-HDAC-Inhibitor-Kombinationstherapie aufgezeigt werden (Wedel et al. 2011).

### **1.2.4. Ziele und Fragestellung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das biologische Verhalten verschiedener Blasenkarzinomzellen unter chronischer TEM-Therapie studiert werden. Ziel war es, durch den gekoppelten Einsatz des HDAC-Inhibitors VPA Resistenzprozesse zu umgehen bzw. hinauszuzögern und so ein innovatives und effektives Therapieprotokoll für Blasenkarzinompatienten im fortgeschrittenen Tumorstadium vorzulegen.

## Einleitung

Dem Arbeitsprogramm lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

- A.) In welchem Maße beeinflusst eine Resistenz gegenüber TEM das Wachstum verschiedener Blasenkarzinom-Zellen?
- B.) Welche molekularen Veränderungen werden durch die Resistenz in der Tumorzelle ausgelöst?
- C.) Wie können HDAC-Inhibitoren einer TEM-Resistenz entgegensteuern?

Zur Beantwortung der Fragen wurden die Blasentumorzelllinien RT112 und UMUC3 evaluiert. Nach Etablierung einer Resistenz gegenüber TEM wurden die proliferativen Eigenschaften der resistenten versus nicht-resistenten Tumorzellen miteinander verglichen. Anschließend wurde der Einfluss von VPA auf das Wachstum der TEM-resistenten Zellen untersucht. Im Fokus standen Studien zur Proliferation der Zellen. Vertiefende Analysen konzentrierten sich auf das Expressionsmuster zellzyklusregulierender Proteine und intrazellulärer Signalproteine sowie auf die HDAC-Inhibition. Blockadestudien dienten zur Überprüfung der biologischen Relevanz einzelner Proteine.

## Material

### 2. Material

#### 2.1. Apparaturen

Agarosegeldokumentation	Gel Doc 1000, BioRad (München)
Agarosegelkammer (Karlsruhe)	HORIZON 11.14, Gibco
<i>BeadChip Array Station</i>	Illumina, Inc. (USA)
<i>BeadChip HT Array Plate Scanner</i>	Illumina, Inc. (USA)
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg)
ELISA Reader	Fa- Tecan, Typ M200 (Männedorf)
Entwicklermaschine Typ Unix 60	AGFA (Köln)
Färbekasten aus Glas	
Lichtmikroskop	Photomikroskop III, Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Yellow line Mag HS7
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborg. (Eberstadt)
Protein-Transfer-Apparaturen SDS-Polyacrylamid- BIORAD	Biorad (München)
Gelelektrophorese	Biorad (München)
Sterilbank	antairBS W.H. Mahl (Kaarst)
Thermoblock	Biometra (Göttingen)
Tischschüttler	Stuart, see-saw rocker SSL4(UK)
Waagen	Denver Instrument (Göttingen)
Wasserbad	Fritz Gössner GmbH (Hamburg)
Zentrifugen	Rotina 380 R, Hettich (Tuttlingen)

## Material

### 2.2. Verbrauchsmaterial

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen)	Becton Dickinson (Heidelberg)
<i>BeadChip Human HT-12 v4 Expression Array Plate Set</i>	Illumina, Inc. (USA)
<i>BeadChip Hybridization, Wash and Stain Kit</i>	Illumina, Inc. (USA)
Blotting-Papiere	Schleicher & Schuell (Dassel)
BRDU Cell Proliferation Assay	FA. Callbiochem (Darmstadt)
Cell Proliferation Kit I (MTT) GmbH(Penzberg)	Roche Diagnostics
Cycle TEST PLUS Deckgläser	Becton Dickinson (Heidelberg) Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einmalpipetten, steril (1, 5, 10 und 25 ml)	Costar Corning (USA)
Falcons/Cellstar Tubes, 15ml	GBO (Kremsmünster)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Filterpapier	VWR International (Darmstadt)
Insulinspritzen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Kryoröhrchen (2 ml)	Apogent, Nunc A/S (Dänemark)
Multiply-Pro Gefäß	Fa. Sarstedt (Nürmbrecht)
Nitrozellulosemembran Hybond-C Extra UK)	Amersham Bioscience (Bucks, UK)
Neubauer-Zählkammer	W. Schreck (Hofheim/TS)
Pipetten	Fa- Biohit/ Eppendorf (Hamburg)

## Material

Pipettenspitzen	Fa. Costar, Fa. StarLab, Bevelled
Polystyrolzellkulturflaschen, steril	Sarstedt (Nürmbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
RNAesy Mini Kit (250)	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilm Typ HyperfilmTMECLTM	AmershamBuchler (Braunscheig)
Schwammtücher	Biorad (München)
Sterilfilter (250ml & 500 ml, 0,22 µm)	Millipore (Schwalbach)
Western Blot Recycling Kit Stripping	Alpha Diagnostic (USA)
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Wells)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon (Heidelberg)

## 2.3. Chemikalien und Agenzien

Accutase (Österreich)	PAA Laboratories GmbH
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck KGaA (Darmstadt)
Acrylamidlösung (30 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Bisacrylamidlösung (2 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chemolumineszenz-Lösung (ECL)	Amersham-Buchler (Braunscheig)
Coomassie Plus Protein Assay	Fa. Thermo Scientific (USA)
Destilliertes Wasser (Aqua dest.) (Melsungen)	B. Braun Melsung AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)



## Material

DNase Qiagen (Hilden)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Fibronektin	Becton Dickinson (Heidelberg)
Glycerin (= Glycerol)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isopropanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Laemmli Sample Puffer	Biorad (München)
Magermilchpulver	Töpfer GmbH (Dietmannsried)
Methanol	J.T. Backer (Deventer, Holland)
Mercaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
PBS - (ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween 20	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Trypanblau	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (1 x) (Österreich)	PAA Laboratories GmbH
Temsirolimus	LC Laboratories (USA)
Valproinsäure (VPA)	G.L. Pharma GmbH (Österreich)

## Material

### 2.4. Nährmedien

#### 2.4.1. Nährlösungen und Zusätze

RPMI 1640 Medium + L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Fötale Rinderserum	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin GlutaMAX	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Hepes Puffer (1 M)	Fa. Sigma-Aldrich, H0887
Heparin (5.000 I.E./ 0,2 ml)	Fa. Ratiopharm (Ulm)
Heparin-Natrium-5.000-ratiopharm	
Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

#### 2.4.2. Zusammensetzung

RPMI 1640 - Für die Kultivierung von Tumorzellen:

Nährmedium: 430,0 ml RPMI 1640

50,0 ml FBS 10,0 ml

Hepes Puffer (1 M) 5,0 ml

Glutamin 5, 0 ml Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)

Steril filtriert im Sterilcup/Steriltop

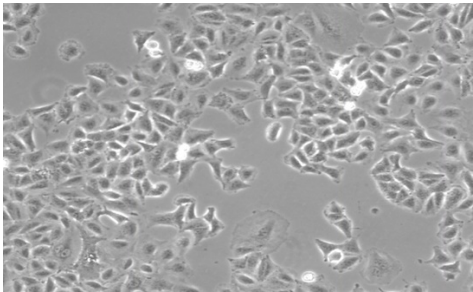
## **Material**

### **2.5. Zellkulturen**

Dem Labor stehen 10 unterschiedliche Blasen-tumor-Zelllinien zur Verfügung. Basierend auf Vorarbeiten wurden für die geplanten Studien folgende Zellen eingesetzt (siehe Abb. 2 & 3). Sie unterscheiden sich in TNM-Klassifikation und im Differenzierungsgrad.

#### **RT112**

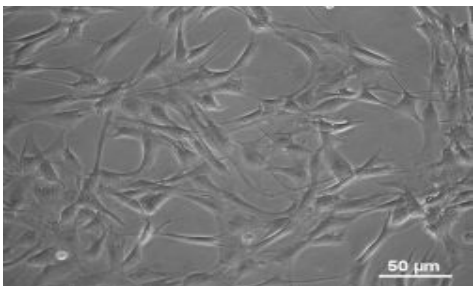
Diese Zelllinie wurde als T2 klassifiziert und als G1 eingestuft.



**Abbildung.2:** RT112

#### **UMUC3**

Diese Zelllinie wurde als T3b klassifiziert bzw. als G3 eingestuft.



**Abbildung 3:** UMUC3

Die beiden Zelllinien waren in einer Zellbank kryokonserviert und wurden bei Bedarf aufgetaut und in Vollmedium unter 10%igem Serumzusatz kultiviert.

## Methoden

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellkulturarbeiten

##### 3.1.1. Das Umsetzen konfluenten Zellen

Die Zellen (RT112 und UMUC3) wurden einmal mit 10 ml PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Um die Zellen von der Kulturflasche abzulösen, wurden 1-3 ml (abhängig von der Größe der Kulturflasche) Accutase pipettiert und diese 3 min bei 37° C inkubiert. Je nach Bedarf wurden die abgelösten Zellen mit einer Ratio von 1:2 bis 1:10 in Nährmedium aufgenommen, gut homogenisiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. Zur Inkubation wurden die Kulturflaschen bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gestellt.

##### 3.1.2. Das Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurde ein Einfriermedium (siehe unten) auf Eis hergestellt und die benötigte Anzahl an Kryoröhrchen beschriftet. Die Zellen wurden wie beim Umsetzen (siehe 3.1.1.) abgelöst. Das Nährmedium wurde zum Abspülen beim Lösen der Zellen verwahrt. Anschließend wurden die gelösten Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in das Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und je 1 ml in die vorbereiteten Kryoröhrchen (auf Eis) aliquotiert. Zum Einfrieren wurden die Kryoröhrchen in eine Kryobox überführt und bei – 80 °C in den Gefrierschrank gestellt. Hierdurch erfolgte ein schonendes Einfrieren in 1 °C Schritten. Die Aliquots wurden für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196° C) gegeben.

Einfriermedium: 70 % Medium (ohne Zusätze)

20 % FBS

10 % DMSO

## Methoden

### 3.1.3. Das Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden aus dem - 80 °C Gefrierschrank entnommen und zum schonenden Auftauen im Wasserbad gestellt bis nur noch ein kleiner Resteisklumpen zu sehen war. Zum Zentrifugieren wurde der Inhalt der Aliquots in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Nährmedium überführt und 5 min bei 1.050 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert, homogenisiert und in neue Kulturflaschen verteilt. Zur Inkubation wurden die Kulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gestellt.

### 3.1.4. Behandlung mit TEM und VPA

Zur Beurteilung des Einflusses von TEM und VPA auf die Tumorprogression wurden die Urothel-Zellen für 3 Tage wie folgt behandelt:

- A) unbehandeltes Nährmedium (Kontrolle)
- B) + TEM (1 µM)
- C) + VPA (1 mM)
- D) + TEM (1 µM) + VPA (1 mM)

#### 3.1.4.1. Resistenzinduktion

Nach einem im Labor etablierten Protokoll wurden die Tumorzellen zur Resistenzinduktion mit steigenden TEM-Konzentrationen behandelt. Die Zeitspanne bis zur Resistenzentwicklung betrug 3-5 Monate. Als Startdosis wurde die initiale IC<sub>50</sub>-Konzentration (engl. „inhibitory concentration“) verwendet. Zur Ermittlung der initialen IC<sub>50</sub>-Dosis wurde TEM in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und Dosis-Wirkungsbeziehungen in Proliferationstests ermittelt. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Parallel erfolgte eine Überprüfung der Zellvitalität, um toxische Effekte

## **Methoden**

ausschließen zu können. Die Resistenz definierte sich dabei über einen signifikanten IC<sub>50</sub>-Anstieg.

### **3.1.4.2. VPA-Behandlung**

Neben der Abklärung der Resistenzmechanismen wurde zusätzlich untersucht, ob der HDAC-Inhibitor VPA Resistenzen revertieren kann. Zu diesem Zweck wurde in den Tumorzellen zunächst eine Resistenz gegen TEM induziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit VPA und entsprechende Analyse des proliferativen und adhäsiven Verhaltens der Tumorzellen. Basierend auf Vorarbeiten starteten die Studien mit einer VPA-Konzentration von 1 mM.

Die Versuche beinhalteten den Vergleich zwischen resistenten und nicht-resistenten Zellen sowie den Vergleich zwischen VPA behandelten resistenten und unbehandelten resistenten Zellen.

## **3.2. Analyse des Tumorwachstums in vitro**

Ein entscheidendes Kennzeichen für die Malignität von Tumoren ist das invasive Wachstum. Vor allem Störungen der Zellzyklusregulation können das veränderte Proliferationsverhalten verursachen. In dieser Studie wurde der Einfluss von TEM und VPA auf die Proliferation, die Zellzyklusphasen und auf die Expression von Zellzyklusproteinen näher untersucht. Auch wurden Apoptosetests durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung apoptotischer Effekte an der anti-proliferativen Wirkung von TEM und VPA zu determinieren.

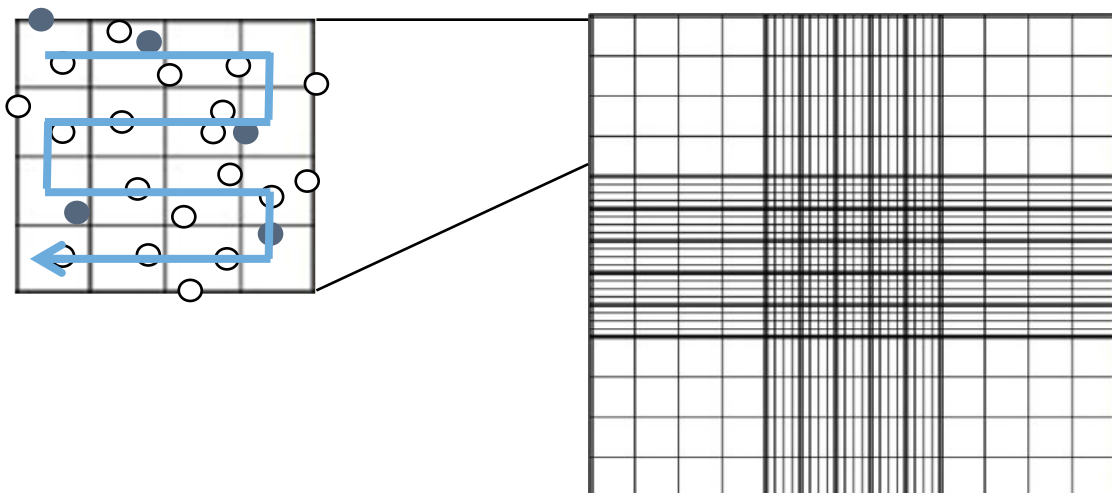
## Methoden

### 3.2.1. Zellzahlbestimmung der Urothel-Zellen - MTT-Test

Zur Evaluierung der Unterschiede im Wachstumsverhalten der Urothelzellen nach TEM- und /oder VPA-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen wurde der MTT-Test (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein indirektes Verfahren, bei dem die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase lebender Zellen gemessen wird.

Entsprechend dem obigen Schema (siehe 3.1.4.) wurden die Tumorzellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen kultiviert und behandelt. Dabei blieben die Kontrollzellen unbehandelt. Am Versuchstag wurden die Zellen mit Accutase abgelöst (siehe 3.1.1.) und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Zur Zellzahlbestimmung und Überprüfung der Zellvitalität wurden die Zellpellets in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl dieser Zellsuspension zu 90 µl 0,4 %-iger Trypanblau-Lösung in ein Reaktionsröhrchen pipettiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Eindringen vom Trypanblau in defekte Zellen, färbten sich diese dunkelblau an. Die vitalen Zellen blieben farblos. Nach dem das Zell-Trypanblau-Gemisch gründlich homogenisiert wurde, folgte die Auftragung von 10 µl auf einer Neubauer-Zählkammer und die Auszählung (Abb. 4). Um die allgemeine Vitalität der Zellen bestimmen zu können, wurden auch die defekten Zellen notiert.



## Methoden

**Abbildung 4:** Schema einer Neubauer-Zählkammer. Die linke Abbildung zeigt die Vergrößerung eines der vier Quadrate. Nur die weißen Zellen innerhalb des Quadrates werden gezählt, die blauen Zellen repräsentieren tote Zellen durch das Eindringen des Trypanblau-Gemisches. Die rechte Abbildung zeigt die ganze Neubauer-Zählkammer.

Aus den gezählten vitalen Zellen wurde die Gesamtzellzahl pro ml errechnet.

$$G = n \times 10^4 \times F$$

G = Gesamtzellzahl/ml

n = durchschnittliche Zellzahl der 4 großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer

F = Verdünnungsfaktor (in Trypanblau) = 10

Für die Herstellung der Eichkurve wurde die Zellzahl der Kontrollzellen im Nährmedium auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die gewünschten Konzentrationen der Eichkurve ( $5 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ , 5.000 und 2.500 Zellen/Well) wurden aus dieser Zellsuspension hergestellt und 100 µl davon in 96-Well-Platten in dreifachem Ansatz pipettiert. 3 Wells mit Nährmedium befüllt, dienten als Nullkontrolle. In den 96-Well-Platten wurden direkt 10 µl MTT Reagenz/Well hinzu pipettiert.

Die zu untersuchenden Proben wurden hingegen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml versehen. Jeweils 50 µl dieser Zellsuspensionen wurden als dreifacher Ansatz in 96-Loch-Platten pipettiert (5.000 Zellen/Well). Hinzu wurden weitere 50 µl des Mediums bzw. Medium mit doppelt konzentriertem TEM oder VPA pipettiert, sodass die gewünschte Substanz-Endkonzentration erhalten blieb. Es wurden drei gleichbeladene 96-Well-Platten vorbereitet und für 24, 48 und 72 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10 µl MTT-Reagenz/Well hinzugefügt und für weitere 4 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Pro Well wurden



## Methoden

anschließend 100 µl Solubilisierungspuffer hinzu pipettiert und erneut für 12 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Messung am *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Gerät bei einer Wellenlänge von 630 nm. Durch die Verrechnung der Messungen der Proben mit den Messungen der Eichkurve ließen sich die absoluten Zellenzahlen der einzelnen Proben bestimmen. Die Proliferationsunterschiede konnten anhand dieser determiniert werden.

### 3.2.2. BrdU- Zell Proliferations Assay

Zum Vergleichen der Proliferationsrate zwischen den Kontrollzellen und den mit TEM und VPA behandelten Tumorzellen diente BrdU (*Bromdesoxyuridin*), ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin. Es wird in proliferierenden Zellen in vitalen Geweben metabolisiert.

Antikörper können an das implementierte Nucleosid binden und bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden.

Hierzu wurden die Tumorzellen nach obigem Schema (siehe 3.1.4.) in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen kultiviert und behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 2 und 5 Tagen wurden die Zellen abgelöst (siehe 3.1.1.), 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und anschließend auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

Jeweils 50 µl dieser Zellsuspensionen wurden als dreifacher Ansatz in 96-Well-Platten pipettiert (5.000 Zellen/Well). Zu diesen 50 µl Zellsuspension wurden weitere 50 µl des Mediums bzw. Medium mit doppelt konzentriertem TEM und VPA pipettiert und für ein paar Minuten bei 37 °C ruhig gestellt. Zu der 24 h-Platte wurde nach dem Absetzen der Zellen 20 µl BrdU hinzugefügt, welches zuvor 1:2000 mit Medium verdünnt wurde. Es wurde eine Kontroll-Reihe ohne BrdU mitgeführt.

Die Platten wurden für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der 48 h-Platte wurde erst nach 24 Stunden 20 µl BrdU hinzugegeben. Nach der

## Methoden

Inkubationszeit wurden die Platten schnell über dem Kopf gedreht und auf Papierhandtücher trocken geklopft. Anschließend wurde in jedes Well 20 µl Fixierungspuffer des *BrdU cell assay kits* pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hier nach wurde 100 x Anti-BrdU Antikörper aus dem BrdU-Kit 1:100 mit Antikörper-Puffer verdünnt, 100 µl in jedes Well pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde der Waschpuffer vorbereitet: 25 ml der 20-fach konzentrierten Lösung wurde mit 475 ml Wasser vermischt.

Die Platten wurden 3 x mit einem automatischen Plattenwaschen mit 1 x Waschpuffer gewaschen und jedes Mal auf Papierhandtüchern trocken geklopft. Das Peroxidase Ziege Anti-Maus IgG HRP Konjugat, welches als Pulver vorliegt, wurde in 1 x PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (125 bzw. 250 µl) aufgelöst, die entsprechende Menge 1:1000 mit Conjugate Diluent verdünnt und durch eine Spritze mit einem 0,2 µl Filter gedrückt. 100 µl dieser Lösung wurde in jedes Well pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Platten 3 Mal mit dem automatischen Plattenwascher mit 1 x Waschpuffer gewaschen und jedes Mal auf Papierhandtüchern trocken geklopft. Ein letztes Mal wurden die Platten mit H<sub>2</sub>O gewaschen und auf Papierhandtüchern trocken geklopft. In jedes Well wurde 100 µl der Substrat Solution pipettiert und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde in jedes Well 100 µl Stop Solution pipettiert und am ELISA-Gerät (450 nm) innerhalb von 30 min gemessen.

### 3.2.3. Analyse des Zellzyklus

Veränderungen des Zellwachstums gehen mit Veränderungen des Zellzyklusses einher. Zur Analyse der Zellzyklusphasen G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase wurde das *CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit* verwendet. Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen mit Accutase abgelöst, in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Pufferlösung auf Eis aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. In 1,5 ml Reaktionsröhrchen wurde die Zellzahl auf 5 x

## Methoden

$10^5$  Zellen/ml Pufferlösung eingestellt und erneut 5 min bei 1.050 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das möglichst gut getrocknete Zellpellet wurde vorsichtig in 250  $\mu\text{l}$  Lösung A (Trypsinpuffer) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hinzu kamen 200  $\mu\text{l}$  Lösung B (Trypsininhibitor & RNase-Puffer). Erneut wurde vorsichtig resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lösung C (Propidiumiodid Färbelösung) erfolgte auf Eis und im Dunkeln. Nach der Resuspension und 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension daraufhin in 5 ml FACS-Röhrchen filtriert und innerhalb von 3 Stunden am FACS gemessen.

### 3.2.4. Apoptose

Der programmierte Zelltod kann bei Tumorzellen induziert werden und bietet damit eine Angriffsoption bei der Tumorbekämpfung dar. Um eine mögliche Beteiligung der Apoptose an den zytotoxischen Effekten von TEM und VPA zu evaluieren, wurden Tests mittels Annexin V-FITC *Apoptosis Detection Kit I* durchgeführt.

Mithilfe dieses *Kits* konnte die Apoptose detektiert werden. Während der Apoptose wird Phospholipid-Phosphatidylserine (PS) von der Membrannenseite auf die Außenseite externalisiert. Annexin V, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, hat eine hohe Affinität zu PS und bindet diese. Dadurch konnten vitale Zellen von Zellen, die sich in der frühen Apoptose befinden, unterschieden werden. Die Zugabe von Propidiumiodid (PI) ermöglichte zusätzlich die Identifizierung bereits toter Zellen, da ihre Membran PI eindringen lässt. Sie sind Annexin V-FITC und PI positiv.

Für dieses Experiment wurden die Tumorzellen aus der 25  $\text{cm}^2$ -Kulturflasche mittels Accutase abgelöst und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  und 1.050 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet auf Eis zweimal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml 1 x Bindepuffer (1:10 Verdünnung: 10 x Bindepuffer + destilliertes Wasser) aufgenommen. Die

## Methoden

Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammern bestimmt und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Bindepuffer eingestellt. Danach wurden 100  $\mu$ l dieser Zellsuspensionen ( $2 \times 10^5$  Zellen) auf Eis in FACS-Röhrchen und wie folgt behandelt:

**Tabelle 2:** Annexin V-FITC Apoptose Detektions Kit I: Behandlung jedes Ansatzes: K1 = Kontrolle ohne Zugaben, K2 = Kontrolle frühe Apoptose, K3 = Kontrolle tote Zellen, P = Messprobe.

	Annexin V-FITC	Propidiumiodid
K1	/	/
K2	5 $\mu$ l	/
K3	/	5 $\mu$ l
P	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Im Dunkeln wurde Annexin V-FITC und Propidiumiodid hinzugegeben und die FACS-Röhrchen vorsichtig gevortext. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400  $\mu$ l 1 x Bindepuffer hinzu pipettiert. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer.

### 3.2.5. Intrazelluläre Expression von Zellzyklusproteinen und Zielproteinen– Western Blot Analyse

#### 3.2.5.1. Proteinextraktion aus Urothelkarzinom-Zellen

Für die Proteingewinnung wurden die konfluent gewachsenen Tumorzellen aus 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in 10 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> und mittels Accutase abgelöst. Dieses Accutase-Zellgemisch wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4° C und 1.040 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS resuspendiert wurde, folgte eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurden auf das trockene Zellpellet 300-500  $\mu$ l Lysispuffer (1,5 ml + 7,5  $\mu$ l PMSF, Tabelle 3), je nach Pelletgröße, pipettiert und auf Eis 10 min inkubiert. Dieses

## Methoden

Zellysate wurde in 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt und mittels Insulinspritzen (1ml) mehrmals resuspendiert bis es schaumig wurde. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm. Der entstandene Überstand enthielt die Proteine und wurde auf Eis in neue Kryoröhrchen überführt und im Gefrierschrank bei - 80 °C gelagert.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Lysispuffers (100 ml)

75 ml destilliertem Wasser +		
790	mg	Tris
900	mg	NaCl
10	ml	10 %ige Tergitollösung
2,5	ml	10 %ige Na-deoxycholatelösung
1	ml	EDTA [0,1 M]
mit destilliertem Wasser auf 92,2 ml aufgefüllt. Dazu:		
100	µl	Aprotinin [1 mg/ml] (in H <sub>2</sub> O gelöst)
100	µl	Leupeptin [1 mg/ml] (in H <sub>2</sub> O gelöst)
100	µl	Pepstatin [1 mg/ml](in Methanol gelöst)
500	µl	NaF [0,2 M] (in H <sub>2</sub> O gelöst)
500	µl	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> [0,2 M] (in H <sub>2</sub> O gelöst)
500	µl	PMSF [0,2 M] (in Isopropanol gelöst)

### 3.2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Mithilfe des DC Protein Assays erfolgte die Proteinbestimmung. Jeweils 4 µl der Zellysate wurden jeweils in einem 0,2 ml Reaktionsröhrchen und mit 36 µl destilliertem Wasser (1:10) versetzt. Auf einer 96-Well-Platte wurden drei Wells jeweils mit 10 µl einer Zellysate beladen. Wells mit destilliertem Wasser befüllt, dienten als Kontrolle. Zu jedem Well wurde anschließend 300 µl Coomassieblue pipettiert und 10 min auf dem Schwenker in Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert. Die Messung erfolgte mittels ELISA. Die Messwerte wurden mit einer Eichkurve (aus Proben unterschiedlicher Konzentration Albumins aus Rinderserum –BSA) verrechnet und der Mittelwert gebildet.

## Methoden

### 3.2.5.3. Proteintrennung

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dazu wurden „BIORAD Mini Protein II“ zusammengebaut.

Gemäß Angaben des Herstellers wurden je nach Molekulargewicht der Proteine Glycingele mit 4 %-igem Sammelgel und 7-15 %igem Trenngel (nach Laemmli) gegossen. Diese waren wie folgt zusammengesetzt (Tab. 3 & 4):

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des Sammelgels 4 %

Lösungen	
Aqua dest.	5,4 ml
10 % SDS	100 µl
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid A	1,3 ml
Bisacryl B	0,6 ml
10 % APDS	100 µl
TEMED	20 µl

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Trenngel 7-15 %

Lösungen	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	150 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml	4,85 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,2 ml	1,6 ml	1,8 ml	2,25 ml
10 % APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
kDa	30-100	20-80	15-60	10-50	5-30

## **Methoden**

Zwei Glasplatten am Halter dienten als Gelkammer. Dieser wurde mit 7 ml von dem jeweiligen Trenngel gefüllt. Sofort wurden 200 µl Isopropanol hinzu pipittiert. Dieser sorgte für eine bessere Polymerisation und das Ausbleiben von Luftblasen. Nach etwa 20 min war das Trenngel polymerisiert. Das Isopropanol wurde mit destilliertem Wasser aus der Gelkammer gespült und mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel bis zum oberen Rand der Gelkammern gegossen. Gelkämme wurden aufgesetzt um Auftragsaschen zu formen. Nach etwa 20 min waren die Gele vollständig polymerisiert. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoreseeinrichtung eingesetzt und mit 1 x Elphopuffer (Tab. 4) aufgefüllt. peqGOLD Protein-Marker IV wurde als Referenzgröße verwendet. In jede Tasche wurde je Probe 50 µg Protein aufgetragen. Zuvor wurden die Proteinproben 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95° C im Heizblock denaturiert. Zu Beginn der Elektrophorese wurde die Spannung bei 80 V eingestellt. Nachdem die Proben das Sammelgel passierten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Entsprechend ihrer Größe wurden die Proteine im Trenngel aufgetrennt. Nach diesem Vorgang stand das Gel für die Western-Hybridisierung bereit.

### **3.2.5.4. Western-Hybridisierung**

Die nach ihrer Größe getrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden die Nitrozellulosemembran, das Filterpapier und die Schwammtücher 15 min in 1 x Transferpuffer (Tab. 5) eingeweicht. Das Gel wurde aus der Glashalterung entnommen und der Sammelgelanteil entfernt. Anschließend wurde es auf ein Schwammtuch und vier Lagen Filterpapier gegeben. Passgenau wurde die Nitrozellulosemembran darauf gelegt und mittels einer Pipettenspitze wurden die Bläschen abgedrückt. Eine weitere Schicht aus vier Lagen Filterpapier und ein Schwammtuch kamen hinzu. Nachdem die Proteintransfer-Apparatur vorbereitet war, wurde das eingebettete Proteingel eingespannt, mit einem Kühl-Akku bestückt und mit 1 x Transferpuffer aufgefüllt. Unter ständigem Rühren wurde

## **Methoden**

eine Stunde bei einer Spannung von 100 V transferiert. Die Proteine wurden auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen und waren für die Immunfärbung und Chemolumineszenz bereit.

Die Western-Hybridisierung erfolgte eine Stunde bei einer Spannung von 100 V (PowerPac 300 Power Supply). Danach befanden sich die aufgetrennten Proteine auf der Nitrozellulosemembran und konnten durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert und durch Chemolumineszenzen sichtbar gemacht werden.

### **3.2.5.5. Immunfärbung und Chemolumineszenz**

Im Anschluss wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch Beladung mit spezifischen Antikörpern detektiert und durch Chemolumineszenzen sichtbar gemacht.

Dazu wurde die Nitrozellulosemembran aus der Transferapparatur entnommen, an der Ecke beschriftet und einmal mit 1 x Towbinpuffer (Tab. 5) gewaschen. Unter ständigem Schwenken wurde die Membran mit Blockier-Lösung (Tab. 5) eine Stunde inkubiert. So wurde ein unspezifisches Binden der Antikörper vermieden. Währenddessen wurden die Primärantikörper gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet (Tab. 6, 7). Die Blockierlösung wurde verworfen und der jeweilige Primärantikörper auf die entsprechende Membran gegeben und 15 min auf den Schwenktisch gestellt.

Die Schälchen wurden entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert oder mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank gestellt.

Danach wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran dreimal 15 min mit Blotpuffer (Tab. 5) gewaschen. Die Sekundärantikörper (Tab. 8) wurden vorbereitet, auf die Membran gegeben und 30 min auf dem Schwenktisch inkubiert. Ein erneuter Waschvorgang, dreimal für 15 min mit Blotpuffer und einmal für 5 min mit destilliertem Wasser, folgte.

Zur Detektion der Antikörper wurde eine Chemolumineszenzlösung aus *Detection Reagent 1* und *2* im gleichen Verhältnis angesetzt. Auf der



## Methoden

Membran wurde 1,5 ml von diesem Gemisch gleichmäßig verteilt und 1 min inkubiert. Nach dem Abtropfen auf einem Papiertuch wurde die Membran in Plastikhülle in den Detektor (Fusion x7) gelegt. Kleine Bläschen wurden mittels einer Pipettenspitze ausgestrichen.

Es wurde je nach Antikörper 1- 45 min entwickelt. Die Aufnahmen mit den sichtbaren Proteinbanden wurden gespeichert und konnten mithilfe der Banden des Protein-Markers IV ausgewertet und anhand der Bandenintensitäten verglichen werden.

$\beta$ -Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

## Methoden

<b>Antikörperpuffer</b>	Blotpuffer	90 ml
	5g BSA in 100 ml Blotpuffer	10 ml
<b>Blockierlösung</b>	1 x Towbinpuffer	100 ml
	Magermilchpulver	100 g
<b>Blotpuffer</b>	10x Towbinpuffer	100 ml
	Tween 20	5 ml
	Destilliertes Wasser	895 ml
<b>10 x Elphopuffer (pH 8,3)</b>	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Destilliertes Wasser	1 L
<b>1 x Elphopuffer</b>	10 x Elphopuffer	100 ml
	Destilliertes Wasser	900 ml
<b>10 x Transferpuffer</b>	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	Destilliertes Wasser	1 L
<b>1 x Transferpuffer</b>	10 x Transferpuffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	Destilliertes Wasser	700 ml
<b>10 x Towbinpuffer</b>	Tris	12,1 g
	NaCl	90 g
	Destilliertes Wasser	1 L
<b>1 x Towbinpuffer</b>	10 x Towbinpuffer	100 ml
	Destilliertes Wasser	900 ml

**Table**

**6:**

We  
ste  
rn  
Blo  
t:  
Puf  
ferl  
ösu  
ng  
en

**Table**

**7:**

We  
ster  
n  
Blot  
:  
Zell  
zykl  
usp  
rote  
ine.  
Die  
Ver  
dün  
nun  
gen  
erfo  
lgte  
n  
im  
Anti

## Methoden

körperpuffer

	kDa	Herkunft	Verdünnung
β-Aktin	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Cdk1/Cdc2	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Cdk2	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Cdk4	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin A	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin B	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Cyclin D1	36	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
p19	19	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
p21	21	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Kip1/p27	27	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500

## Methoden

**Tabelle 8:** Western Blot: Zielproteine. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer

Primärantikörper	kDa	Herkunft	Verdünnung
pAkt	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
pRaptor)	150	Cell Signaling (USA)	1:1.000
pRictor	200	Cell Signaling (USA)	1:1.000
Acetyl-Histone aH3	17	Cell Signaling (USA)	1:1.000
Acetyl-Histone aH4	11	Cell Signaling (USA)	1:1.000
Histone H3	17	Cell Signaling (USA)	1:1.000
Histone H4	11	Cell Signaling (USA)	1:1.000
pmTOR	289	Cell Signaling (USA)	1:1.000
p70S6	70	Cell Signaling (USA)	1:1.000

**Tabelle 9:** Western Blot: Sekundärantikörper. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus HRP	Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Hase HRP	Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

## Methoden

### 3.2.5.6. Stripping

Die Nitrozellulosemembran wurden von den gebundenen Antikörpern befreit und ein zweites Mal für die Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge mittels  $\beta$ -Aktin verwendet. Dazu wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x Towbinpuffer (Tab. 5) gewaschen und für eine halbe Stunde mit jeweils 10 ml 1x Antibody Stripping Solution (1 ml 10 x Stripping Solution + 9 ml destilliertem Wasser) inkubiert.

Nach der Inkubation wurde erneut dreimal für 10 min mit 1 x Towbinpuffer gewaschen. Mit Blockierlösung wurde die Membran nochmal blockiert. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu Punkt 3.2.5.5.

### 3.2.6. Blockadestudie

Um die Relevanz und die wachstumshemmende Funktion ausgesuchter Antikörper und der HDAC-Inhibition mittels VPA beurteilen zu können, wurden diese mit spezifischen Antikörpern blockiert und anschließend mittels Western Blot ausgewertet. Die MTT-Messung sollte die Modulation des Zellwachstums nach der Blockade evaluieren.

#### 3.2.6.1. siRNA Transfektion in 96-Well Platten zur MTT-Messung

siRNA ist eine einzelsträngige RNA, die komplementär zur RNA des Proteins gewählt wird, das man ausschalten möchte. Diese interagieren dann miteinander und die Translation zum Protein kann nicht stattfinden.

Zur Transfektion wurden die Zellen in den 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert und mittels Accutase abgelöst. Die Zellzahl wurde auf 100.000 Zellen/ml in 20% serumhaltigem Medium eingestellt. Je 50  $\mu$ l Zellsuspension (= 5.000 Zellen) wurde in 96-Well-Platten im dreifachen Ansatz pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Transfektion vorbereitet. Dazu wurde 1  $\mu$ l siRNA in 200  $\mu$ l serumfreies Medium aufgenommen, so dass man eine Konzentration von 10 nM siRNA erhielt. Zur Komplexbildung

## Methoden

wurden noch 6  $\mu$ l Transfektionsreagenz hinzugefügt, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 50  $\mu$ l in das jeweilige 96-Well-Platte pipettiert und für 24, 48 und 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10  $\mu$ l MTT Reagenz in die Wells gegeben und bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden 100  $\mu$ l Solubilisierungspuffer in jedem Well hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Messung am nächsten Tag erfolgte am ELISA-Gerät (550nm).

**Tabelle 10:** Blockadestudie: Antikörper. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer

siRNA gegen	kDa	Herkunft	Verdünnung
Cdk2	33	Qiagen (Hilden)	1:2.500
Cyclin D1	36	Qiagen (Hilden)	1:250
siRNA Attrappe (5 nM)		Qiagen (Hilden)	

## Methoden

### 3.2.7. Microarray-Analyse

Im Rahmen eines drei monatigen Forschungsaufenthaltes am Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, wurden *Microarray*-Analysen durchgeführt. Sie dienen dem Nachweis der Genexpression. Mittels des verwendeten *Illumina Human HT-12 v4 Expression BeadChip Set* konnte die Expression von ca. 47.000 Transkripten des humanen Genoms evaluiert werden.

#### 3.2.7.1. Target Preparation

Für die *Target Preparation* wurden 2 µg der Ausgangs-RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der *BeadChip Array Station* nach dem Herstellerprotokoll. Während des Prozesses wurde die RNA in cDNA translatiert, mittels Spektrophotometer quantifiziert, dann normalisiert und fragmentiert. Endprodukt waren die Hybridisierungsfertigen Proben. Diese konnten sofort weiter verarbeitet oder bei -80° C eingefroren und gelagert werden.

#### 3.2.7.2. Hybridisierung

Bei diesem Schritt hybridisierten die fragmentierten cRNAs an Oligonukleotide auf den *Chips* der HT Arrayplatten. Nach der Vorbereitung der HT Arrayplatten und Proben sowie der Zusammenführung dieser durch die Arraystation nach dem Herstellerprotokoll, erfolgte für 16 Stunden die eigentliche Hybridisierung im Hybridisierungssofen bei 48° C.

#### 3.2.7.3. Färbung

Im nächsten Schritt wurde die nicht hybridisierte cRNA von den *Chips* der HT Arrayplatte gewaschen und die verbleibende hybridisierte cRNA mittels eines biotinierten Antikörpers sichtbar gemacht. Entgegen der Angabe im

## Methoden

Herstellerprotokoll wurde für die Färbung das *Stain Module* aus dem *BeadChip Hybridization, Wash and Stain Kit* verwendet. Die Durchführung des Wasch- und Färbevorganges sowie die Überführung der *Chips* in eine *Scan-Platte* erfolgten durch die Arraystation.

### 3.2.7.4. Scan und Qualitätskontrolle der Chips

Die *Chips* wurden im *BeadChip HT Array Plate Scanner* eingescannt und die gewonnenen Daten mit der *HiScan* auf ihre Qualität überprüft.

### 3.2.7.5. Normalisierung der Daten

Um die gewonnenen Daten der jeweiligen Probenexpression miteinander vergleichen zu können, mussten diese normalisiert werden. Die Normalisierung wurde mit dem *Microarray Analysis Suite* (MAS5) durchgeführt.

### 3.2.7.6. Unsupervised Analyse

Aus den Daten der Expressionsprofile wurden in der *unsupervised* Analyse Übereinstimmungen der Expression von Transkripten innerhalb der unterschiedlichen Proben detektiert ( $\Rightarrow$  *Cluster*). Diese zeigten die Korrelation und Verknüpfung zwischen den verschiedenen Proben auf. Die Darstellung erfolgte in Form eines Dendrogramms (siehe Anhang).

### 3.2.7.7. Supervised Analyse

Die *supervised* Analyse der Genexpression ermöglichte die Evaluierung signifikant unterschiedlich exprimierter Gene ( $p < 0,05$ ). Stringent wurden nur Expressionsunterschiede mit LCB (*lower confidence bound*) des *fold change*  $> 1,2$  berücksichtigt. Der LCB gilt als ein zuverlässiges Bewertungskriterium des *fold change* und ist von hohem statistischem



## Methoden

Stellenwert. Untersuchungen haben gezeigt, dass der LCB  $> 1,2$  in der Regel mit einem tatsächlichen *fold change* von minimum 3 korrespondiert (Ramalho-Santos et al. 2002). Die funktionelle Analyse der Gene und die Bildung von Gengruppen erfolgten mittels DAVID (*database for annotation, visualization and integrated discovery*). Des Weiteren konnten mittels *Venn Diagram Generator* die Expressionsprofile verschiedener Proben miteinander verglichen und auf Schnittmengen überprüft sowie durch IPA (*ingenuity pathway analysis upgrade advisor*) die von den Veränderungen betroffenen Signalwege ermittelt werden. Die SOM (*self-organized map clustering*) Analyse gab Aufschluss darüber, wie sich das Expressionsverhalten bestimmter Gene nach unterschiedlicher Behandlung verhielt. Mittels Literaturrecherche wurden zudem die funktionellen Bedeutungen sowie Beziehungen und somit der Einfluss der veränderten Gene auf die biologischen Mechanismen evaluiert.

## Methoden

### 3.2.8. Statistik

Für die Datenanalyse wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung berechnet. Sämtliche Versuche wurden 3-7 Mal wiederholt. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte durch den "Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test". Dieser Test erlaubt den Vergleich zweier unabhängiger Datengruppen bei einer nicht-normalverteilten Grundgesamtheit. Da biologische Phänomene selten der Gauß'schen Normalverteilung folgen, empfiehlt sich dieser nicht-parametrische Test um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. Dabei wurden Differenzen als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$  war.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Vorstudien – Resistenzinduktion und Dosisfindung

Zur Etablierung einer Resistenz wurden die Tumorzellen mit steigenden TEM-Konzentrationen behandelt. Die Zeitspanne bis zur Resistenzentwicklung betrug 3 - 5 Monate. Die Startdosis lag unterhalb der initialen IC<sub>50</sub>-Konzentration. Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Dosis wurde TEM in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (Juengel E. et al. 2014, Tsaur I. et al 2012). Nach der Resistenzinduktion wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen in Proliferationstests ermittelt. Die Tumorzellen wurden mit 1µM TEM behandelt, um die Reaktion TEM-sensibler versus TEM-resistenter Zellen zu messen.

Nach Induktion der Resistenz wurde die Reaktion gegenüber VPA gemessen. Zu diesem Zweck erfolgten die Behandlung mit VPA und entsprechende Analyse des proliferativen Verhaltens der Tumorzellen. Basierend auf Vorarbeiten starteten die Studien mit einer VPA-Konzentration von 1 mM (Daten nicht gezeigt).

Die Versuche beinhalteten den Vergleich zwischen TEM-sensiblen und TEM-resistenten Zellen sowie den Vergleich zwischen VPA behandelten resistenten und unbehandelten resistenten Zellen.

### 4.2. Wachstums- und Proliferationsanalysen

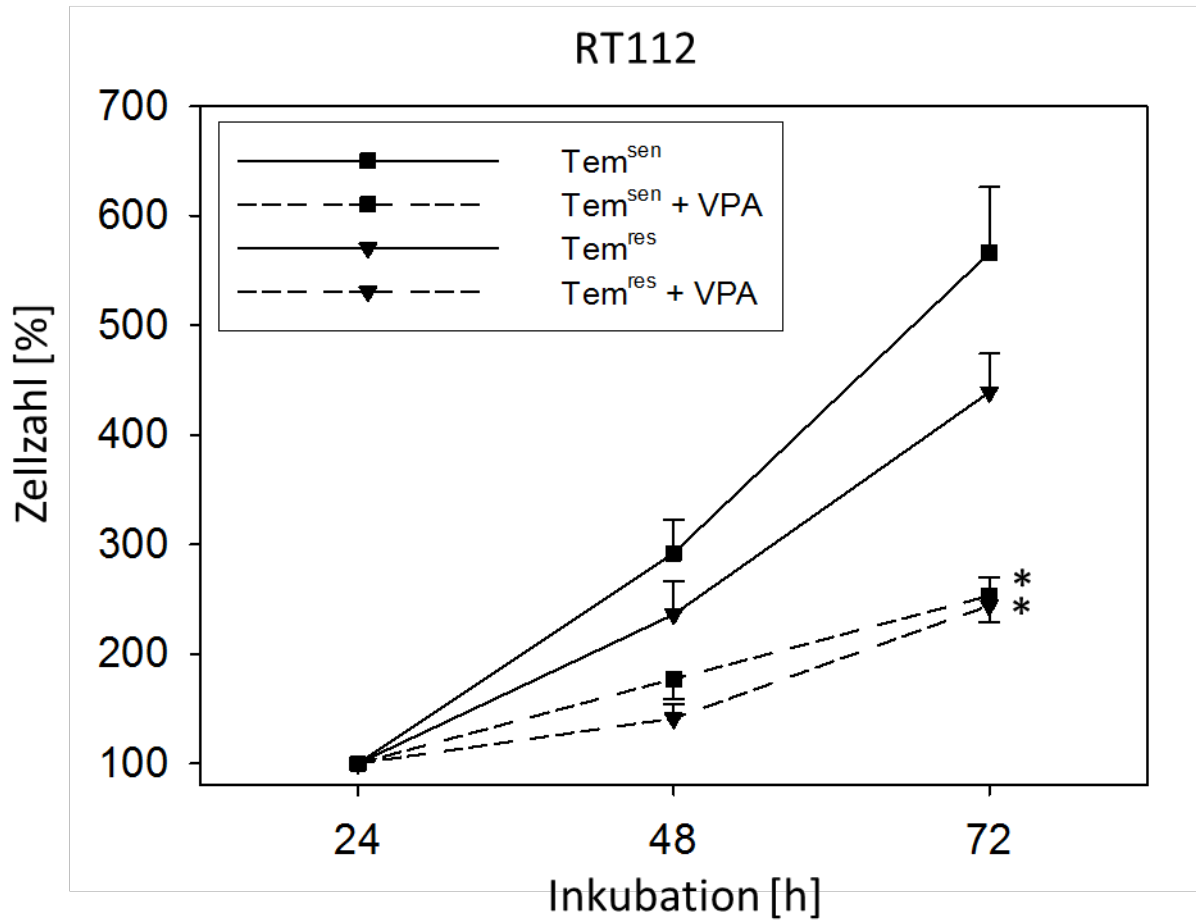
Ein Hauptmerkmal von malignen Tumoren ist das unkontrollierte Wachstum. Deshalb sollten in Wachstumsstudien das Proliferationsverhalten der TEM-resistenten RT112 und UMUC3 nach VPA Behandlung evaluiert werden. Zum Vergleich wurde auch das Proliferationsverhalten von unbehandelten, TEM-sensiblen Zellen analysiert.

#### 4.2.1. MTT- Assay

Mithilfe des MTT-Wachstumstests wurde das Zellwachstum der Blasenkarzinomzellen untersucht. Nach Ausplattierung der Zellen erfolgte die Quantifizierung nach 24, 48 und 72 Stunden. Sowohl TEM-sensible als auch TEM-resistente Zellen beider Zelllinien reagierten auf die VPA Behandlung im Sinne eines Wachstumstopps (siehe Abb. 5 & 6). Zudem war zu beobachten, dass die TEM-sensible RT112-Zellen stärker wuchsen als TEM-resistente RT112-Zellen (siehe Abb.5). Nach VPA Behandlung ist in RT112 das Wachstum der TEM-sensiblen Zellen stärker inhibiert als bei den TEM-resistenten Zellen (siehe Abb. 5).

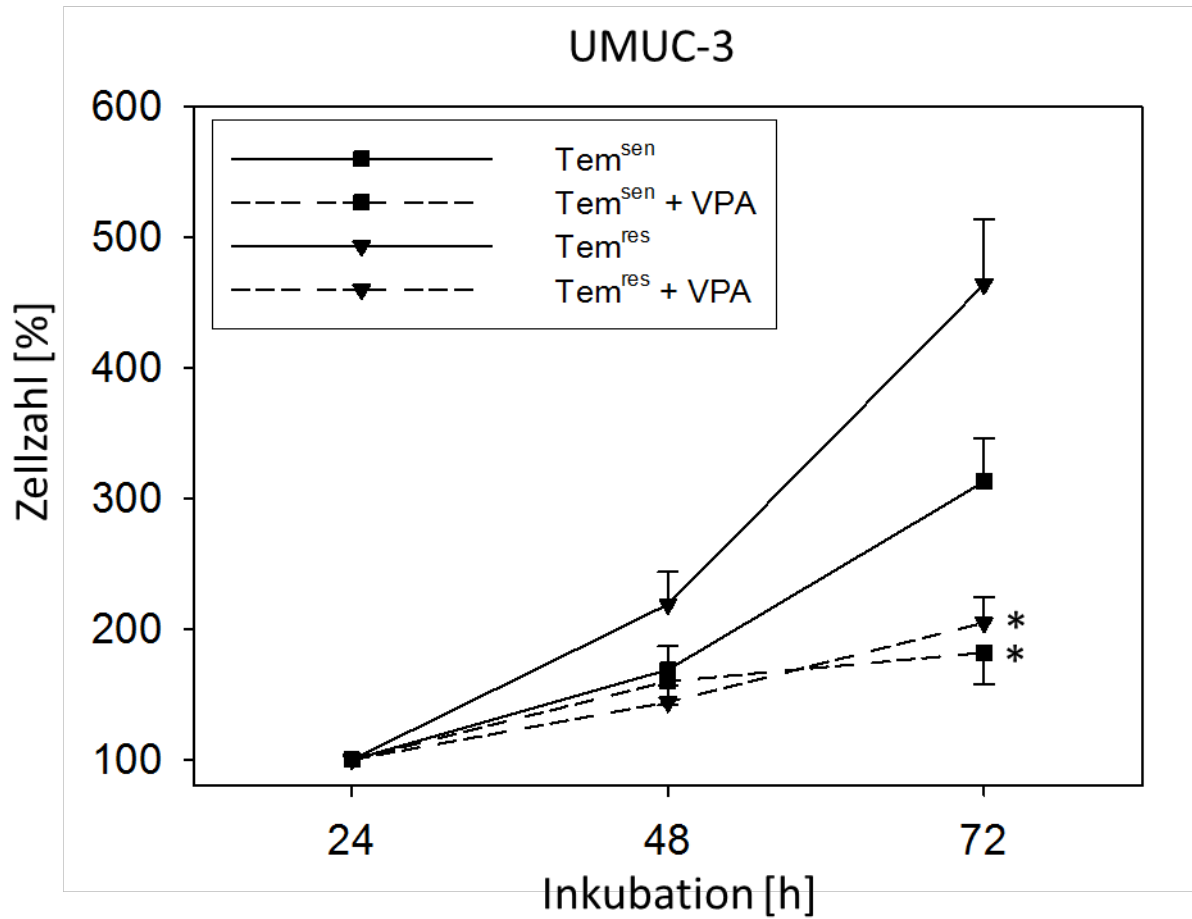
Im Gegensatz zu RT112 wuchsen resistente UMUC3-Zellen stärker als die sensiblen Zellen (siehe Abb. 6). In Abhängigkeit der Inkubationsdauer nahmen dabei die Unterschiede zu. Die deutlichsten Effekte waren nach 72 Stunden Inkubationszeit zu verzeichnen. Hier kam es nach der VPA Behandlung zu einer stärkeren Wachstumsinhibition der TEM-resistenten Zellen im Vergleich zu TEM-sensible Zellen (siehe Abb. 6).

## Ergebnisse



**Abbildung 5:** Wachstum der RT112 nach VPA Behandlung ermittelt mittels MTT-Assay. Die Anzahl der Zellen sind nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden in 96-Well-Platten gemessen. Die 24 Stunden- Messwerte sind auf 100% gesetzt. Die Zellzahl ist in Prozent (%) angegeben. Repräsentativ aus n = 5 Versuchen mit Signifikanz \*.

## Ergebnisse



**Abbildung 6:** Wachstum der UMUC3 nach VPA Behandlung ermittelt mittels MTT-Assay. Die Anzahl der Zellen sind nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden in 96-Well-Platten gemessen. Die 24 Stunden- Messwerte sind auf 100% gesetzt. Die Zellzahl ist in Prozent (%) angegeben. Repräsentativ aus n = 5 Versuchen mit Signifikanz \*.

## Ergebnisse

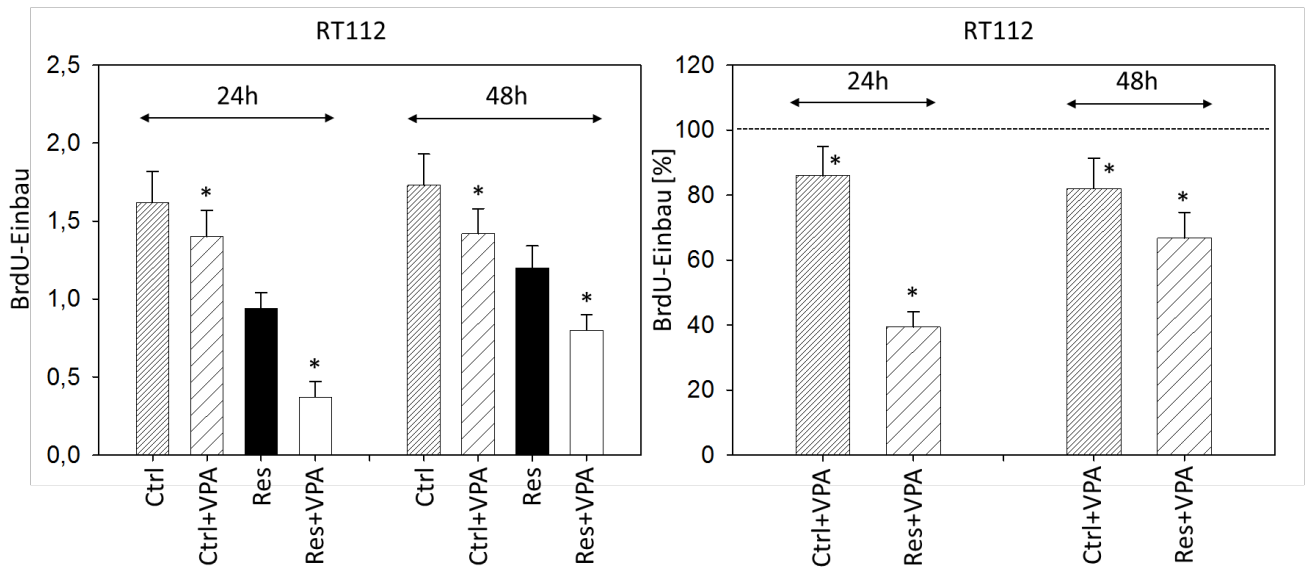
### 4.2.2. BrdU- Assay

Parallel zu den Wachstumsanalysen wurde die Proliferationsrate der Zellen mit dem BrdU Assay ermittelt. BrdU wird in die DNA proliferierenden Zellen eingebaut und gibt somit Aufschluss über ihre mitotische Aktivität. Die Messungen fanden nach 24 und 48 Stunden statt. Der Messwert nach 24 Stunden wurde auf 100 % gesetzt und diente als Ausgangswerte für die Berechnung der 24- bzw. 48 Stunden Abweichung.

In Abbildung 7 wird ein Testergebnis einer Messreihe mit RT112-Zellen gezeigt. Sowohl in den TEM-sensiblen als auch in den TEM-resistenten Turmorzellen wurde die Proliferation nach der VPA Behandlung supprimiert. Dabei war der Proliferations-hemmende Effekt des HDAC-Inhibitors auf TEM-resistente RT112 Zellen stärker ausgeprägt als auf TEM-sensible Zellen.

Abbildung 8 spiegelt die anhand UMUC3 ermittelten Ergebnisse wider. Auch hier war ein Rückgang der Proliferation nach VPA Behandlung zu verzeichnen. Der 48 Stunden Messwert verdeutlicht, dass die HDAC-Inhibition ähnliche anti-proliferierende Effekte sowohl auf TEM-sensible als auch auf TEM-resistente Zellen ausübt – im Unterschied zu RT112.

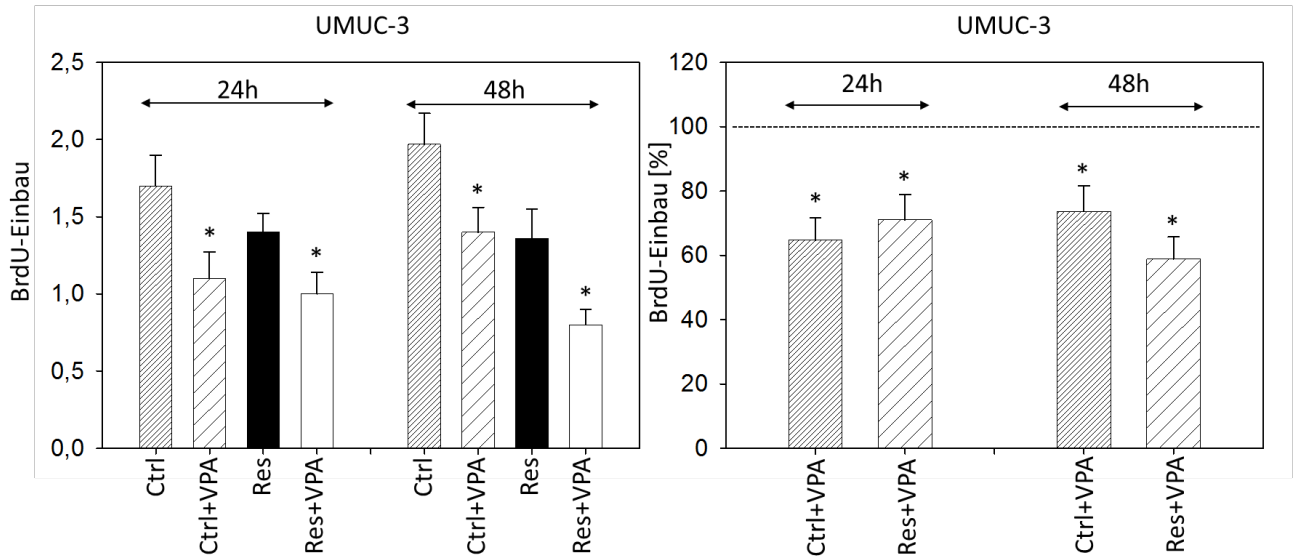
## Ergebnisse



**Abbildung 7:** Wachstum der RT112 nach VPA Behandlung ermittelt mittels BrdU-Assay. **Li:** Die Anzahl der Zellen sind nach Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden in 96-Well-Platten gemessen. **Re:** Direkter Vergleich der 24 und 48 Stunden- Messwerte nach VPA Behandlung. Die 24 Stunden- Messwerte sind auf 100% gesetzt. Der BrdU-Einbau ist in Prozent (%) angegeben. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen mit Signifikanz \*.



## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Wachstum der UMUC3 nach VPA Behandlung ermittelt mittels BrdU-Assay. **Li:** Die Anzahl der Zellen sind nach Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden in 96-Well-Platten gemessen. **Re:** Direkter Vergleich der 24 und 48 Stunden- Messwerte nach VPA Behandlung. Die 24 Stunden- Messwerte sind auf 100% gesetzt. Der BrdU-Einbau ist in Prozent (%) angegeben. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen mit Signifikanz \*.

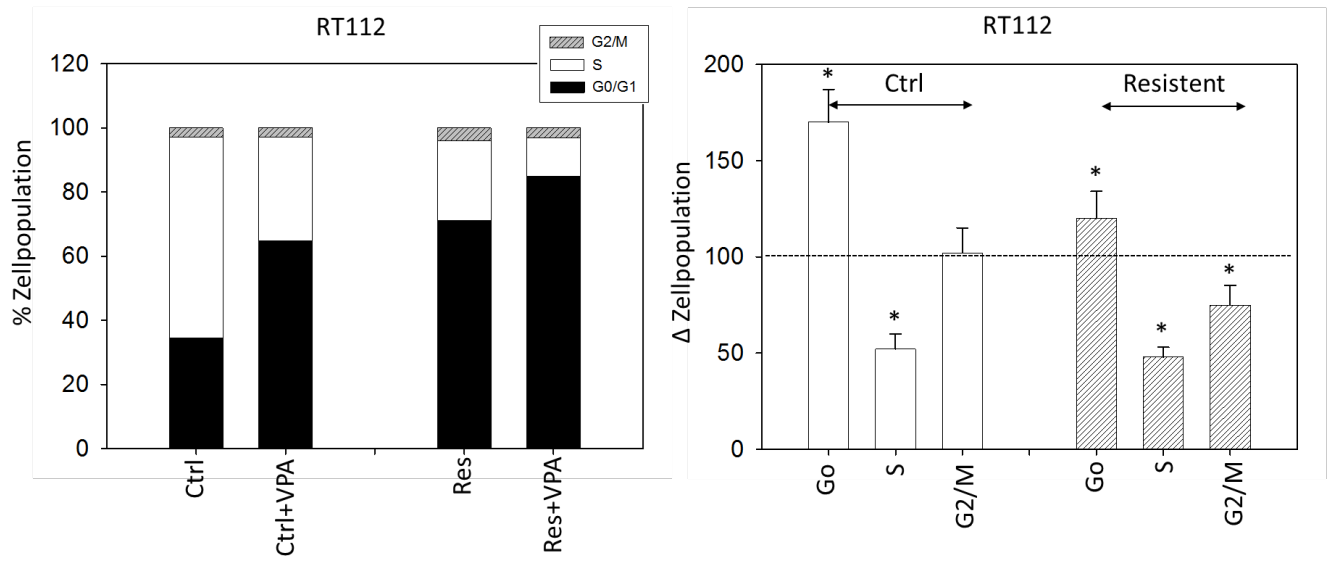
### 4.3. Zellzyklusanalyse

Da Veränderungen des Zellwachstums mit Veränderungen des Zellzyklusses korrelieren, wurden zur Aufklärung der Wirkmechanismen von VPA die Zellzyklusphasen evaluiert. Die Unterschiede der einzelnen Phasen wurden anhand der Tem-sensiblen, Tem-resistenten Tumorzellen und nach VPA Behandlung ermittelt.

Bezüglich RT112-Zellen befanden sich mehr resistente Zellen in der G0/G1-Phase (analog weniger in der S-Phase), verglichen zu den sensiblen Zellen. Unabhängig davon, wurde in beiden Populationen nach 3-tägiger Behandlung mit 1 mM VPA eine deutliche Zunahme in der G0/G1-Phase, begleitet von einer Reduktion in der S-Phase, beobachtet (siehe Abb. 9).

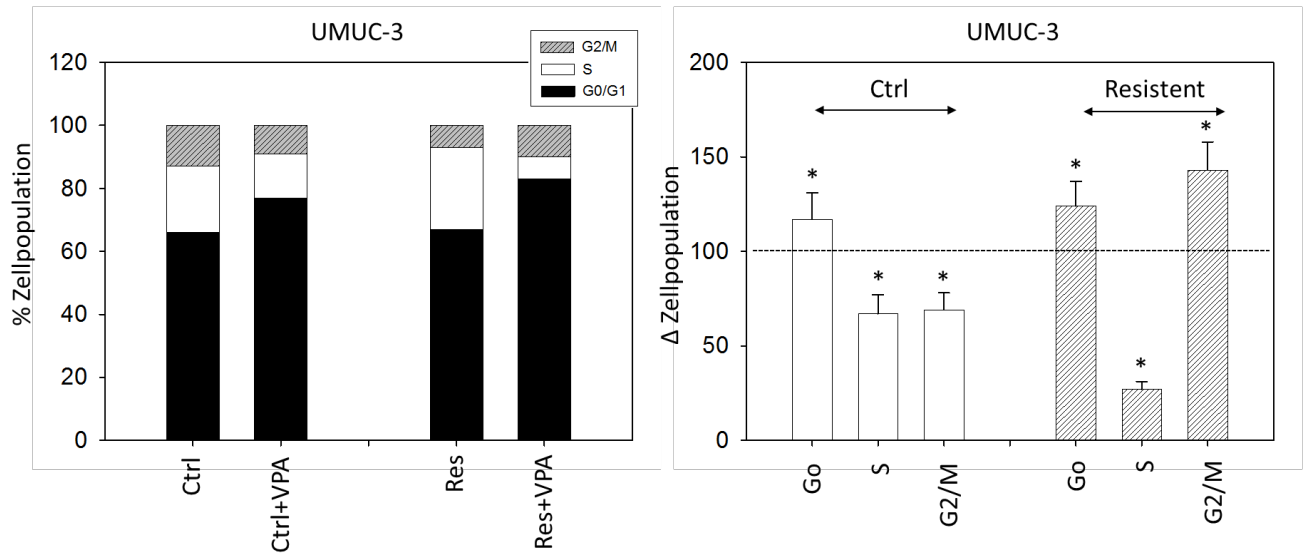
Bei UMUC3-Zellen ähnelte sich die prozentuale Aufteilung der resistenten und sensiblen Zellen in die unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Interessanterweise erniedrigte sich der Anteil von sowohl TEM-sensiblen S- als auch G2/M-Phase Zellen unter VPA, wohingegen sich bei TEM-resistenten Zellen der Anteil an S-Phase-Zellen reduzierte, sich jedoch der Anteil an G2/M-Phase-Zellen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte (siehe Abb. 10).

## Ergebnisse



**Abbildung 9:** Darstellung der Zellzyklusphasen der RT112 nach der VPA Behandlung mittels Durchflusszytometrie. **Li:** Prozentuale Zellverteilung in den Phasen G0/G1, S und G2/M. **Re:** Prozentuale Veränderung einzelner Phasen verrechnet zur Kontrolle (100 %). Repräsentativ aus n = 4 Versuchen mit Signifikanz \*.

## Ergebnisse

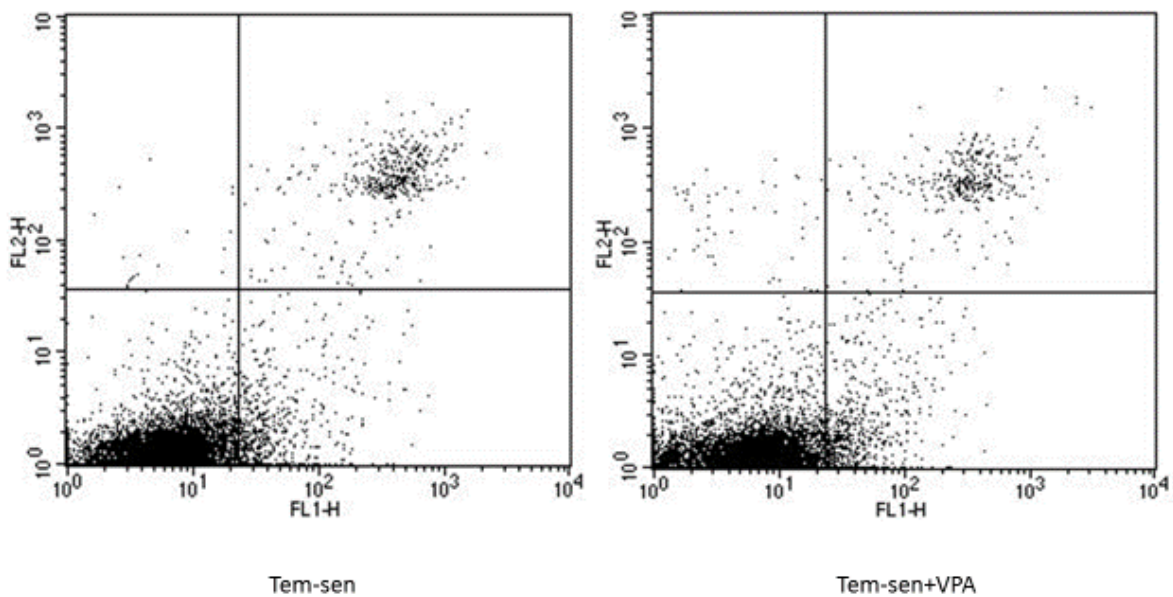


**Abbildung 10:** Darstellung der Zellzyklusphasen der UMUC3 nach der VPA Behandlung mittels Durchflusszytometrie. **Li:** Prozentuale Zellverteilung in den Phasen G0/G1, S und G2/M. **Re:** Prozentuale Veränderung einzelner Phasen verrechnet zu Kontrolle (100 %). Repräsentativ aus n = 4 Versuchen mit Signifikanz \*.

## Ergebnisse

### 4.4. Apoptose

Die Zellzahl lässt sich durch apoptotische Ereignisse verringern. Mittels Annexin V und FACS wurden daher RT112 und UMUC3 auf Apoptosephänomene hin untersucht. Nach Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Zugabe konnten in den Messungen keine relevanten Veränderungen des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen nach VPA Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen erfasst werden. Abbildung 11 demonstriert repräsentativ das Verteilungsmuster TEM-sensibler UMUC3 Zellen (Vitale Zellen: 82 %, nekrotische Zellen: 2 %, früh-apoptotische Zellen: 6 %, spät-apoptotische Zellen: 10 %).



**Abbildung 11:** Darstellung der Apoptose mittels FACS/ Annexin V-FITC und Propidiumiodid. Repräsentativ UMUC3 nach VPA Behandlung. Scatter Plot: links: TEM-sensible Zellen; rechts: 3 Tage Behandlung mit 1mM VPA. Verteilung re.: vital 82 % (unten links), früh-apoptotisch 6 % (unten rechts), nekrotisch 2 % (oben links) und spät-apoptotisch 10 % (oben rechts). Repräsentativ aus n = 4 Versuchen.

### 4.5. Western Blot

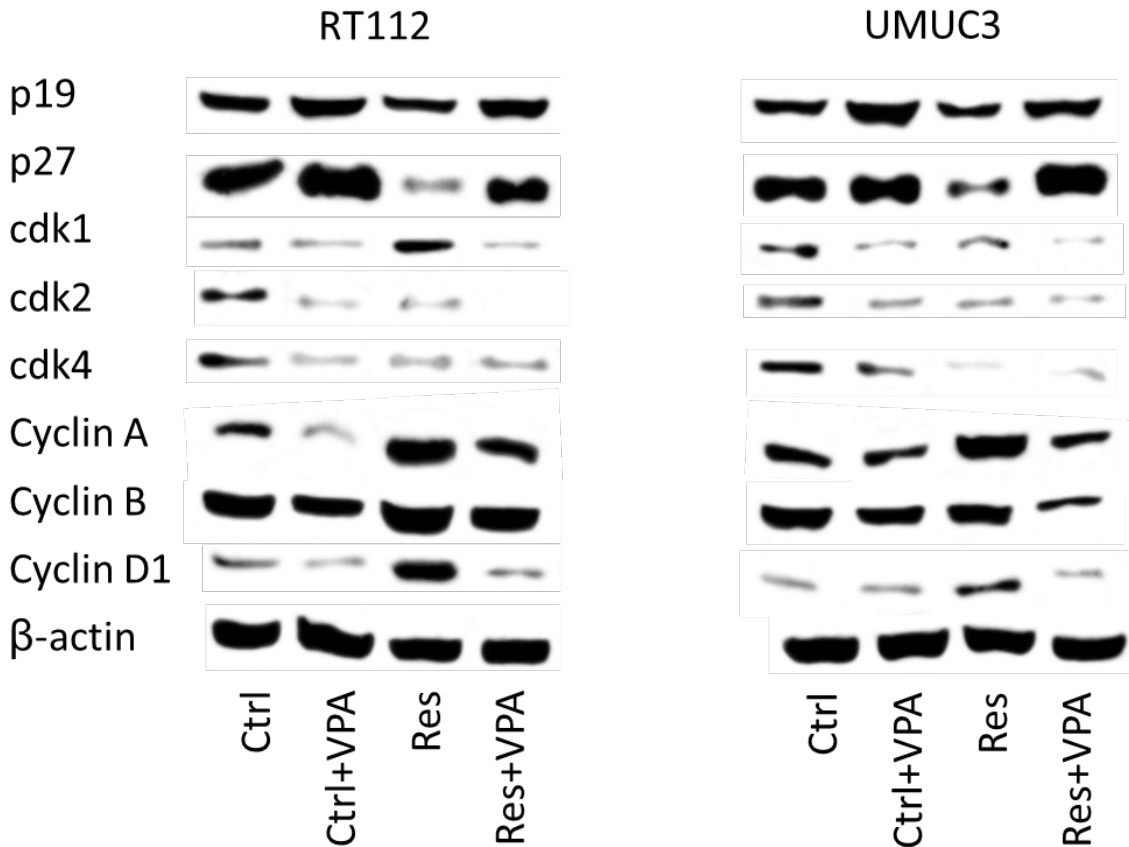
#### 4.5.1. Expression von Zellzyklusproteinen

Mittels Western Blot wurde die Expression von Zellzyklusproteinen in RT112 und UMUC3 nach drei tägiger Behandlung mit 1 mM VPA detailliert untersucht.

TEM-resistente RT112 Zellen verglichen zu TEM-sensiblen Zellen zeigten eine vermehrte Expression der Proteine Cdk1, Cyclin A, Cyclin B und Cyclin D1. Hingegen waren die Proteine p 27, Cdk2 und Cdk4 bei den TEM-sensiblen Tumorzellen stärker vertreten. Abgesehen von einer vermehrten Cdk1-Expression in TEM-sensiblen UMUC3-Zellen ähnelte das Expressionsmuster demjenigen der RT112-Zellen (siehe Abb. 12).

Unter VPA erhöhte sich p 19 und p 27, sowohl in TEM-sensiblen als auch in TEM-resistenten RT112 und UMUC3 Tumorzellen. Zu einer deutlichen Reduktion kam es hingegen bezüglich der Zellzyklusproteine Cdk1, Cdk2, Cyclin A, Cyclin B und Cyclin D1 (nicht sensible UMUC3). Cdk4 wurde unter VPA ausschließlich in den sensiblen Tumorzellen verringert.

## Ergebnisse



**Abbildung 12:** Analyse der Zellzyklusproteine mittels Western Blot. **Li:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von RT112-Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. **Re:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von UMUC3- Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. Pro Probe wurden 50  $\mu$ g Protein eingesetzt.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Repräsentativ aus n = 5 Versuchen

### 4.5.2. Expression von Zielproteinen relevanter intrazellulärer Signalsysteme

Die Analyse wichtiger Schaltproteine der mTOR-Signalachse wurde mittels Western Blot evaluiert. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die phosphorylierte Form der Kinasen, um Aufschluss über die Aktivität des jeweiligen Proteins zu erhalten.

## Ergebnisse

Der Effekt einer chronischen Behandlung mit TEM äußerte sich in einer verstärkten Expression von pAkt, pmTOR und pRaptor (verglichen zur sensitiven Kontrolle). Dagegen wurden pRictor und p70S6k vermehrt in TEM-sensiblen Zellen exprimiert (siehe Abb. 13, links).

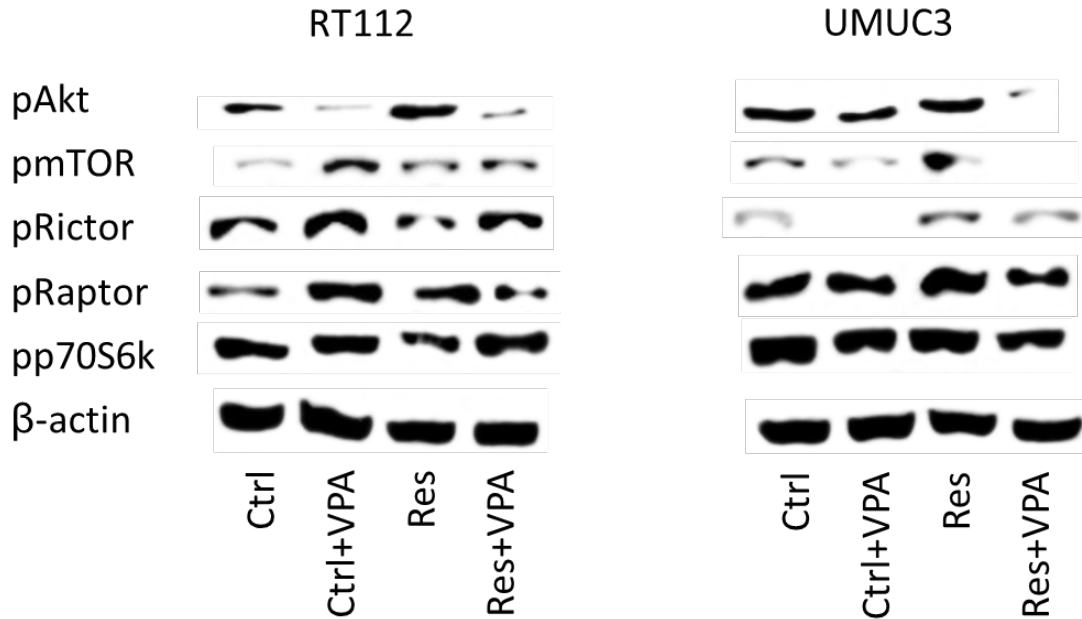
Durch die 3-tägige Applikation von VPA in RT112 verringerte sich die Aktivität von Akt (pAkt) in den sensiblen und resistenten Zellpopulationen (verglichen zur jeweiligen Kontrolle). pRaptor reduzierte sich lediglich in den TEM-resistenten, erhöhte sich dagegen in den TEM-sensitiven Zellen. pRictor wurde deutlich in sensiblen und resistenten RT112-Zellen aufreguliert, pmTOR primär in sensitiven, p70S6K primär in resistenten Zellen erhöht.

Die Analyse der Proteinexpression in sensitiven versus resistenten UMUC3-Zellen demonstrierte eine distinkt erhöhte Expression von pmTOR, pRictor und pRaptor in der resistenten Population. pAkt war gegenüber den sensiblen UMUC3-Zellen nur sehr dezent erhöht, pp70S6k nur sehr dezent verringert (siehe Abb. 13, rechts).

Unter VPA reduzierte sich der Gehalt sämtlicher evaluierten Proteine in den resistenten Zellen (versus Kontrollen). Zu betonen ist der ausgeprägte supprimierende Einfluss auf die resistenten Zellen.



## Ergebnisse



**Abbildung 13:** Analyse der Zielproteine mittels Western Blot.

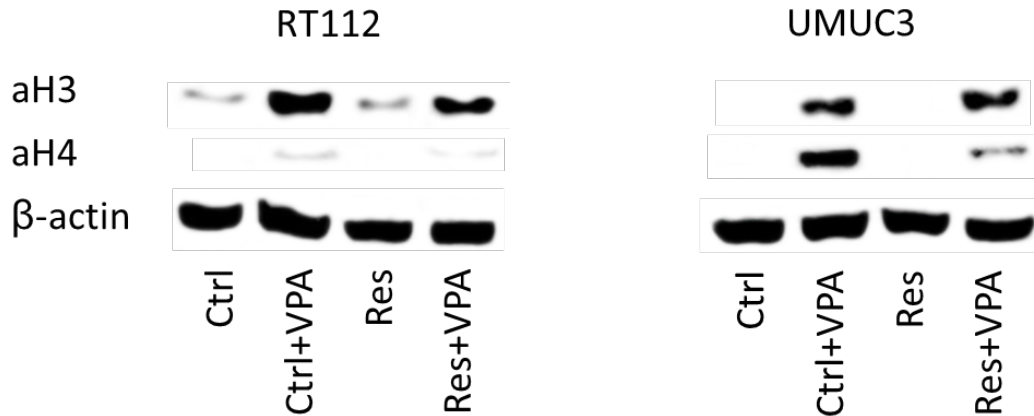
**Li:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von RT112-Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. **Re:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von UMUC3- Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. Pro Probe wurden 50 µg Protein eingesetzt. β-Aktin diene als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Repräsentativ aus n = 5 Versuchen

### 4.5.3. Expression der Histone

Die HDACs in RT112 und UMUC3 wurden durch die VPA-Behandlung inhibiert. Die Expression ihrer Substrate, acetyliertes Histon 3 und acetyliertes H4, wurde mittels Western Blot evaluiert.

In Abbildung 14 ist die Hyperacetylierung und die deutlich verstärkte Expression von aH3 und aH4 nach der VPA-Behandlung dargestellt (Tem-sensible versus Tem-resistente Tumorzellen).

## Ergebnisse



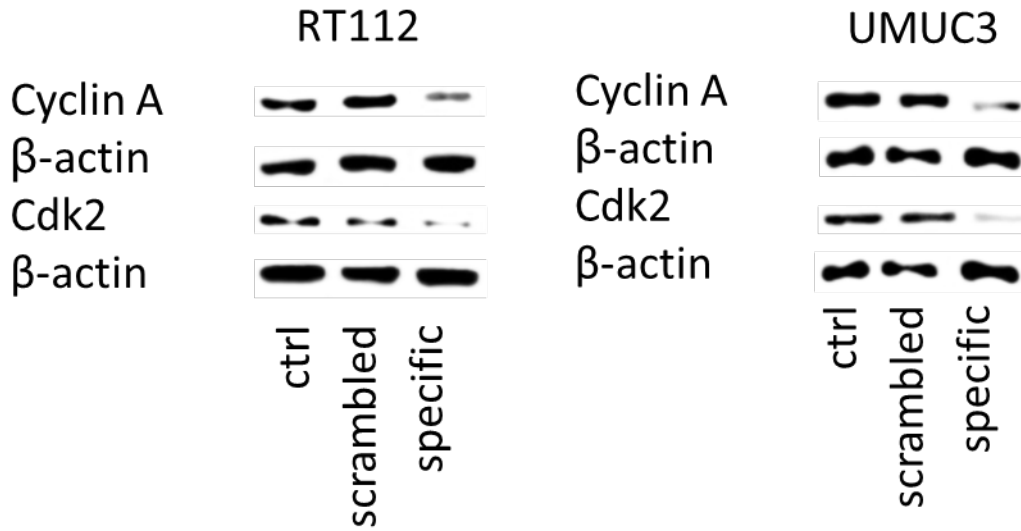
**Abbildung 14:** Analyse der Histone 3 und 4 (acetyliert) mittels Western Blot. **Li:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von RT112-Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. **Re:** Proteinbanden der jeweiligen Antikörper von UMUC3-Zellen nach 3-tägiger VPA-Applikation. Pro Probe wurden 50 µg Protein eingesetzt. β-Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Repräsentativ aus n = 4 Versuchen

### 4.6. Blockadestudien

Die funktionelle Relevanz der Zellzyklusproteine Cdk2 und Cyclin A wurde anhand des MTT-Tests ermittelt (Analyse des Zellwachstums). Dazu wurden die Zielproteine in den Tumorzellen mit spezifischer siRNA herunter reguliert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Western Blot überprüft. Anschließend erfolgte die MTT-Messung.

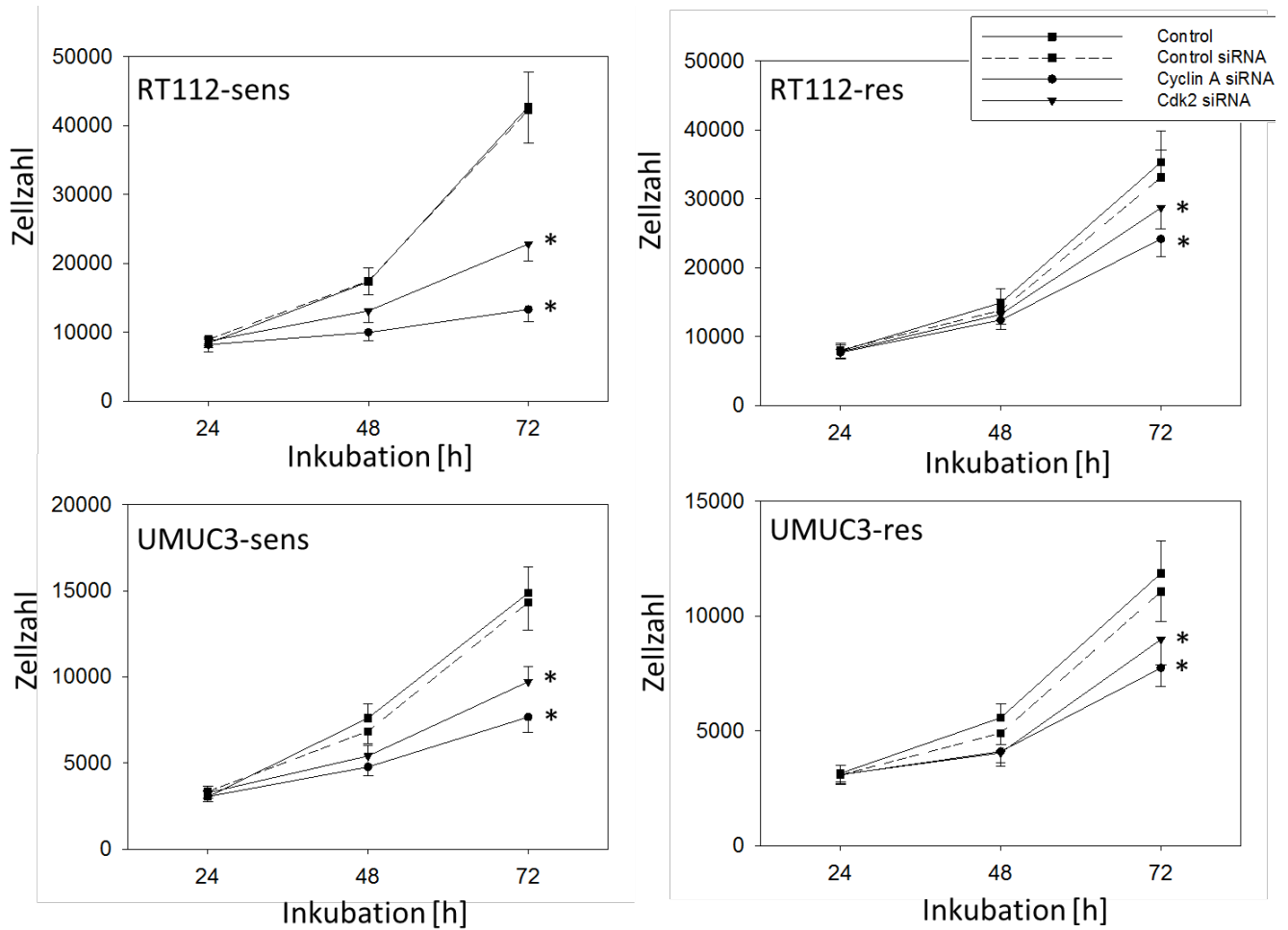
Sowohl in RT112 als auch in UMUC3 kam es nach der Behandlung mit der spezifischen siRNA zu einer verminderten Expression von Cdk2 und Cyclin A (siehe Abb. 15 & 16). Unbehandelte Kontrollzellen (ctrl) und die Zellen nach der Behandlung mit scrambled siRNA zeigten ein ähnliches Expressionmuster, was unerwünschte technische Nebeneffekte ausschließt (siehe Abb. 15 & 16). Die parallel laufende MTT-Messung zeigte eine signifikante Inhibition des Wachstums der Tumorzellen nach Suppression von Cdk2 und Cyclin A (siehe Abb. 16).

## Ergebnisse



**Abbildung 15:** Western Blot Analyse zur siRNA-Transfektionseffizienz. Proteine aus RT112 und UMUC3 ohne Behandlung (ctrl), Behandlung mit scrambled siRNA und spezifischer siRNA (specific). Pro Probe wurden 50  $\mu$ g Protein eingesetzt.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen.

## Ergebnisse



**Abbildung 16:** Wachstum von RT112 und UMUC3 nach Suppression von Cyclin A bzw. Cdk2, ermittelt mittels MTT-Assay. Die Anzahl der Zellen sind nach Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden in 96-Loch-Platten gemessen. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen mit Signifikanz \*.

## **Ergebnisse**

### **4.7. Microarray**

Mittels Microarray-Analysen wurden Genexpressionsprofile der RT112 und UMUC3 nach VPA Behandlung erstellt und miteinander verglichen. Es wurden drei unabhängige Ansätze durchgeführt.

Die Daten wurden vom Bioinformatiker nicht zu Ende analysiert und sind nicht Bestandteil der Ergebnisauswertung. Im Anhang befindet sich das Rohmaterial.

### 5. Diskussion

Neue Kenntnisse in der Tumorthherapie haben zu innovativen Lösungskonzepten geführt. Im Rahmen der Target-Therapie sollen spezifische Agenzien gezielt relevante biologische Mechanismen modulieren und so effektiver Einfluss auf die Tumorgenese und –progression genommen werden. Der Ansatz richtet sich vor allem gegen Moleküle mit vermehrter Expression und erhöhter Aktivität in den Tumorzellen.

Einen solchen Angriffspunkt im Blasenkarzinom stellt die mTOR-Signalkaskade dar (Madka et al. 2016, Sun et al. 2011, Ching et al. 2010). Im Tumorgewebe ist im Vergleich zum gesunden Gewebe die verstärkte Expression der mTOR assoziierten Akt-Kinase nachgewiesen (Costa et al. 2015, Korkolopoulou et al. 2012, Zhou et al. 2012). In der Tat lässt sich im Tier- und Zellkulturmodell durch eine mTOR-Blockade das Wachstum von Blasenkarzinomzellen deutlich hemmen (Chiong et al. 2011, Schedel et al. 2011, Fechner et al. 2009).

Der mTOR-Inhibitor TEM, in Deutschland in der Behandlung des Mantelzelllymphoms und aller Prognosestadien des metastasierten Nierenzellkarzinom etabliert, zeigte eine vielversprechende klinische Wirksamkeit (Kelly et al. 2011, Jonathan et al. 2011). Seine Anwendung wurde auch beim fortgeschrittenen Blasenkarzinom eingefordert (Mansure et al. 2009). Eine chronische mTOR-Blockade kann jedoch kompensatorische Mechanismen in der Tumorzelle auslösen, die mit einer nachlassenden Medikamentenwirkung korrelieren (Juengel et al. 2012). Dazu zählt insbesondere die Aktivierung der Akt-Kinase, die unmittelbar die mTOR-Funktion reguliert (Juengel et al. 2012, O'Reilly et al. 2006, Sun et al. 2005). Obwohl die Feedback-Abläufe im Einzelnen nicht verstanden sind, können sie im engen Zusammenhang mit einer sich entwickelnden Medikamenten-Resistenz stehen (Juengel et al. 2012).

## **Diskussion**

Auch eine verstärkte Expression von HDAC ist entscheidend mit der Tumorentstehung assoziiert (Damaskos et al. 2016, Bolden et al. 2006, Halkidou et al. 2004). In den Tumorzellen kommt es zu einer pathologisch veränderten Transkription und sie beginnen in unkontrollierbarem Maße zu wachsen und metastatische Eigenschaften zu entwickeln (Weichert et al. 2008, Lui et al. 2006, Bolden et al. 2006, Hanahan et al. 2000).

Der Vorgang der erhöhten HDAC-Expression kann mittels HDAC-Inhibitoren revertiert werden. An zahlreichen Tumorentitäten ist belegt, dass eine HDAC-Inhibition zum Wachstumsstopp chemo- und hormonresistenter Zellen führt (z.B. Lee et al. 2012, Cooper et al. 2012, Ozaki et al. 2008). Mehrere HDAC-Inhibitoren sind entwickelt worden und befinden sich in der präklinischen und klinischen Prüfung. Unter ihnen ist VPA zur Behandlung der Epilepsie in der Klinik bereits etabliert. Nicht zuletzt zeichnet es sich durch ein günstiges Sicherheitsprofil aus. VPA verhindert im Tierexperiment Tumorstadium und -ausbreitung (Gottlicher et al. 2001). Dabei übt VPA nicht nur direkte anti-tumorale Effekte aus (Juengel et al. 2013, Hudak et al. 2012, Jones et al. 2009). Es vermag zudem auch resistent gewordene Tumorzellen zu re-sensibilisieren (Lin et al. 2008). Ergebnisse der urologischen Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass unter VPA die malignen Eigenschaften chemoresistenter Tumorzellen revertiert werden können (Blaheta et al. 2007, Kotchetkov et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass die Anwendung VPAs in der Behandlung des Blasenkarzinoms die Gefahr einer durch TEM induzierten Resistenz abzuwenden vermag.

### **5.1. Wachstumsmodulation**

Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie erbrachten den Nachweis einer durch VPA induzierten anti-proliferativen Wirkung auf die Blasenkarzinomzellen RT112 und UMUC3. Dabei ließ sich feststellen, dass dieser Effekt teilweise in den TEM-

## Diskussion

resistenten Tumorzellen deutlich ausgeprägter ausfiel als in TEM-sensiblen Zellen (siehe Abb. 7).

Die Relation zwischen der effektiven Wachstumshemmung durch VPA und seiner Applikationsdauer (in diesem Fall 3 Tage) legt die Erkenntnis nahe, dass eine längere Behandlung mit VPA notwendig ist, um effizient der Proliferation des Tumors entgegen zu wirken. Im Einklang verdeutlichen frühere Untersuchungen, dass der HDAC-Inhibitor VPA seine biologische Wirkung erst nach längerer Applikation erzielt (Blaheta et al. 2007).

Die Resistenz gegenüber TEM, die in beiden Zelllinien nach demselben Protokoll etabliert wurde, spiegelte sich in RT112 und UMUC3 unterschiedlich wider. Während die Tem-resistenten RT112 Zellen im Vergleich zu den TEM-sensiblen Zellen trotz der Resistenzinduktion ein verringertes Wachstum aufwiesen, ließ sich in UMUC3 das Gegenteil beobachten. Die Proliferation der Tem-resistenten UMUC3 Zellen war wesentlich stärker ausgeprägt, als diejenige der sensiblen Population.

Dieses Resultat scheint mit einer abnehmenden TEM- Sensibilität bei höherer TNM-Klassifikation bzw. niedrigeren Differenzierungsgrad in Verbindung zu stehen. Das bedeutet, je aggressiver und maligner ein Tumor ist, desto auffallender werden Feedbackkreisläufe durch die Langzeitbehandlung mit TEM gebildet und ein erneutes Wachstum der Tumorzellen gefördert. In guter Übereinstimmung mit dieser Hypothese haben frühere Studien gezeigt, dass unterschiedlich klassifizierte Tumoren durch diverse Mechanismen unterschiedlich moduliert werden und so Einfluss auf z.B. die Proliferation ausüben (Xia Zhang et al. 2015 und Whitehead B. et al. 2015).

In einer Untersuchung am metastasierten Nierenzellkarzinom reagierte diese Entität anfänglich unter TEM-Behandlung mit einem Wachstumsrückgang. Im Verlaufe der Therapie kam es aber zur Krankheitsprogression (Rini et al. 2009). Postuliert wurde, dass möglicherweise andere Proteine bzw. Signalwege außerhalb der mTOR-Signalachse die Tumorpheriferation antreiben könnten (Rini



## **Diskussion**

et al. 2009). Tatsächlich führte die Blockade der HDAC durch eine 3 –tägige Applikation von VPA in beiden, TEM-sensiblen und TEM-resistenten, Zelllinien zu einer Wachstumsinhibition. In der Tat weisen frühere Ergebnisse darauf hin, dass VPA nicht nur direkte anti-tumorale Effekte ausübt, sondern resistent gewordene Tumorzellen auch re-sensibilisiert (Blaheta et al. 2007, Kotchetkov et al. 2003). Rückkopplungsmechanismen, die unter Langzeittherapie mit TEM zu einer Medikamenten-Resistenz geführt haben, wurden revertiert.

Im Rahmen der vorliegenden Daten über Wachstumsanalysen wurde ein aggressives Proliferationsverhalten von TEM-resistenten gegenüber TEM-sensiblen, insbesondere der niedriger differenzierten Zellen, beleuchtet. Erstmals wurde anhand von Blasenkarzinomzellen gezeigt, dass die Anwendung VPAs in der Behandlung des Blasenkarzinoms die Gefahr einer durch TEM induzierten Resistenz abzuwenden vermag.

## **5.2. Zellzyklusanalyse**

Zur weiteren Aufklärung der Wirkmechanismen von VPA wurden die Zellzyklusphasen und Zellzyklusproteine analysiert. Die Unterschiede wurden anhand von TEM-sensiblen und TEM-resistenten Tumorzellen ermittelt. In beiden Zelllinien, RT112 und UMUC3, stand die wachstumshemmende Wirkung von VPA in engem Zusammenhang mit einer Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase bzw. einer Abnahme der S-Phase. Diese Erkenntnis wurde in TEM-resistenten Zellen besonders deutlich.

### **5.2.1. Modulation der Zellzyklusproteine durch VPA**

Neben der Hemmung der Proliferation und der Verschiebung der Zellzyklusphasen mit einem vermehrten G0/G1- Arrest wurden regulatorische Zellzyklusproteine modifiziert. Sowohl RT112 als auch UMUC3 zeigten nach der VPA Behandlung eine verstärkte Expression der Tumorsuppressoren p27 und p19.

## Diskussion

Das Protein p27 kontrolliert den Übergang von G<sub>0</sub>- zur G<sub>1</sub>-Phase. Bei einer Überexpression können sie Cdk/Cyclin-Komplexe inaktivieren und den Phasen-Übergang verhindern (Mussachio et al. 2005). Offensichtlich spielt p27 eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklusses. In mehreren Studien wurde der Verlust von p27 in malignen Tumoren mit schlechten Prognosen bewertet (Pertia et al. 2009, Langner et al. 2004, Hedberg et al. 2002). Schließlich wurde auch eine abnehmende p27-Expression mit einer zunehmenden Tumorgroße in Relation gesetzt (Migita et al. 2002).

Das Regulatorprotein p19 inaktiviert das multifunktionale Protein Mdm2, welches als Protoonkogen p53 negativ reguliert. Damit unterstützt p19 den Tumorsuppressor p53 in seiner Funktion als Regulator der Apoptose und der DNA-Reparatur (Weber et al. 2000). Es lässt sich daraus ableiten, dass VPA über einen Zunahme von p19 und p27 blockierend in die Zellzyklusprogression und Tumorgenese einzugreifen vermag.

Ferner führte die VPA Behandlung zur Modulation weiterer Mediatoren des Zellzyklusses. Alle getesteten Proteine; Cyclin A, Cyclin B, Cylin D1 und Cdk1, Cdk2 und Cdk4, waren betroffen.

Die cyclinabhängigen Proteinkinasen bilden mit spezifischen Cyclinen Komplexe und sind wesentlich an der Regulation des Zellzyklusses beteiligt. Die aktivierten Cyclin/Cdk-Komplexe bilden Kontrollpunkte und bestimmen den Übergang zwischen den einzelnen Phasen der Mitose.

So reguliert Cyclin D1/Cdk4 das Fortschreiten in die G<sub>1</sub>-Phase. Dadurch, dass Cyclin D1 und Cdk4 durch VPA deutlich reduziert waren, wurde demnach die Zellzyklusprogression in ihrem Ablauf gehemmt.

Am Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase ist der Cyclin E/Cdk2-Komplex involviert. Auch Cyclin A kann mit Cdk1 und Cdk2 einen Komplex eingehen und so die S-Phase bzw. den Übergang in die G<sub>2</sub>-Phase steuern (Malumbres et al. 2001). Durch die VPA Behandlung kam es zu einer Reduktion von Cyclin A, Cdk1 und 2.

## **Diskussion**

Dieses Ergebnis korrelierte mit der gemessenen Abnahme der RT112- und UMUC3-Zellen in der S-Phase nach VPA-Applikation.

Bezüglich Cdk1 ist die Interaktion mit Cyclin B beschrieben. So bildet der Cyclin B/Cdk1-Komplex die dritte Kontrollstation und spielt eine entscheidende Rolle in der G2/M-Phase. Auch Cyclin B reagierte mit einer Abnahme der Expression durch VPA.

Durchaus sind Veränderungen der Cyclin/Cdk-Komplexe in verschiedenen malignen Tumoren beobachtet worden (Malumbres M. et al. 2001, Sherr CJ. 1996). Tatsächlich führten die Expressionsalterationen der regulatorischen Zellzyklusproteine mit Abnahme an Cyclin A, Cyclin B, Cdk1, Cdk2 und Cdk4 durch den HDAC-Inhibitor VPA zu einer Reduktion der S-Phase zugunsten der G0/G1-Phase. Diese Modulation ging mit einer weiteren Inhibition des Wachstums einher. Apoptotische Ereignisse wurden nicht in Blasenkarzinomzellen durch VPA induziert. Das heißt, die unter VPA gemessene Reduktion der Zellzahl resultierte alleine aus der Hemmung der Proliferation.

### **5.2.2. Blockade von Cyclin A und Cdk2**

Die Ergebnisse der Blockadestudie, in der Cyclin A und Cdk2 mit spezifischer siRNA reduziert wurden, verdeutlichten die bedeutende Rolle dieser Zellzyklusproteine im Zellwachstum. Der Komplex aus Cyclin A und Cdk2 ist wesentlich an der Steuerung der S-Phase beteiligt (Merrick et al. 2008). In beiden Zelllinien, RT112 und UMUC3, stand ihre Inhibition im Einklang mit der mittels MTT gemessenen Abnahme der Proliferation. Auch die Reduktion der S-Phase korrelierte mit diesem Resultat.

Zusammenfassend wurde mit diesem Testverfahren die Relevanz der Zellzyklusproteine Cdk2 und Cyclin A im (Tumor-)Wachstum verdeutlicht und die Schlussfolgerung, dass VPA seine anti-tumorale Wirkung unter anderem durch die Alteration dieser beiden Akteure des Zellzyklus moduliert, bekräftigt (Li et al. 2017).

### 5.2.3. Unterschiede in der Modulation TEM-sensibler vs. TEM-resistenter Zellen

Im Vergleich zwischen der Expression von Zellzyklus-Regulatoren in TEM-sensiblen und TEM-resistenten Tumorzellen (beide Zelllinien) lässt sich ablesen, dass wesentliche Kontrollpunkte des Zellzyklusses durch eine Langzeitbehandlung mit TEM modifiziert werden. Betroffen waren insbesondere Cdk1, Cyclin A, Cyclin B und Cyclin D1. Diese Zellzyklusproteine waren bei den TEM-resistenten Zellen höher exprimiert als bei den TEM-sensiblen Zellen. Dagegen waren bei den TEM-sensiblen Zellen Cdk2, Cdk4, p 19 und p 27 stärker vertreten.

Da p 19 und p 27 wie oben erwähnt als Tumorsuppressoren eine bedeutende Funktion in der Zellzyklusregulation einnehmen, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass ihre verminderte Expression in den TEM-resistenten Zellen mit einer Tumorprogression und eventuell nachlassender Medikamentenwirkung in Beziehung steht. Im Einklang dazu wurde eine abnehmende p27-Expression mit einer zunehmenden Tumorgröße in Relation gesetzt (Migita et al. 2002). Ebenfalls konnte ein direkter Zusammenhang zwischen gastrointestinaler Tumorgröße und p27-Expression beobachtet werden (Draper et al. 2008).

Die Überexpression von Cdk1, Cyclin A, Cyclin B und Cyclin D1, verursacht durch die chronische Blockade des mTOR-Signalwegs mittels TEM könnte einen wichtigen Hinweis auf die molekularen Hintergründe für das erneute Wachstum der Tumorzellen geben und im engen Zusammenhang mit einer sich entwickelnden Medikamenten-Resistenz stehen. Eine Studie an Prostatakarzinomzellen belegte in der Tat den Zusammenhang zwischen der Überaktivität von Cdk1 und Cyclin B unter chronischer mTOR-Blockade und Resistenzinduktion (Wedel et al. 2011).

### 5.3. Modulation nach chronischer mTOR-Inhibition

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss einer chronischen Behandlung mit TEM auf die Expression der mTOR-Signalachse untersucht.

## Diskussion

In beiden Zelllinien, RT112 und UMUC3, war die Langzeitbehandlung mit TEM mit einer Überexpression von Schaltproteinen des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs verbunden. Insbesondere die Hauptakteure, die Kinasen pAkt und pmTOR, waren verstärkt in den Tem-resistenten Tumorzellen aufreguliert.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Publikationen, die auf die zentrale Rolle der mTOR-Kinase beim Blasenkarzinom hinweisen (Sun et al. 2011, Ching et al. 2011). Ihre erhöhte Expression wurde mit der Tumorprogression des Blasenkarzinoms in Verbindung gebracht (Sun et al. 2011). Ebenfalls ist im Vergleich zum Normalgewebe eine Akt-Überaktivität im Tumorgewebe nachgewiesen (Korkolopoulou et al. 2012, Zhou et al. 2012). Diese pathologischen Veränderungen können in einer unkontrollierten Proteintranslation resultieren und als Folge ein erneutes Wachstum trotz Therapie bewirken.

Es ist zu schlussfolgern, dass die unter TEM zunehmende Akt/mTOR-Expression und -Aktivität Anzeichen einer Resistenzentwicklung im Blasenkarzinom darstellen. Entsprechend sind innovative Lösungskonzepte zu erarbeiten, die derartigen unerwünschten kompensatorischen Rückkopplungsmechanismen entgegenwirken.

### 5.3.1. Expressionsmodulation von Zielproteinen relevanter Signalsysteme nach VPA Behandlung

Die Analyse der PI3K/Akt/mTOR-Signalachse mittels Western Blot belegte, dass VPA Veränderungen im Expressionsmuster wichtiger Schaltproteine induziert.

Durch die 3-tägige Applikation von VPA in RT112 wurde vor allem die Expression von pAkt inhibiert. In UMUC3 wurde zusätzlich eine deutliche Abnahme von pmTOR, pRictor, pRaptor und das mTOR/Akt- assoziierte Protein p70S6K beobachtet. Dabei ist der reduzierende Effekt von VPA besonders bei den Tem-resistenten Tumorzellen hervorzuheben.

Das phosphorylierte Akt, das regulierend auf zelluläre Prozesse wirkt, in dem es andere Substrate wie z.B. mTOR phosphoryliert ,gilt als potentieller

## Diskussion

Prognosefaktor. Es kann verschiedene steuernde Funktionen ausüben. Durch die Phosphorylierung von Faktoren der Apoptose z.B. der Bcl-Proteine kann es den programmierten Zelltod hemmen (Bleicken et al. 2013). Eine Phosphorylierung des TSC-Komplexes, welcher die Aktivierung von mTOR hindert, führt zu seiner Ausschaltung und damit zu einem Startschub der Proteintranslation (Gradi et al. 1998). Im Vergleich zum Normalgewebe ist eine vermehrte Expression der Akt-Kinase und ihre erhöhte Aktivität im Tumorgewebe nachgewiesen (Korkolopoulou et al. 2012, Zhou et al. 2012). Puzio-Kuter und Mitarbeiter verweisen bereits auf den Zusammenhang zwischen mTOR/Akt-Expression und Tumorprogression (Puzio-Kuter et al. 2009).

Ergebnisse aus einer früheren Studie belegten, dass eine verringerte Akt- Aktivität zu einer Immunerkennung durch T-Helferzellen führt (Noh et al. 2008). Eine erhöhte Expression der Proteinkinase Akt könnte somit an der Umgehung der Immunerkennung bzw. –reaktion im Sinn eines Immune-Escape-Mechanismus beteiligt sein. Spekulativ vermag VPA über eine Akt-Deaktivierung eine Immunreaktion gegenüber den Tumorzellen auszulösen. Als weiterer Mechanismus ist eine Suppression der Tumorzell-Proliferation in Betracht zu ziehen, die in der Tat negativ mit dem Akt-Expressionsspiegel (sowie Akt assoziierter Signalproteine) korreliert ist.

Neueste Untersuchungen belegen in diesem Sinne eine zentrale Rolle der mTOR-Kinase beim Blasenkarzinom (Sun et al. 2011, Ching et al. 2010). Diese Serin/Tyrosin-Kinase ist wesentlich in die Tumorgenese und –Progression eingebunden. mTOR reguliert das Zellwachstum, -überleben und -teilung (Raught et al. 2001). Eine erhöhte Expression wurde mit der Tumorprogression des Blasenkarzinoms über die Dysregulation der PI3K/Akt/mTOR Singnalachse in Verbindung gebracht (Sun et al. 2011). Im Zellkulturmodell lassen sich durch eine mTOR-Blockade Invasion und Wachstum von Blasenkarzinomzellen deutlich hemmen (Chiong et al. 2011, Fechner et al. 2011, Schedel et al. 2011).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen diese Beobachtungen. Die Abnahme des pmTOR-Gehalts durch VPA korrelierte mit der

## **Diskussion**

Wachstumshemmung, so dass ein enger funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Prozessen anzunehmen ist.

Da mTOR seine Wirkung über zwei verschiedene Komplexe, mTORC1 und mTORC2, entfaltet, war es notwendig die entsprechenden Kooperationsproteine pRaptor und pRictor zu untersuchen. Auch p70S6K war von Interesse, denn mTORC1 steigert über die Phosphorylierung dieses nachgeschalteten Proteins die Translation.

Die HDAC-Blockade mit VPA bewirkte auch bei diesen oben genannten Zielproteinen eine verringerte Expression bzw. Aktivität, zumindest in UMUC3-Zellen. Da dieser Effekt bei den TEM-resistenten Zellen sichtlich ausgeprägter ausfiel als bei den TEM-sensiblen Tumorzellen, liegt der Schluss nahe, dass VPA möglicherweise gezielt in die durch chronische TEM-Behandlung verursachten Resistenzmechanismen eingreift und so die Tumorprogression unterbindet oder zumindest verlangsamt.

### **5.4. HDAC-Inhibition und Phosphorylierung der Substrate**

Die HDAC-Aktivität wurde durch die 3-tägige Applikation mit VPA gehemmt, nachgewiesen über eine erhebliche Steigerung der Expression von acetyliertem Histon H3 und Histon H4.

Die Histone H3 und H4 sind wichtige Bestandteile von Nukleosomen und essentiell für die Ausspiralisierung des Chromatins. Ihre Modifikation hat relevanten Einfluss auf die DNA-Konformation und damit auf die Transkription. Ihre Acetylierung nimmt eine besondere Stellung in der Tumorgenese und Entstehung von Rezidiven ein (Mosashvili et. al. 2010, Lennartsson et. al. 2009, Popova et. al. 2009).

Eine Fehlregulation des HDAC-Systems, die zu einer vermehrten Deacetylierung führt, ist in vielen Tumoren festgestellt worden (Halkidou et. al. 2004). Eine gesteigerte Aktivität der HDAC-Enzyme geht mit einer vermehrten Deacetylierung

## Diskussion

einher. Folglich kommt es zu einer gesteigerten Affinität der deacetylierten Histone zur DNA. Die DNA wird von den basischen Histonden fester gebunden und damit werden vor allem Gene, die für die Bildung von Onkoproteinen verantwortlich sind sowie Gene, die die invasive Aktivität der Zellen steuern, vermehrt transkribiert. Hemmende Einflüsse auf das Zellwachstum wie z.B. der Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den Tumorsuppressorgenen hingegen werden unterdrückt. Die ursprünglich normale Körperzelle beginnt in unkontrollierbarem Maße zu wachsen und metastatische Eigenschaften zu entwickeln (Weichert et al. 2008).

Da eine Überexpression von Histondeacetylasen in Tumorzellen ihre Progression zu fördern scheint, kann VPA als HDAC-Inhibitor diesen Vorgang revertieren. Die Wirkung von VPA auf die Gentranskription über den hemmenden Einfluss VPA auf die HDACs und die damit verbundene Acetylierung der Histone H3 und H4 wurde sowohl in RT112 als auch in UMUC3 dargestellt.

Die Daten erlauben die Annahme, dass der tumorsuppressive Effekt der Histonacetylierung dem tumorfördernden Effekt durch Langzeitbehandlung mit TEM möglicherweise entgegenwirkt.

Allerdings sind in den Daten keine deutlichen Unterschiede zwischen TEM-resistenten und TEM-sensiblen Tumorzellen per se zu vermerken. In beiden Populationen waren die Histone gleichermaßen (schwach) detektierbar. Inwieweit HDAC in den Prozess der Resistenzinduktion eingebunden sind, kann daher nicht schlüssig beantwortet werden. Festgehalten werden kann jedoch, dass VPA gleichermaßen in sensitiven und resistenten Blasenkarzinom-Zellen zu einer erhöhten Expression der acetylierten Histone H3 und H4 beiträgt. Weiterführende Studien sollten hinterfragen, in welchem Zusammenhang das HDAC-System und die mTOR-Signalachse im Blasenkarzinom stehen. Bezüglich des Prostatakarzinoms konnte am in vitro Zellmodell tatsächlich eine Interaktion zwischen der mTOR-Signalachse und der Histonacetylierung nachgewiesen werden (Makarević et al. 2014).



## **Diskussion**

Unabhängig davon ist bekannt, dass HDAC-Inhibitoren außer den Histonen auch eine Hyperacetylierung weiterer Proteine wie z.B. den Tumorsuppressor p53 in Tumoren induzieren können (De la Cruz-Hernandez et al. 2007). Die verstärkte Expression des Regulatorproteins p19 durch VPA steht möglicherweise in engem Zusammenhang mit diesem Befund.

Insgesamt belegen die Resultate dieser Studie eine deutliche Beeinflussung des HDAC-Systems durch VPA und, damit einhergehend, Veränderung der malignen Eigenschaften der Blasenkarzinomzellen hin zu einem weniger aggressiven Verhalten.

## **5.5. Proliferationshemmung durch Kombinationstherapie TEM + VPA**

Die Akteure mTOR und Akt werden im Blasenkarzinom fehlerhaft reguliert (Sun et al. 2011, Ching et al. 2011). Konsequenterweise stellt mTOR einen potenten Angriffspunkt der zielgerichteten Tumorthherapie dar. Gleichzeitig muss anhand der hier ermittelten Daten auf die nachlassende Medikamentenwirkung des mTOR-Inhibitors TEM hingewiesen werden. Offensichtlich sind kompensatorische Mechanismen für den beobachteten Anstieg von mTOR und Akt und damit für die Entstehung einer Resistenz verbunden mit einer Tumorprogression verantwortlich.

Ein ähnliches Phänomen wurde auch unter Monotherapie mit VPA beobachtet. In Zellen des humanen Neuroblastoms kam es nach der alleinigen VPA Behandlung zu einer tumorfördernden Erhöhung von Akt (De Sarno et al. 2002). Auch bei Cervixkarzinomzellen ist ein diesbezügliches Verhalten beschrieben (Feng et al. 2012). In einer kürzlich publizierten Studie wurde nachgewiesen, dass VPA nicht nur die Expression der Histone H3 und H4 erhöht, sondern auch, als negativer Nebeneffekt, Akt und Akt relevante Signalproteine. Zu Recht wurde daher eine Kombination aus mTOR- und HDAC-Inhibitor eingefordert (Makarević et al. 2014).

## Diskussion

Die mehrfache Blockade verschiedener Signalwege könnte möglicherweise die Entstehung von unerwünschten Rückkopplungsschleifen verhindern oder zumindest hinauszögern (Juengel et al. 2012, Longo et al. 2007).

Die Behandlung mit 1 mM VPA sollte TEM-resistente Blasenkarzinomzellen re-sensibilisieren und den Tumor im weiteren Wachstum und Ausbreitung abstoppen.

In der Tat lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die HDAC-Inhibition mit VPA einer durch TEM induzierten Resistenz entgegen wirkt. Interessant ist der Befund, dass zumindest bei UMUC3-Zellen VPA besonders ausgeprägte Eigenschaften gegenüber den resistenten Tumorzellen entwickelte. Sie reagierten mit einer deutlicheren Abnahme der Proliferation. Klinisch bedeutsam ist zugleich der am in vitro Prostata-Modell erbrachte Nachweis, dass VPA seinerseits keine (rasche) Resistenz induziert (Juengel et al. 2012).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: In den Untersuchungen ist nicht nur die tumorsuppressive Bedeutung von VPA durch die Histonacetylierung gezeigt, sondern auch sein Einfluss auf die mTOR-Signalachse. Die HDAC-Inhibition bewirkte eine Senkung vor allem der Zielproteine pmTOR und pAKT. Diese Proteinkinasen waren aufgrund von Feedbackmechanismen durch Langzeitbehandlung mit TEM in den resistenten Zellen stärker exprimiert.

Mechanistisch wirkte VPA durch eine Alteration des Zellzyklusses in Richtung S-Phase sowie einer Zunahme der Tumorsuppressoren p19 und p27 den Resistenzprozessen entgegen. Die Histonacetylierung wirkte zusätzlich tumorsuppressiv.

### 6. Zusammenfassung

Patienten mit fortgeschrittenem Blasenkarzinom haben eine sehr schlechte Prognose. Neue Behandlungsansätze, die ihnen eine realistische Heilungschance bieten, sind dringend notwendig. Der Einsatz des mTOR-Inhibitors TEM könnte ein innovatives Lösungskonzept darstellen. Zu berücksichtigen ist jedoch die Gefahr einer Resistenzinduktion unter Langzeitbehandlung. Basierend auf vorausgegangenen Studien wurde im Rahmen der Promotionsarbeit postuliert, dass die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor VPA eine Therapiestrategie darzustellen vermag, mit der durch Tem-bedingte Resistenzen umgegangen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das biologische Verhalten verschiedener Blasenkarzinomzellen unter chronischer Tem-Therapie studiert und anschließend der Einfluss von VPA auf Wachstum und Proliferation der Zellen (TEM-resistent versus TEM-sensibel) untersucht.

Verwendet wurden die Zelllinien RTT112 und UMUC3. Die Resistenz wurde durch TEM induziert. Das Zellwachstum wurde mit MTT und die Proliferation mittels BrdU-Einbau evaluiert. Mittels Flow-Zytometrie erfolgte die Analyse der Zellzyklusprogression. Relevante Zellzyklusproteine und intrazelluläre Zielproteine wurden mittels Western Blot Verfahren analysiert. siRNA Knock-Down-Studien dienen zur Beurteilung der biologischen Relevanz der Proteine.

Die chronische mTOR-Blockade mit TEM über mehrere Monate hinweg ging mit einer Resistenzinduktion einher, nachgewiesen über eine Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes. VPA bewirkte nicht nur bei den TEM-sensiblen, sondern auch den TEM-resistenten Zellen eine signifikante Wachstums- und Proliferationshemmung. Der Effekt korrelierte mit einer Zunahme von Tumorzellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklusses und Abnahme von S-Phase-Zellen. Die G2/M-Phase reduzierte sich in RT112-Kulturen und bei TEM-sensitiven UMUC3-Zellen. Hingegen erhöhte sich der Anteil von TEM-resistenten UMUC3-Kulturen in G2/M. VPA bewirkte bei allen Zellpopulationen Veränderungen an der Cyclin-Cdk-Achse. Insbesondere bei

## Zusammenfassung

UMUC3-Zellen kam es unter VPA zur Suppression in der Aktivität mTOR-relevanter Signalmoleküle (Rictor, Raptor, Akt, p70S6). In beiden Zelllinien, RT112 und UMUC3, erhöhte sich der Expressionsspiegel der acetylierten Histone H3 und H4. Mittels siRNA wurde belegt, dass die Blockade von Cyclin A und Cdk2 mit einem verminderten Tumorwachstum assoziiert ist.

Aufgrund der vorgestellten Daten lässt sich postulieren, dass die Anwendung von VPA die Gefahr einer durch TEM induzierten Resistenz abzuwenden vermag. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit präsentieren vielversprechende anti-tumorale Effekte VPAs und stellen möglicherweise eine innovative und effiziente Strategie zur Behandlung des fortgeschrittenen Blasenkarzinoms dar. Da Tem und VPA in der Klinik bereits etabliert sind, wäre eine Umsetzung rasch möglich.

Zur Verifizierung der am in vitro Modell erhobenen Daten sind weitere, vertiefende Untersuchungen am lebenden Organismus essentiell, um die Resistenzphänomene zu belegen.

## Zusammenfassung

### Summary

Survival rates of advanced bladder cancer are often unpromising. Novel therapeutic approaches offering realistic chances for cure are necessary. The application of TEM might provide an innovative solution. Nevertheless, the risk of resistance development under chronic treatment with TEM should be considered. In the context of the thesis and based on previous surveys, it is postulated that a simultaneous treatment with VPA might display a strategy to avoid undesirable tickler circuits caused by TEM.

In this matter, the biological characteristics of different bladder cancer cell lines under chronic therapy with TEM have been studied. Further investigation analyzed the effects of VPA on cell growth and proliferation (TEM-resistant vs. TEM-sensitive cells).

The cell lines used were RT112 and UMUC3. The resistance was induced by chronic treatment with TEM over several months. Cell growth was evaluated using MTT and proliferation by the BrdU incorporation assay. By means of flow cytometry cell cycle proteins were analyzed. Relevant cell cycle proteins and intracellular target proteins were examined via Western Blot. siRNA knock-down-studies were carried out to demonstrate the significance of the proteins.

The chronic mTOR-inhibition due to TEM induced a resistance shown by a shift of the  $IC_{50}$ -value. VPA evoked a significant inhibition of growth and proliferation, not only in TEM-sensitive but also in TEM-resistant cells. This effect correlated with an increase of tumor cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase and a decrease in the S-phase of the cell cycle. The G<sub>2</sub>/M-phase was reduced in RT112 and in TEM-sensitive UMUC3. In contrast, cells in the G<sub>2</sub>/M-phase were augmented in TEM-resistant UMUC3. VPA caused an alteration of the cyclin-cdk- axis in all cell populations. Particularly in UMUC3, VPA provoked a suppression of mTOR-relevant signal molecules such as rictor, raptor, Akt and p70S6. The expression of acetylated histone H3 and H4 was increased in both cell lines, RT112 and UMUC3. Based on siRNA knock down, inhibition of cyclin A and cdk 2 was shown to be associated with a reduced tumor growth.

## **Zusammenfassung**

Due to presented data, it is postulated that the application of VPA might overcome resistance development caused by TEM. The results point to a promising anti-tumoral effect of VPA and might display an innovative and efficient strategy for the therapy of advanced bladder cancer. A quick implementation should be possible, since VPA has already been established in the clinic. To prove the efficacy, further investigation in vivo are essential.

## 7. Literaturverzeichnis

- Blaheta RA, Cinatl J Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev.* 2002; 22: 492-511.
- Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev.* 2005; 25: 383-97.
- Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, Weich E, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *Br J Cancer.* 2007; 96: 1699-706.
- Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, Weich E, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin- resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *Br J Canc.* 2007; 96: 1699- 706.
- Blaheta RA, Nau H, Michaelis M, Cinatl J Jr. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem.* 2002; 9: 1417-33.
- Bleicken S1, Landeta O, Landajuela A, Basañez G, García-Sáez AJ. Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J Biol Chem.* 2013; 288(46):33241-52.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 769-84.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Canc Lett.* 2008; 269(1): 7-17.
- Chakravarthy S, Park YJ, Chodaparambil J, Edayathumangalam RS, Luger K. Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett.* 2005; 579(4): 895-8.

## Literaturverzeichnis

- Chelluri R, Caza T, Woodford MR, Reeder JE, Bratslavsky G, Byler T. Valproic Acid Alters Angiogenic and Trophic Gene Expression in Human Prostate Cancer Models. *Anticancer Res.* 2016; 36(10): 5079-5086.
- Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Lab Invest.* 2010; 90: 1406-14
- Chiong E, Lee IL, Dadbin A, Sabichi AL, Harris L, Urbauer D, McConkey DJ, Dickstein RJ, Cheng T, Grossman HB. Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells. *Cancer Res.* 2011; 17: 2863-73.
- Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, Tun HW, Colon-Otero G, Perez EA, Copland JA. Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11: 2105-15.
- Costa C, Pereira S, Lima L, Peixoto A, Fernandes E, Neves D, Neves M, Gaiteiro C, Tavares A, Gil da Costa RM, Cruz R, Amaro T, Oliveira PA, Ferreira JA, Santos LL. Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0141253
- Damaskos C, Valsami S, Spartalis E, Antoniou EA, Tomos P, Karamaroudis S, Zoumpou T, Pergialiotis V, Stergios K, Michaelides C, Kontzoglou K, Perrea D, Nikiteas N, Dimitroulis D. Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Therapeutic Weapon Against Medullary Thyroid Cancer? *Anticancer Res.* 2016; 36(10): 5019-5024.
- De la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Contreras-Paredes D, Cantu D, Mohar A, Lizano M, Duenas-Gonzalez A. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virology.* 2007; 4: 18.
- De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology.* 2002; 43(7):1158-64.



## Literaturverzeichnis

- De-Lin Wang et al. Integrin-linked Kinase Functions as a Tumour Promoter in Bladder Transitional Cell Carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2012; 2799-2806.
- Draper N, Bui M, Bouware DC, Lloyd M, Chiappori AA, Pledger WJ, Coppola D. Increased cyclin D3 expression significantly correlates with p27 nuclear positivity in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol*. 2008; 39(12): 1784-91.
- Eberharter A, Ferreira R, Becker P. Dynamic chromatin: concerted nucleosomeremodelling and acetylation. *Biol Chem*. 2005; 386(8): 745-51.
- Fechner G, Classen K, Schmidt D, Hauser S, Müller SC. Rapamycin inhibits in vitro growth and release of angiogenetic factors in human bladder cancer. *Urology*. 2009; 73: 665-8.
- Fedier A, Dedes KJ, Imesch P, Von Bueren AO, Fink D. The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2007; 31: 633-41.
- Feng D, Cao Z, Li C, Zhang L, Zhou Y, Ma J, Liu R, Zhou H, Zhao W, Wei H, Ling B. Combination of valproic acid and ATRA restores RAR $\beta$ 2 expression and induces differentiation in cervical cancer through the PI3K/Akt pathway. *Curr Mol Med*. 2012; 12(3): 342-54.
- Goebell PJ. et al. Noninvasive and invasive bladder cancer: diagnostics and treatment. *Urologe A*. 2006; 45:873-84.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001; 20: 6969-78.
- Gradi A1, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(1): 334- 42.

## Literaturverzeichnis

- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*.2004; 59(2): 177-89.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmark of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Hedberg Y, Davoodi E, Ljungberg B, Roos G, Landberg G. Cyclin E and p27 protein content in human renal cell carcinoma: clinical outcome and associations with cyclin D. *Int J Canc*. 2002; 102: 601-7.
- Hornig E, Heppt MV, Graf SA, Ruzicka T, Berking C. Inhibition of histone deacetylases in melanoma-a perspective from bench to bedside..*Exp Dermatol*. 2016; 25(11): 831-838.
- Hudak L, Tezeeh P, Wedel S, Makarević J, Juengel E, Tsaur I, Bartsch G, Wiesner C, Haferkamp A, Blaheta RA. Low dosed interferon alpha augments the anti-tumor potential of histone deacetylase inhibition on prostate cancer cell growth and invasion. *Prostate*. 2012; 72: 1719-35.
- Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61, 69-90.
- Jonathan H. Schatz. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Curr Oncol Rep*. 2011; 13: 398.
- Jones J, Juengel E, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Blaheta RA. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 2376-85.
- Jones J, Juengel E, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Hintereder G, Blaheta RA. Valproic acid blocks adhesion of renal cell carcinoma cells to endothelium and extracellular matrix. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 2342-52.
- Juengel E, Dauselt A, Makarević J, Wiesner C, Tsaur I, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA. Acetylation of histone H3 prevents resistance development caused by chronic mTOR inhibition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2012; 324: 83-90.
- Juengel E, Makarević J, Tsaur I, Bartsch G, Nelson K, Haferkamp A, Blaheta RA. Resistance after Chronic Application of the HDAC-Inhibitor

## Literaturverzeichnis

- Valproic Acid Is Associated with Elevated Akt Activation in Renal Cell Carcinoma In Vivo. PLoS One. 2013; 8: e53100.
- Juengel E1, Makarević J1, Reiter M1, Mani J1, Tsaor I1, Bartsch G1, Haferkamp A1, Blaheta RA2. Resistance to the mTOR inhibitor temsirolimus alters adhesion and migration behavior of renal cell carcinoma cells through an integrin  $\alpha$ 5- and integrin  $\beta$ 3- dependent mechanism. Neoplasia. 2014; 16(4): 291-300.
  - Kanamoto A, Ninomiya I, Harada S, Tsukada T, Okamoto K, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T. Valproic acid inhibits irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like characteristics in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2016; 49(5): 1859-1869.
  - Kelly KR, Nawrocki ST., Carew JS. Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy. Target Oncol. 2011; 6(1): 17-27.
  - Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Canc. 2002; 2: 727-39
  - Korkolopoulou P, Levidou G, Trigka EA, Prekete N, Karlou M, Thymara I, Sakellariou S, Fragkou P, Isaiadis D, Pavlopoulos P, Patsouris E, Saetta AA. A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. BJU Int. 2012; 110: E1237-48.
  - Kotchetkov R, Cinatl J, Blaheta R, Vogel JU, Karaskova J, Squire J, Hernaiz Driever P, Klingebiel T, Cinatl J Jr. Development of resistance to vincristine and doxorubicin in neuroblastoma alters malignant properties and induces additional karyotype changes: a preclinical model. Int J Cancer. 2003; 104: 36-43.
  - Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in generegulation. Bioessays. 1998 Aug; 20(8):615-26.
  - Kwecińska P, Taubøll E, Grzyb E, Fiedor E, Ptak A, Gregoraszczyk EL. Int J Valproic Acid as a Promising Co-Treatment With Paclitaxel and Doxorubicin

## Literaturverzeichnis

- in Different Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecol Cancer*. 2016 (9): 1546-1556.
- Langner C1, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Biological significance of p27 and Skp2 expression in renal cell carcinoma. A systematic analysis of primary and metastatic tumour tissues using a tissue microarray technique. *Virchows Arch*. 2004; 445(6): 631-6.
  - Lee YJ, Won AJ, Lee J, Jung JH, Yoon S, Lee BM, Kim HS. Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Int J Med Sci*. 2012; 9: 881-93.
  - Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(9): 863-8.
  - Li J, Vervoorts J, Carloni P, Rossetti G, Lüscher B. Structural prediction of the interaction of the tumor suppressor p27KIP1 with cyclin A/CDK2 identifies a novel catalytically relevant determinant. *BMC Bioinformatics*. 2017; 18(1):15
  - Lin CT, Lai HC, Lee HY, Lin WH, Chang CC, Chu TY, Lin YW, Lee KD, Yu MH. Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci*. 2008; 99(6):1218-26.
  - Loewith R1, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 2002 10(3):457-68
  - Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G. Integrated therapy of kidney cancer. *Ann Oncol*. 2007; 18(6): 141-8.
  - Lui T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev*. 2006; 32: 157-65.
  - Madka V, Mohammed A, Li Q, Zhang Y, Biddick L, Patlolla JM, Lightfoot S, Towner RA, Wu XR, Steele VE, Kopelovich L, Rao CV. Targeting mTOR and p53 Signaling Inhibits Muscle Invasive Bladder Cancer In Vivo. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016; 9(1): 53-62.

## Literaturverzeichnis

- Makarević J, Tawanaie N, Juengel E, Reiter M, Mani J, Tsaor I, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA. Cross-communication between histone H3 and H4 acetylation and Akt-mTOR signalling in prostate cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2014;18(7):1460-6.)
- Malumbres M1, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1(3): 222-31.
- Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Rocha J, Scarlata E, Kassouf W. Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 2339-47.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Canc.* 2001; 1: 194-202.
- Merrick KA, Larochelle S, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Fisher RP. Distinct Activation Pathways Confer Cyclin-Binding Specificity on Cdk1 and Cdk2 in Human Cells. *Mol Cell.* 2008; 32: 662-72.
- Migita T1, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M. Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer.* 2002; 94(4): 973-9.
- Morgan TM1, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009; 9 (2): 237-49.
- Mosashvilli D, Kahl P, Mertens C, Holzapfel S, Rogenhofer S, Hauser S, BüttnerR, Von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2010; 101(12): 2664-9.
- Mostofi FK, Sobin MH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. *International histological classification of tumours.* 1973; No 10, WHO, Geneva
- Musacchio A, Siuzdak G, Kriwacki RW.Y, Post J, Nourse A, Webb W, Mapelli M, Molecular basis for the specificity of p27 toward cyclin-

## Literaturverzeichnis

- dependent kinases that regulate cell division. *J Mol. Biol.* 2005 Jun 17; 349(4): 764-73.
- Noh KH, Kang TH, Kim JH, Pai SI, Lin KY, Hung CF, Wu TC, Kim TW. Activation of Akt as a Mechanism for Tumor Immune Evasion. *Mol Ther.* 2008; 17(3): 439- 47.
  - O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006; 66: 1500-8.
  - O'Rourke CJ, Knabben V, Bolton E, Moran D, Lynch T, Hollywood D, Perry AS. Manipulating the epigenome for the treatment of urological malignancies. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(2): 185-96
  - Ozaki K, Kishikawa F, Tanaka M, Sakamoto T, Tanimura S, Kohno M. Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs. *Cancer Sci.* 2008; 99: 376-84.
  - Pertia A1, Nikoleishvili D, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A. Immunoreactivity of p27(Kip1), cyclin D3, and Ki67 in conventional renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.* 2009; 41(2): 243-9.
  - Popova EY, Krauss SW, Short SA, Lee G, Villalobos J, Etzell J, Koury MJ, Ney PA, Chasis JA, Grigoryev SA. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res.* 2009; 17(1): 47-64.
  - Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.* 2009; 23: 675-80.
  - Qian C, Lai CJ, Bao R, Wang DG, Wang J, Xu GX, Atoyan R, Qu H, Yin L, Samson M, Zifcak B, Ma AW, Dellarocca S, Borek M, Zhai HX, Cai X, Voi M. Cancer Network Disruption by a Single Molecule Inhibitor Targeting Both

## Literaturverzeichnis

- Histone Deacetylase Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. Clin Cancer Res. 2012; 18: 4104-13.
- Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science. 2002; 298: 597-600.
  - Rameh LE1, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J Biol Chem. 1999; 274(13): 8347-50.
  - Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(13): 7037-44.
  - Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. Lancet Oncol. 2009; 10(10):992-1000.
  - Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005; 307(5712): 1098-101.
  - Schedel F, Pries R, Thode B, Wollmann B, Wulff S, Jochem D, Wollenberg B, Kausch I. mTOR inhibitors show promising in vitro activity in bladder cancer and head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2011; 25: 763-8.
  - Schulman, C., Rozenzweig, M., Staquet, M., Kenis, Y. and Sylvester, R. EORTC randomized for trial for the adjuvant therapy of T1 bladder carcinoma. Eur. Urol. 1976, 2, 271.
  - Sherr CJ. Cancer cell cycles, Science. 1996; 274(5293): 1672-7.
  - Skinner DG et al. Current state of classification and staging of bladder cancer. Cancer Res. 1997; 37 (8 Pt 2): 2838-42.
  - Sun CH, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. Histopathology. 2011; 58: 1054-63.
  - Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated

## Literaturverzeichnis

- mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 2005; 65: 7052-8.
- Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, Marie JP. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia.* 2004; 18: 1246-51.
  - Tolley, D.A. et al. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J. Urol.* 1996, 155, 1233–1238.
  - Tsaur I, Makarević J, Hudak L, Juengel E, Kurosch M, Wiesner C, Bartsch G, Harder S, Haferkamp A, Blaheta RA. The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line. *Cancer Lett.* 2011; 313: 84-90.
  - Tsaur,1 J Makarević,1 E Juengel,1 M Gasser,2 A-M Waaga-Gasser,2 M Kurosch,1 M Reiter,1 S Wedel,1 G Bartsch,1 A Haferkamp,1 C Wiesner,1,3 and R A Blaheta1, Resistance to the mTOR-inhibitor RAD001 elevates integrin  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 1-triggered motility, migration and invasion of prostate cancer cells, *Br J Cancer.* 2012; 107(5): 847–855.
  - Weber JD1, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP. P53-independent functions of the p19 (ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* 2000; 14(18): 2358-65.
  - Wedel S, Hudak L, Seibel JM, Juengel E, Tsaur I, Wiesner C, Haferkamp A, Blaheta RA. Inhibitory effects of the HDAC inhibitor valproic acid on prostate cancer growth are enhanced by simultaneous application of the mTOR inhibitor RAD001. *Life Sci.* 2011; 88: 418-24.
  - Wedel S, Hudak L, Seibel JM, Makarević J, Juengel E, Tsaur I, Wiesner C, Haferkamp A, Blaheta RA. Impact of combined HDAC and mTOR inhibition on adhesion, migration and invasion of prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2011; 28: 479-91.



## Literaturverzeichnis

- Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer*. 2008; 98(3):604-10.
- Whitehead B, Wu L, Hvam ML, Aslan H, Dong M, Dyrskjøt, Ostenfeld MS, Moghimi SM, Howard KA. Tumour exosomes display differential mechanical and complement activation properties dependent on malignant state: implications in endothelial leakiness. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4:29685.
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*. 2006; 281: 13548-58.
- Wilson TG, Pritchett TR, Lieskovsky G et al. Primary adenocarcinoma of bladder. *Urology* 38. 1991; (3): 223-6.
- Xia Zhang, Dage Liu, Yushi Hayashida, Homare Okazoe, Takeshi Hashimoto, Nobufumi Ueda, Mikio Sugimoto and Yoshiyuki Kakehi. G Protein-Coupled Receptor 87 (GPR87) Promotes Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(10): 24319–24331.
- Yuge K, Kikuchi E, Hagiwara M, Yasumizu Y, Tanaka N, Kosaka T, Miyajima A, Oya M. Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14(9): 2112-20.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Canc Res*. 2005; 94: 11-16.

## Literaturverzeichnis

- Zhou H, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Huang WC, Mohammadi M, Mohr I, Tang MS, Huang C, Wu XR. Urothelial tumor initiation requires deregulation of multiple signaling pathways: implications in target-based therapies. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 770-80.
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Canc Cell*. 2004; 5: 455-63.

## Bücher:

- W. Müller-Esterl, *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 2., Aufl. 2011 Springer Spektrum (Verlag), 978-3-8274-2003-9 (ISBN)
- Die blauen Ratgeber; *Blasenkrebs Deutsche Krebs Hilfe*, Stand 3/2011 ISSN 0946-4816; Art-Nr. 018 0031
- Urinary bladder. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Ed. New York. NY: Springer. 2010; pp 497-505
- Huland H, Friedrich MG: *Harnblasenkarzinom*. In: „Urologie“, Hautmann R, Huland H (Hrsg.) Springer-Verlag. Heidelberg 2006, 3. Auflage, 202-212

## Links:

- [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/kid\\_2015\\_c00\\_97\\_krebs\\_gesamt.pdf;jsessionid=56521CB04965F57ED274A53EBA4F88B6.2\\_cid372?\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c00_97_krebs_gesamt.pdf;jsessionid=56521CB04965F57ED274A53EBA4F88B6.2_cid372?_blob=publicationFile)
- <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php#inhalt5>
- <http://www.urologielehrbuch.de/harnblase.html>
- [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html)
- **Abbildung1:** Strukturformel von Valproat:  
[https://books.google.de/books?id=0BsjBAAQBAJ&pg=PA1373&lpg=PA1373&dq=strukturformel+valproat&source=bl&ots=HYH841vO0Q&sig=XH8VEksiaZsefKPgB7YDXM-Sz0&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjAhPTp87\\_QAhXrKsAKHcp1DqUQ6AEIPjAG#v=onepage&q=strukturformel%20valproat&f=false](https://books.google.de/books?id=0BsjBAAQBAJ&pg=PA1373&lpg=PA1373&dq=strukturformel+valproat&source=bl&ots=HYH841vO0Q&sig=XH8VEksiaZsefKPgB7YDXM-Sz0&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjAhPTp87_QAhXrKsAKHcp1DqUQ6AEIPjAG#v=onepage&q=strukturformel%20valproat&f=false)

## Erklärung

### Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Etablierung innovativer Strategien zur Resistenzumgehung bei der Therapie des Urothelkarzinoms

in der Klinik der Urologie und Kinderurologie, J. W. Goethe Universität, unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Blaheta mit Unterstützung PD Dr. Jüngel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Frankfurt am Main, den 23.02.17

(Unterschrift)  
R.Najafi