

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Onkologisches Zentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

## **Effektivität und Wirkweise der marinen Substanz Frondoside A in humanen Urothelkarzinomzelllinien**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ramin Madanchi  
aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.02.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Gunhild von Amsberg**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. med. Christian Meyer**

# Inhalt

Publikation .....	5
1. Einleitung .....	15
2. Risikofaktoren .....	16
3. Therapie .....	17
3.1 Platinbasierte Chemotherapie .....	17
3.1.1 Platinungeeignete Patienten .....	18
3.2 Immuntherapie als Erstlinien Therapie .....	19
3.3 Immuntherapie als Zweitlinien Therapie.....	20
3.3.1 Ausblick - Immuntherapie als Kombinationspartner.....	22
3.4 Zweitlinien Therapie .....	22
4. Frondoside A .....	24
5. Das p53-Gen.....	25
6. Autophagie und Chemotherapieresistenz.....	26
7. Fragestellung .....	27
8. Material und Methoden .....	28
8.1 Substanzen.....	28
8.2 Urothelkarzinomzelllinien .....	28
8.3 Zellkultur .....	29
8.4 Trypanblau-basierte Bestimmung der Toxizität.....	29
8.5 Bestimmung der Wirkung zwischen Zytostatika .....	30
8.6 Annexin-V-FITC/Prompidiumiodid-Doppelfärbung zum Nachweis von apoptotischen Zellen .....	30
8.7 Western-Blot.....	31
8.8 „Silencing“ des p53-Proteins durch siRNA-Transfektion .....	32
9. Ergebnisse .....	34

9.1 Bestimmungen der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC <sub>50</sub> ) .....	34
9.2 Synergistische Effekte der Zytostatika .....	35
9.3 FrA induzierte Apoptose in RT-112 Urothelkarzinomzellen .....	35
9.3.1 Caspase-induzierte Apoptose .....	36
9.3.2 Caspase unabhängige Apoptose .....	37
9.4 Silencing des p53-Gen durch siRNA .....	39
9.5 Autophagie in Urothelkarzinomzellen .....	41
9.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) in der RT1 12 Zelllinie .....	44
10. Diskussion .....	46
11. Schlussfolgerung.....	49
Zusammenfassung .....	50
Summary .....	51
Abbildungsverzeichnis .....	52
Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen .....	53
Weitere Vorveröffentlichungen aus der Laborzeit der Dissertation .....	53
Erklärung des Eigenanteils .....	54
Literaturverzeichnis .....	56
Danksagung.....	63
Eidesstattliche Versicherung .....	64
Anhang.....	66

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells

Sergey A. Dyshlovoy<sup>1,2,3\*\*†</sup>, Ramin Madanchi<sup>1†</sup>, Jessica Hauschild<sup>1</sup>, Katharina Otte<sup>1</sup>, Winfried H. Alsdorf<sup>1</sup>, Udo Schumacher<sup>4</sup>, Vladimir I. Kalinin<sup>2</sup>, Alexandra S. Silchenko<sup>2</sup>, Sergey A. Avilov<sup>1,2,3</sup>, Friedemann Honecker<sup>1,5</sup>, Valentin A. Stonik<sup>2</sup>, Carsten Bokemeyer<sup>1</sup> and Gunhild von Amsberg<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Advanced urothelial carcinomas represent a considerable clinical challenge as they are difficult to treat. Platinum-based combination regimens obtain response rates ranging from 40 to 70% in first-line therapy of advanced urothelial carcinoma. In the majority of cases, however, the duration of these responses is limited, and when progression occurs, the outcome is generally poor. Therefore, novel therapeutic strategies are urgently needed. The purpose of the current research is to investigate the anticancer effects and the mode of action of the marine triterpene glycoside frondoside A in p53-wild type and p53-deficient human urothelial carcinoma cells.

**Methods:** Activity of frondoside A was examined in the human urothelial carcinoma cell lines RT112, RT4, HT-1197, TCC-SUP, T-24, and 486p. Effects of frondoside A on cell viability, either alone or in combination with standard cytotoxic agents were investigated, and synergistic effects were analyzed. Pro-apoptotic activity was assessed by Western blotting and FACS, alone and in combination with a caspases-inhibitor. The impact of functional p53 was investigated by siRNA gene silencing and the p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$ . Effects on autophagy were studied using LC3B-I/II and SQSTM1/p62 as markers. The unpaired Student's *t*-test was used for comparison of the data sets.

**Results:** Frondoside A shows high cytotoxicity in urothelial carcinoma cells with  $IC_{50}$ s ranging from 0.55 to 2.33  $\mu$ M while higher concentrations of cisplatin are required for comparable effects ( $IC_{50} = 2.03 \sim 5.88 \mu$ M). Induction of apoptosis by frondoside A was associated with the regulation of several pro-apoptotic factors, like caspase-3, -8, and -9, PARP, Bax, p21, DNA fragmentation, and externalization of phosphatidylserine. Remarkably, inhibition of p53 by gene silencing or pifithrin- $\alpha$  pretreatment, as well as caspase inhibition, did not suppress apoptotic activity of frondoside A, while cisplatin activity, in contrast, was significantly decreased. Frondoside A inhibited pro-survival autophagy, a known mechanism of drug resistance in urothelial carcinoma and showed synergistic activity with cisplatin and gemcitabine.

(Continued on next page)

\* Correspondence: dyshlovoy@gmail.com

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, Hamburg 20246, Germany

<sup>2</sup>Laboratory of Marine Natural Products Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, Prospekt 100-let Vladivostoku 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

**Conclusions:** A unique combination of properties makes marine compound frondoside A a promising candidate for the treatment of human urothelial carcinomas.

**Keywords:** Frondoside A, p53, Apoptosis, Autophagy, Urothelial carcinoma, Marine natural compounds

## Background

Advanced urothelial carcinomas (UCs) represent a considerable clinical challenge as they are difficult to treat. Platinum-based combination regimens obtain response rates ranging from 40 to 70% in first-line therapy of advanced urothelial carcinoma (UC). In the majority of cases, however, the duration of these responses is limited, and when progression occurs, the outcome is generally poor [1]. So far, the results of single agents or combinations administered in the salvage setting have been rather disappointing [2]. In Europe, vinflunine is the only approved second-line therapy to date, and until recently, no treatment regimen was officially recommended in the USA for salvage therapy [3]. However, on May 18th 2016, the PD-L1 inhibitor atezolizumab was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with locally advanced or metastatic UC who experienced disease progression during or following platinum-containing chemotherapy. In fact, atezolizumab achieved objective response rates of 26% (95% CI 18–36) in the IC2/3 group, 18% (13–24) in the IC1/2/3 group, and 15% (11–19) in all treated patients of a phase II clinical trial (IMvigor210) with some long-term responses lasting for more than 12 months [4, 5]. Nevertheless, patients, especially without PD-L1 expression, may not significantly benefit from this immune check-point inhibition, emphasizing an unmet need for novel therapeutic strategies [4].

p53 deficiency has been detected in more than 60% of UC [6], and has been associated with aggressive biology [7, 8]. In addition, it has been speculated that it could serve as a prognostic marker for the response of UC to systemic treatment [7, 8]. Furthermore, p53 deficiency or inactivation is a known mechanism of drug resistance in human malignancies [9].

Another factor playing a role in chemotherapy resistance is autophagy [10, 11]. Macroautophagy (referred as autophagy) is a basic cellular catabolic process which leads to selective or non-selective degradation of proteins and organelles by the lysosome system [12]. It includes the formation of double-membrane vesicles called autophagosomes, which fuse with lysosomes, resulting in the degradation and recycling of sequestered contents [12]. Most of anticancer drug treatment-induced autophagy was identified to have pro-survival properties and therefore, this process is believed to be one of the key mechanisms of drug resistance [10, 11]. Autophagy

allows cancer cells to use their entire resources to survive diverse apoptosis inducing signals, including chemotherapy-induced apoptosis [11]. Recently, autophagy has been reported to be an important drug resistance and pro-survival mechanism in UC [10, 13]. Therefore, pharmacological inhibitors of autophagy may prevent development of resistance and enhance cytotoxic activity of known anticancer drugs [10, 11].

Frondoside A (FrA) is a natural bioactive compound, initially isolated from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* [14]. Recent studies revealed promising anticancer activity of FrA in vitro and in vivo, which is exerted through its pro-apoptotic, antimetastatic, and immunostimulatory activity (for review see [15, 16]). Remarkably, we were able to demonstrate that FrA inhibits pro-survival autophagy in prostate cancer cell lines resistant to standard therapies and induces apoptosis [17]. However, to date, no data are available on the activity of FrA in human UC.

In this study we examined the effect of the triterpene glycoside FrA in human UC cells bearing either wild-type or mutant p53. We explored the relevance of p53 for the anti-cancer effect of the marine natural compound, as well as the effect of FrA on autophagy in UC cells.

## Methods

### Reagents and antibodies

The marine triterpene glycoside frondoside A (FrA) was isolated from the sea cucumber *Cucumaria okhotensis* as previously described [18]. The purity of the individual compound was verified by HPLC, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. Other reagents and antibodies are listed in Additional file 1.

### Cell lines and culture conditions

The human urothelial cancer cell lines RT4 (p53 wild type), HT-1197 (p53 wild type), TCC-SUP (mutant p53), T-24 (mutant p53), were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) [19]. RT112 (p53 wild type) cell line was purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) [19]. 486p cell line (unknown p53 mutational status) was previously generated and characterized by Elliott et al. from grade IV TCC of the bladder metastatic to a supraclavicular node of 61-year-old white male patient [20, 21]; ethics and consent statements can be found in the corresponding references [20, 21]. 486p cells were kindly provided by the Urology department of University Medical

Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. Culture conditions are described in the Additional file 1.

#### **In vitro cell viability assays**

Cytotoxicity profiles of single compounds and drug combinations were evaluated by MTT or trypan blue-based viability assays as described previously [22]. The duration of treatment was 48 h, unless otherwise stated.

#### **Examination of synergistic/antagonistic effects of drug combinations**

Determination of synergistic, antagonistic, or additive effects of compounds used in combination assays was performed using the Chou-Talalay method as previously described [23]. The combinational index (CI) was calculated with the CompuSyn v.1.0. Software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA). Fa (fraction affected) is defined as the non-survival fraction at a certain dose of compounds or their combinations. Synergism is defined as a CI < 0.85, whereas antagonism has a CI > 1.2. A CI of 0.85 to 1.2 is considered an additive effect.

#### **Detection of apoptotic cells by annexin-V-FITC/PI double staining**

Induction of apoptosis was examined by FACS analysis with an annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) double staining. The experiment was performed as previously described with slight modifications [24]. In brief, cells were pre-incubated overnight in 6-well plates ( $0.2 \times 10^6$  cells/well), pretreated for 1 h with the medium (1 mL/well) with or without addition of the caspase inhibitor zVAD (100  $\mu$ M). The compound of interest was then added and the cells were incubated for additional 48 h. After treatment, cells were harvested with a trypsin solution, stained, and analyzed using a FACS Calibur (BD Bioscience) and BD Bioscience Cell Quest Pro software (BD Bioscience).

#### **Cell cycle and DNA fragmentation analysis**

The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry using PI staining as described before [22]. In brief, cells were pre-incubated overnight in 6-well plates ( $0.2 \times 10^6$  cells/well) and treated with FrA. After 48 h of treatment, cells were trypsinized, fixed with 70% EtOH/H<sub>2</sub>O (v/v), stained, and analyzed. The results were generated and quantitatively analyzed using a FACS Calibur as above and BD Bioscience Cell Quest Pro software.

#### **Western blotting**

Preparation of protein extracts and Western blotting was performed as described previously [23]. In brief  $1 \times 10^6$  cells/well were seeded in Petri dishes ( $\emptyset$  10 cm TC Dish (Sarstedt, Numbrecht, Germany) 10 mL/dish), incubated overnight and treated with drugs for 48 h in 10 mL/dish.

Cells were harvested using a cell scraper, washed, and lysed. Lysates were frozen overnight at  $-20$  °C and then centrifuged. Protein concentration in the supernatants was determined by Bradford assay. Total protein extracts (20–30  $\mu$ g/sample) were subjected to electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels at 120 V, and transferred from gel to a 0.2  $\mu$ m pore PVDF membrane. The membrane was blocked and incubated with the primary and secondary antibodies according to the manufacturers' protocol (for antibodies used, see Additional file 1: Table S1). Signals were detected using the ECL chemiluminescence system (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's protocol.

#### **Silencing of p53 by siRNA transfection**

Silencing of p53 gene was performed using siRNA transfection technique and Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, UK). RT112 cells were pre-incubated overnight in 6-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well in 2 mL) in antibiotics-free RPMI media. The solutions (a) and (b) were prepared: (a) 20  $\mu$ L of 100 pmol/ $\mu$ L siRNA (total amount 2 nmol) + 230  $\mu$ L of Opti-MEM media; (b) 7.5  $\mu$ L of Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Transfection Reagent + 242.5  $\mu$ L of Opti-MEM media. The solutions were incubated for 5 min, mixed and further incubated for 20 min. The media in the wells were replaced with 2 mL of fresh antibiotics-free RPMI media and 0.5 mL of (a) + (b) mixture were added to each well by dropping. After 72 h of incubation the media was aspirated, cells were washed PBS, and fresh antibiotics-free RPMI media (drug-containing or drug-free) was added (2 mL/well). Then the cells were either immediately harvested for Western blotting analysis or incubated for 48 h and analyzed by FACS.

Duplexed siRNA were purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). The gene target sequences (5'  $\rightarrow$  3') are: p53 siRNA (NM\_000546\_Val): GACUC CAGU GGUAAUCUAC(dTdT); scrambled siRNA (Non Specific Control 47% GC): AGGUAGUGUAAUCGCC UUG(dTdT).

#### **Immunofluorescence analyses**

The experiments were performed as described before [17]. In brief, RT112 cells ( $5 \times 10^4$  cells/chamber) were treated for 48 h with investigated drugs, fixed and permeabilized. Next, cells were stained with anti-LC3B-I/II antibody overnight at 4 °C followed by incubation with secondary anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated antibody. Samples were washed and covered with DAPI-based ProLong<sup>®</sup> Gold reagent (Life Technologies) and directly analyzed with AxioScope.A1 (Carl Zeiss) microscope with the AxioVision40 V4.8 software (Carl Zeiss Imaging Solutions).

**Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software v. 5.01 (GraphPad Prism software Inc., La Jolla, CA, USA). Data are presented as mean ± SEM (standard error of mean). All experiments were performed in triplicates, and repeated at least three times. The unpaired Student’s *t*-test was used for comparison of two groups. Statistical significance was labeled as: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

**Results**

**FrA reduces urothelial carcinoma cell viability**

Fronoside A (FrA, Fig. 1a) exerted cytotoxic activity in all human UC cell lines tested, with IC<sub>50</sub>s ranging from 0.55 to 2.33 μM. Remarkably, cisplatin (Cis) used as a reference drug was less effective in the same assays, having 2–6 fold higher IC<sub>50</sub>s (Fig. 1b). The urinary bladder transitional cell carcinoma cell line RT112 cells showed highest sensitivity to FrA, and was chosen as a model to further explore the molecular mechanisms of anticancer action of this marine natural compound.

**FrA induces apoptosis in urothelial carcinoma cells**

Next, we examined the effect of FrA on the induction of apoptosis in human UC cells. Hallmarks of apoptosis, including dose-dependent caspase- and PARP-cleavage (Fig. 2a), DNA fragmentation (Fig. 2b), as well as phosphatidylserine externalization (Fig. 2c), were observed in FrA-treated RT112 cells. In addition, the effect of FrA on several pro- and anti-apoptotic proteins was examined by Western blotting. The upregulation of pro-apoptotic Bax and p21 was observed in FrA-treated RT112 cells (Fig. 2a), while no alterations of p-Akt, p53, Bad, Pak1, survivin, and Bcl-2 were found (data not shown). FACS analysis did not reveal any significant effect of FrA on cell cycle phase distribution of human UC cells (data not shown).

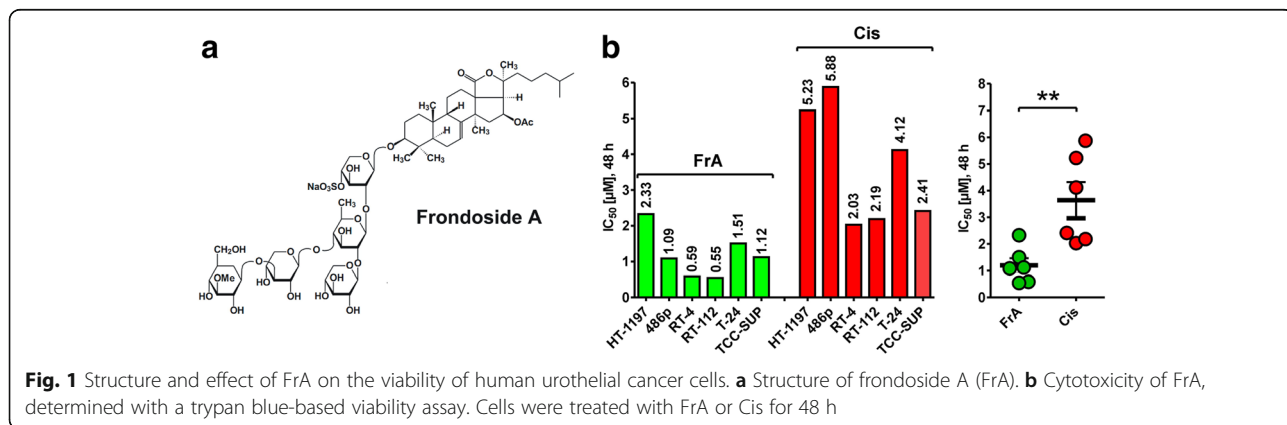
**FrA-induced apoptosis is caspase- and p53-independent**

Various cytotoxic anti-cancer therapies act through pro-apoptotic caspases- and/or p53-related pathways. However, these processes are often defected in human cancer cells, which may result in chemotherapy resistance [9, 25]. Therefore, we investigated the role of these two pathways in FrA-induced apoptosis. We could show that FrA induces dose-dependent caspase-3, -8, and -9 cleavage in RT112 cells (Fig. 2a). However, the inhibition of caspases activity by pretreatment with the pan-caspase inhibitor zVAD did not decrease the apoptotic cells rate (Fig. 2c, d). At the same time, the pro-apoptotic effect of anisomycin—a well characterized inducer of classical apoptosis—was significantly inhibited by the zVAD (Fig. 2d). Based on these results, we conclude that FrA is able to induce apoptosis in UC cells independently of caspase activity. The observed caspase cleavage is probably an unspecific effect, which can occur secondary to other FrA-induced cytotoxic events.

RT112 cells are known to harbor wild-type p53 gene [19]. FrA did not alter the total level of p53 of RT112 cells (Fig. 3a). Silencing of the p53 gene expression using specific siRNA resulted in a substantial reduction of p53 protein level in RT112 cells (Fig. 3b). Remarkably, the cytotoxic effect of cisplatin was significantly decreased in the cells with reduced p53 level, while no inhibition of FrA efficacy was observed (Fig. 3c). In line with this finding, pretreatment with pifithrin-α—a chemical inhibitor of p53 activity—suppressed cytotoxicity of cisplatin (Fig. 3d), but not the activity of FrA (Fig. 3e) suggesting that FrA remains active in human cancer cells bearing mutated non-functional p53.

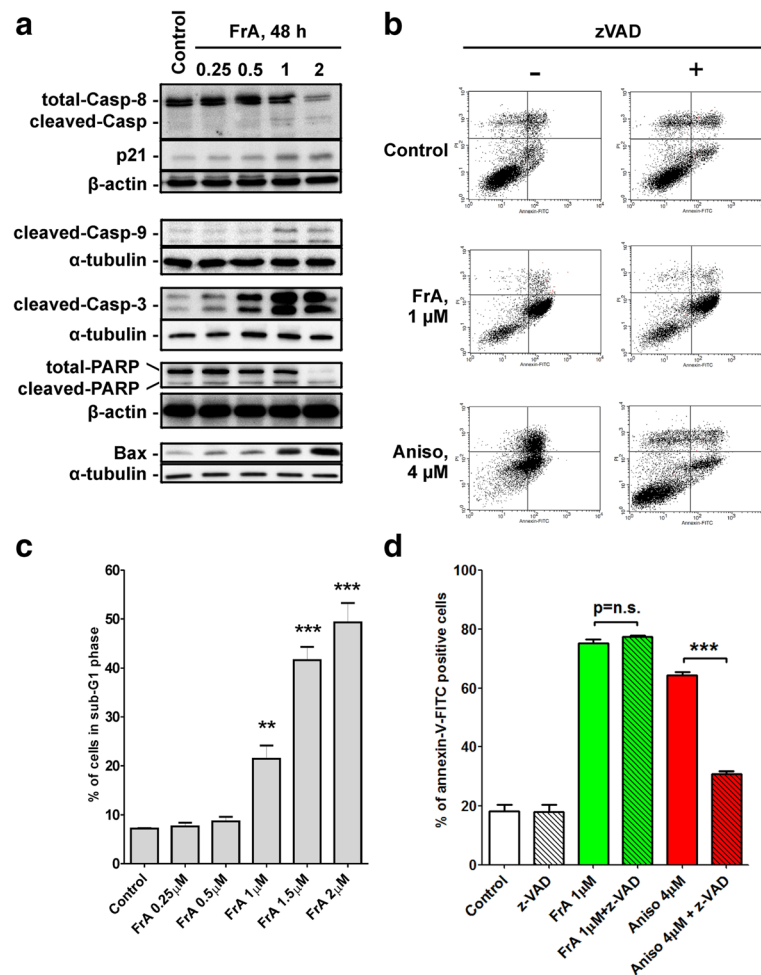
**FrA affects MAPK in RT112 cells**

Mitogen activated protein kinases (MAPK) can be involved in both proliferative or pro-apoptotic mechanisms in human UC [26, 27]. Therefore, we evaluated the effect of FrA on MAPK in RT112 cells. After short-term treatment (1 h), FrA lead to suppression of p38



**Fig. 1** Structure and effect of FrA on the viability of human urothelial cancer cells. **a** Structure of fronoside A (FrA). **b** Cytotoxicity of FrA, determined with a trypan blue-based viability assay. Cells were treated with FrA or Cis for 48 h





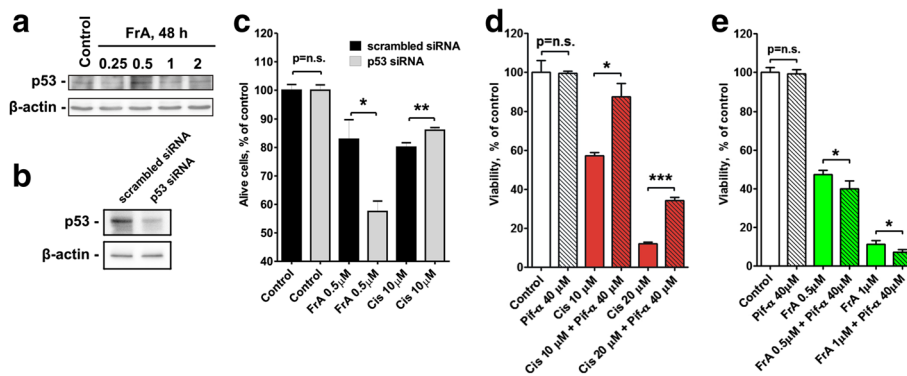
**Fig. 2** Induction of caspase-independent apoptosis in FrA-treated cells. **a** Western blotting analysis of protein extracts of RT112 cells treated with FrA for 48 h. **b** Cell cycle analysis of RT112 cells treated with FrA for 48 h. Apoptotic cells are detectable as a sub-G1 population. Cell cycle phase distribution was quantified using the Cell Quest Pro software. **c, d** Flow cytometry analysis of RT112 cells treated with FrA using an annexin-V-FITC/PI double staining (**c**) and quantification of positive cells (**d**). Cells were pretreated with 100  $\mu$ M of the pan-caspase inhibitor zVAD for 1 h and then treated with indicated concentrations of FrA or with anisomycin (Aniso, positive control) for 48 h. Apoptotic cells appearing in the right lower and upper quadrants were quantified using the Cell Quest Pro software

and ERK1/2 phosphorylation (at the FrA concentrations  $\geq 5 \mu$ M), but activated JNK1/2 (Fig. 4a). Activation of JNK1/2 was also observed after long-term treatment with FrA (48 h, Fig. 4b). To further explore the role of JNK1/2 activation in response to FrA treatment, we investigated the effect of the well-established JNK1/2 inhibitor SP600125 on FrA-mediated cytotoxicity. Combining FrA and SP600125 clearly showed synergistic cytotoxic effects in MTT-based Chou-Talalay assays (Fig. 4c), indicating a prosurvival role of JNK1/2 activation in UC cells following FrA treatment.

### Autophagy

Induction of pro-survival autophagy by different anti-cancer agents is a recently characterized phenomenon in different human cancers, including UC [10, 11, 28]. Of

note, pro-survival autophagy was identified as one of the main mechanisms of drug-resistance in UC [10, 11, 13, 28]. LC3 (isoforms LC3B-I and LC3B-II) and p62 (also known as SQSTM1) proteins are major effectors of this process and therefore are often used as autophagy alteration markers [29]. During autophagy, LC3-I converts to LC3-II, which is required for the autophagosome membrane formation. p62 is an autophagosome cargo protein which binds other proteins for selective autophagy [29]. Accumulation of LC3-I/II and p62 as well as accumulation of LC3-positive organelles (autophagosomes) indicate inhibition of autophagy [29]. We could demonstrate that FrA induces time- and dose-dependent accumulation of these autophagy-related proteins (Fig. 5a, b). Interestingly, in RT112 cells, the maximal p62 protein level was observed after 2 h of treatment, whereas maximal LC3B-II levels



**Fig. 3** Effect of p53 silencing on cytotoxicity of FrA. **a, b** Western blotting analysis of p53 expression in RT112 cells treated with FrA for 48 h (**a**) or transfected with p53 siRNA versus cells transfected with scrambled siRNA (**b**). **c** Viability of transfected cells treated with FrA or Cis for 48 h. Cell viability was analyzed by flow cytometry analysis using annexin-V-FITC/PI double staining. Viable cells appearing in the lower left quadrant were quantified using the Cell Quest Pro software. **d, e** Effect of pifithrin- $\alpha$  (Pif- $\alpha$ )—an inhibitor of p53 activity—on the cytotoxic activity of FrA and Cis in nontransfected RT112 cells. Cells were pretreated with 40  $\mu$ M of Pif- $\alpha$  for 30 min and then cotreated with FrA (**d**) or Cis (**e**) for 48 h. Cell viability was determined using MTT-assay

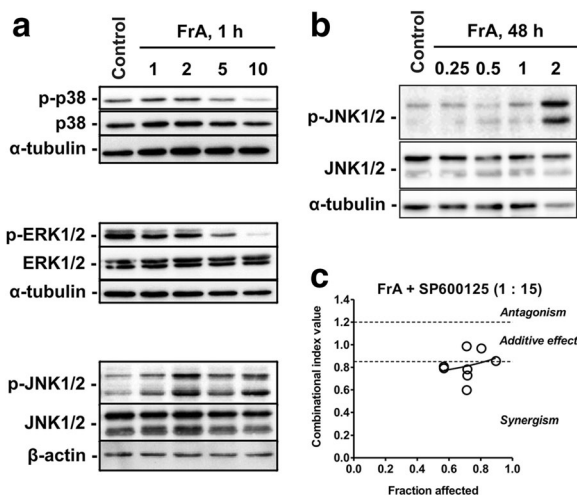
were detected after 48 h (Fig. 5a, b), elucidating the kinetics of autophagy in UC cells. Additionally, increased LC3B-I/II-immunostaining of RT112 cells treated with FrA (Fig. 5c) was found being a result of a treatment-induced accumulation of autophagosomes (Fig. 5d).

Finally, similar profiles were observed for cells treated with the well-established autophagy inhibitors BafA1 and CQ when compared to FrA (Fig. 5a–c), indicating

comparable molecular effects of these three compounds, i.e. inhibition of autophagy.

#### FrA enhances cytotoxic effects of cisplatin and gemcitabine

The effect of FrA was evaluated in combination with two standard chemotherapeutic agents frequently applied in advanced UC, namely cisplatin and gemcitabine. Remarkably, FrA was strongly synergistic in combination with both drugs in RT112 cells (Fig. 6a, b).

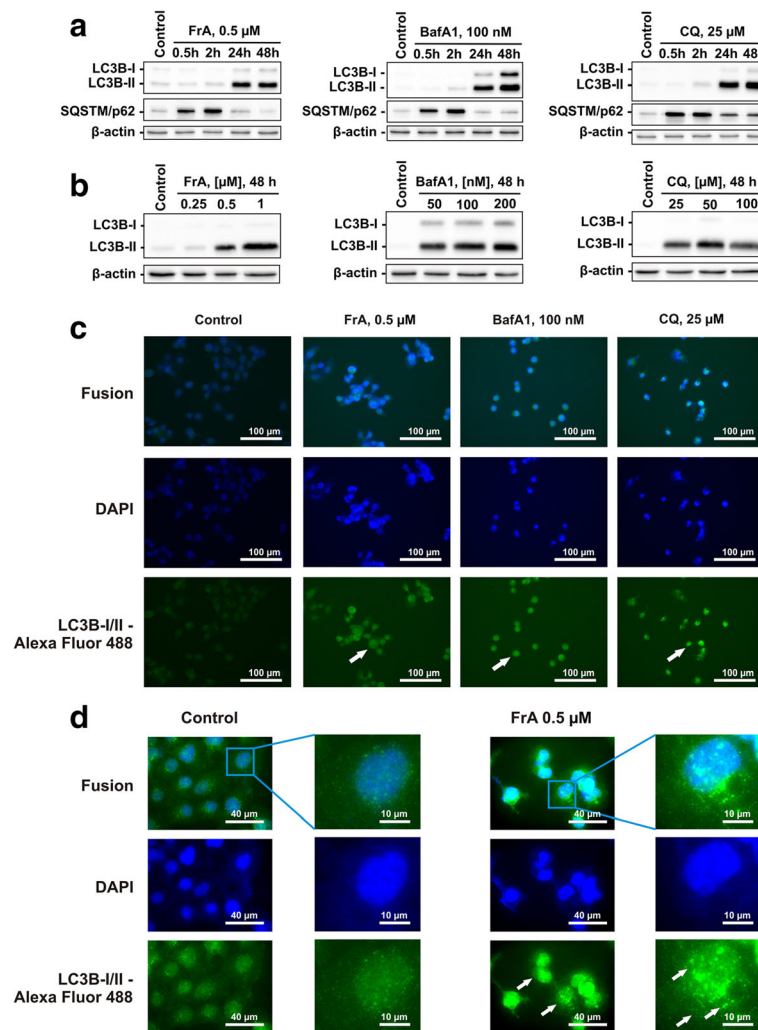


**Fig. 4** Effect of FrA on mitogen-activated protein kinases (MAPK). **a, b** RT112 cells were treated with FrA for 1 h (**a**) or 48 h (**b**), and then protein extracts were analyzed by Western blotting. **c** Effect of SP600125 (a specific JNK1/2 inhibitor) on the survival of RT112 cells treated with FrA. Drugs were combined in the constant molar ratio C(FrA) : C(SP600125) = 1 : 15, and cells were cotreated with the individual drugs or their combination for 48 h. The data were generated using trypan blue-based viability assay. Cells were pretreated with SP600125 in 50  $\mu$ L/well culture media for 1 h. The combinational index (CI) was calculated with the CompuSyn v.1.0. software

#### Discussion

Cisplatin based combination therapy is the standard of care for first line therapy of advanced or metastasized UC. However, despite initial response rates of 40–70%, relapses occur in the majority of patients due to the development of resistance [1, 10, 30]. Among others, overexpression of ERCC1, Nrf2, CTR1/2, hENT1 and BRCA1, expression of specific miRNA, epithelial-mesenchymal transition, loss of p53 function, and pro-survival autophagy were identified as potential mechanisms of resistance [10, 30].

In this study, we investigated the anticancer activity of the marine natural compound FrA in human UC cells. FrA decreased the viability of UC cells more effectively than cisplatin at equimolar concentrations. The marine compound exerted its cytotoxic action through the induction of apoptosis. This process was associated with the alteration of several pro-apoptotic factors, like cleaved caspases-3, -8, and -9, cleaved PARP, Bax and p21, leading to dose-dependent DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization. In addition, FrA activated JNK1/2, while p38 and ERK1/2 were inhibited. JNK1/2 may have either pro- or anti-apoptotic functions, depending on cell type, nature of the death stimulus and

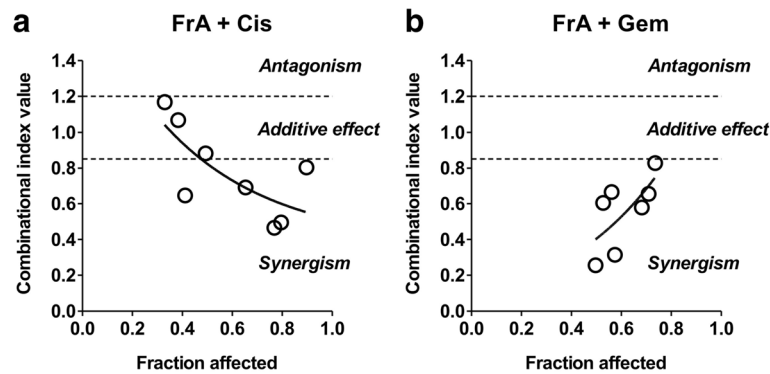


**Fig. 5** Inhibition of autophagy in urothelial cancer cells under FrA-treatment. **a, b** Time- (**a**) and dose-dependent (**b**) effects of FrA, bafilomycin A1 (BafA1), and chloroquine (CQ) on levels of LC3B-I/II and SQSTM/p62 in RT112 cells. Cells were treated for 0.5–48 h (**a**) or for 48 h (**b**), followed by protein extraction and analysis by Western blotting. The established autophagy inhibitors BafA1 and CQ were used as positive controls. **c, d** Accumulation of autophagosomes/autolysosomes. Cells were treated with the indicated concentrations of FrA, BafA1, and CQ for 48 h, fixed, permeabilized, and incubated with the anti-LC3B-I/II antibody, followed by treatment with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. The pictures were made at  $\times 400$  (**c**) or  $\times 1000$  (**d**) magnification. LC3B-I/II-positive organelles (autophagosomes/autolysosomes) appearing as dots are indicated by arrows

other factors [31]. As inhibition of JNK1/2 resulted in a more pronounced cytotoxic effect of FrA, JNK1/2 activation may partly antagonize FrA mediated effects in UC cells. Combining FrA with a JNK1/2 inhibitor might increase the efficacy of the marine compound. These observations, however, require further investigations.

Caspase-dependent apoptosis pathways are known to be often nonfunctional in human cancer cells. Overexpression of endogenous caspase inhibitors, mutations in caspase genes and genes coding up- or downstream molecules, as well as low expression of these genes were found to be causative [25]. In addition, more than 50% of all human tumors (and >60% of UC neoplasms [6]) harbor mutant p53 with abrogated tumor suppressive

function. This has often been associated with increased tumor progression and negative treatment outcome [7–9]. Thus, compounds which are able to induce apoptosis independently of caspase- and p53-activity are potentially of high clinical impact [9]. Interestingly, FrA mediated induction of apoptosis in human UC cells did not require active caspases, although the upregulation of active caspases was observed in the treated cells. Therefore, we assume that caspase activation is most probably a secondary event, triggered by programmed death of cancer cells in a caspase-independent manner [32, 33]. More importantly, using two different independent methods, namely p53 gene silencing and inhibition of p53



**Fig. 6** Effect of FrA in combination with cisplatin and gemcitabine. Cells were cotreated with different concentrations of the single substances or their combination for 48 h at the constant molar ratios C(FrA) : C(Cis) = 1 : 4 (a) and C(FrA) : C(Gem) = 1 : 0.25 (b). The combinational index (CI) values were calculated with CompuSyn software. The viability was examined using a trypan blue-based viability assay

activity by pifithrin- $\alpha$ , we have demonstrated that FrA-induced apoptosis could not be abolished by p53 alterations. In line with these results, FrA was active in UC cells bearing both wild-type (RT112, RT4, and HT-1197 cells) and mutant (T-24 and TCC-SUP cells) p53 [19]. Interestingly, FrA appeared to be even slightly more effective in RT112 cells with silenced or inhibited p53. In contrast, in both experiments cisplatin was significantly less active in cells with either silenced or inhibited p53, demonstrating a p53-dependence of cytotoxicity of this classical anti-cancer agent. In the past decade, there are different hints that p53 engages powerful pro-survival pathways along with its tumor suppressive function [34]. This effect strongly depends on the cell type, the specific stimulus and its severity. In fact, unincisive stimuli can induce slight and temporary p53-dependent cell cycle arrest leading to DNA repair. An explanation for the increase of FrA cytotoxicity in p53-deficient/suppressed RT112 cells may be a very low interaction of FrA with the DNA damaging system, leading to the activation of the pro-survival function of p53 (which is also in line with the observed slight activation of p21 expression—one of the best studied targets of p53). In contrast, cisplatin directly targets DNA by the induction of crosslinks (which is usually associated with the strong activation of p21 expression) [35], and therefore can be considered a “strong stimulus” activating the pro-apoptotic functions of p53. However, this issue requires further investigations.

Caspase-independent cell death (CICD) can be exerted through different mechanisms including death receptor-induced necroptosis as well as mitochondrial, lysosomal, or endoplasmic reticulum stress [33, 36, 37]. While the first mechanism requires the death ligand presence, the latter three are often triggered by small molecules which result in a mechanical damage of the respective cellular

structures [36, 38]. Different proteins which are released during these events lead to the caspase-independent apoptosis not requiring active p53 protein. Thus, mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) can cause the release of HtrA2/Omi, endonuclease G and AIF, while lysosomal membrane permeabilization (LMP) leads to the release of cathaspins, and endoplasmic reticulum (ER) stress—to calcium release, consequently leading to the activation of nonlysosomal cysteine proteases calpains [33, 36]. One of these mechanisms may explain caspase- and p53-independent character of FrA-induced apoptosis in UC cells. However, further investigations are required to prove these assumptions.

Recently, autophagy has been reported to be an important drug-resistance and pro-survival mechanism in UC [10, 13, 28]. Indeed, inhibition of basal levels of autophagy lead to UC cell death and re-sensitized cancer cells to chemotherapy [10, 13]. Here, we could demonstrate that FrA is capable to induce apoptosis and—unlike other cytotoxic compounds—simultaneously inhibit autophagy in UC cells.

Finally, FrA revealed a strong synergistic effect when combined with cisplatin and gemcitabine in RT112 cells. This effect may at least in part be explained by the ability of FrA to inhibit pro-survival autophagy, as similar effects were observed previously when combining cisplatin with autophagy inhibition with in UC cells [10].

In vivo studies are an essential step for the further preclinical and clinical development of anticancer agents. Recently, it has been shown that daily intravenous (i.v.) injections are the best way of FrA administration providing the highest values of maximum plasma concentration of this drug [39]. Therefore, it is highly recommended to use the i.v. administration for future in vivo studies of FrA in models of human UC.

## Conclusions

In conclusion, the marine triterpene glycoside frondoside A (FrA) is an interesting compound revealing high efficacy in human UC cells. A unique combination of properties including (i) induction of apoptosis not requiring active caspases and p53, (ii) inhibition of pro-survival autophagy and (iii) increased activity when combined with classical cytotoxic agents makes the FrA a very promising candidate for the treatment of UC.

## Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Supplementary methods section. Additional information to the Materials section listing and describing the reagents and antibodies used as well as the cell culture conditions. (DOCX 25 kb)

## Abbreviations

Aniso: Anisomycin; BafA1: Bafilomycin A1; CI: Combinational index; Cis: Cisplatin; CQ: Chloroquine; FrA: Frondoside A; Gem: Gemcitabine; Pif- $\alpha$ : Pifithrin- $\alpha$ ; UC: Urothelial carcinoma; zVAD: z-VAD(OMe)-fmk

## Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. Andy Long and Dr. Courtney Long (University Medical Center Hamburg-Eppendorf) for the language editing and proofreading of the manuscript.

## Funding

This research (biological experiments) was supported by the Hamburger Krebsgesellschaft and the Erich and Gertrud Roggenbuckstiftung. SD was supported by a scholarship of the Department of Oncology, Hematology, Bone Marrow Transplantation with section Pneumology, Department of Medicine, University Hospital Hamburg-Eppendorf. This research (isolation and purification of FrA) was partially supported by the Grant from RFBR [grant number 16-03-00553a], and by the Ministry of Oceans and Fisheries of Korea [grant number 20140513].

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and in the Additional file 1. Frondoside A is available and stored in the Laboratory of Experimental Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

## Authors' contributions

SAD and RM designed the research and performed the biological experiments. VIK, ASS, SAA, and VAS isolated, purified and elucidated the structure of frondoside A used for the experiments. JH, KO, WHA, and US assisted the biological experiments and data analysis. CB and FH assisted the discussion of results and the interpretation of the data. GvA designed and supervised the research and raised the funding. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. SAD and RM contributed equally.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, Hamburg 20246, Germany. <sup>2</sup>Laboratory of Marine Natural Products Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, Prospekt 100-let Vladivostoku 159, Vladivostok 690022,

Russian Federation. <sup>3</sup>School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University, Sukhanova Street 8, Vladivostok 690091, Russian Federation. <sup>4</sup>Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, Hamburg 20246, Germany. <sup>5</sup>Tumor and Breast Center ZeTUP St. Gallen, Rorschacher Strasse 150, St. Gallen 9006, Switzerland.

Received: 31 August 2016 Accepted: 23 January 2017

Published online: 01 February 2017

## References

- Kim JJ. Recent advances in treatment of advanced urothelial carcinoma. *Curr Urol Rep.* 2012;13(2):147–52.
- Dreicer R. Second-line chemotherapy for advanced urothelial cancer: because we should or because we can? *J Clin Oncol.* 2009;27(27):4444–5.
- Oing C, Rink M, Oechsle K, Seidel C, von Amsberg G, Bokemeyer C. Second line chemotherapy for advanced and metastatic urothelial carcinoma: vinflunine and beyond—a comprehensive review of the current literature. *J Urol.* 2016;195(2):254–63.
- U.S. Food and Drug Administration: Atezolizumab for urothelial carcinoma. Available at <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm501878.htm>. Accessed 26 May 2016.
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.* 2016; 387(10031):1909–20.
- Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Hansson J, Jansson O, Larsson P, Sandstedt B, Wijkström H, Hemminki K. p53 mutations in urinary bladder cancer. *Br J Cancer.* 2001;84(11):1505–11.
- George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA, et al. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(34):5352–8.
- Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D, Kogevinas M, Real FX. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2005;6(9):678–86.
- Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: New opportunities for cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2006;9(1):19–25.
- Ojha R, Singh SK, Bhattacharyya S, Dhanda RS, Rakha A, Mandal AK, Jha V. Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent. *J Urol.* 2014;191(6):1889–98.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(12):961–7.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(9):1533–41.
- Lin YC, Lin JF, Wen SI, Yang SC, Tsai TF, Chen HE, Chou KY, Hwang TI. Inhibition of high basal level of autophagy induces apoptosis in human bladder cancer cells. *J Urol.* 2015;195(3):1126–35.
- Girard M, Bélanger J, ApSimon JW, Garneau F-X, Harvey C, Brisson J-R. Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*. *Can J Chem.* 1990;68(1):11–8.
- Aminin D, Menchinskaya E, Pislugin E, Silchenko A, Avilov S, Kalinin V. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides. *Mar Drugs.* 2015; 13(3):1202–23.
- Janakiram N, Mohammed A, Rao C. Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer agents. *Mar Drugs.* 2015;13(5):2909–23.
- Dyshlovoy SA, Menchinskaya ES, Venz S, Rast S, Amann K, Hauschild J, Otte K, Kalinin VI, Silchenko AS, Avilov SA, et al. The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity in vitro and in vivo in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2016;138:2450–65.
- Silchenko AS, Avilov SA, Kalinin VI, Kalinovskiy AI, Dmitrenko PS, Fedorov SN, Stepanov VG, Dong Z, Stonik VA. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of okhotosides B1–B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species. *J Nat Prod.* 2008;71(3):351–6.
- Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer.* 2004;91(2):355–8.

20. Elliott AY, Bronson DL, Cervenka J, Stein N, Fraley EE. Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract. *Cancer Res.* 1977;37(5):1279–89.
21. Elliott AY, Bronson DL, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract. *Cancer Res.* 1976;36(2 Pt 1):365–9.
22. Dyshlovoy SA, Naeth I, Venz S, Preukschas M, Sievert H, Jacobsen C, Shubina LK, Gesell Salazar M, Scharf C, Walther R, et al. Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity. *J Proteome Res.* 2012;11(4):2316–30.
23. Dyshlovoy SA, Hauschild J, Amann K, Tabakmakher KM, Venz S, Walther R, Guzi AG, Makarieva TN, Shubina LK, Fedorov SN, et al. Marine alkaloid Monanchocidin A overcomes drug resistance by induction of autophagy and lysosomal membrane permeabilization. *Oncotarget.* 2015;6(19):17328–41.
24. Pelageev DN, Dyshlovoy SA, Pokhilo ND, Denisenko VA, Borisova KL, Keller-von Amsberg G, Bokemeyer C, Fedorov SN, Honecker F, Anufriev VP. Quinone-carbohydrate nonglycoside conjugates as a new type of cytotoxic agents: synthesis and determination of in vitro activity. *Eur J Med Chem.* 2014;77:139–44.
25. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol.* 2004;26(2):82–97.
26. Otto KB, Acharya SS, Robinson VL. Stress-activated kinase pathway alteration is a frequent event in bladder cancer. *Urol Oncol.* 2012;30(4):415–20.
27. Grieco L, Calzone L, Bernard-Pierrot I, Radvanyi F, Kahn-Perlès B, Thieffry D. Integrative modelling of the influence of MAPK network on cancer cell fate decision. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(10):e1003286.
28. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 2013;4:e838.
29. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1–222.
30. Massari F, Santoni M, Ciccarese C, Brunelli M, Conti A, Santini D, Montironi R, Cascinu S, Tortora G. Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: implications for future strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(1):81–90.
31. Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* 2005;15(1):36–42.
32. Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):192–7.
33. Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 2005;11(7):725–30.
34. Janicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ.* 2008;15(6):959–76.
35. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7265–79.
36. Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3155–62.
37. Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(3):268–75.
38. Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene.* 2008;27(50):6452–61.
39. Al Shemali J, Parekh KA, Newman RA, Hellman B, Woodward C, Adem A, Collin P, Adrian TE. Pharmacokinetics in mouse and comparative effects of frondosides in pancreatic cancer. *Mar Drugs.* 2016;14(6):115. doi:10.3390/md14060115.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 1. Einleitung

Harnblasenkarzinome nehmen in der deutschen Bevölkerung seit Jahren zu, laut der aktuellen S3-Leitlinie für das Harnblasenkarzinom wird für das Jahr 2016 von 15.600 Neuerkrankungen ausgegangen. Die Zahl der Neuerkrankungen steigt damit seit Jahren weiter an (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019). Histologisch handelt es sich bei Harnblasenkarzinomen in ca. 95% um Urothelkarzinome (Riede, Werner and Freudenberg, 2009). Es stellt in Deutschland die vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes dar (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016). Männer erkranken dreimal so häufig wie Frauen. Das mediane Erkrankungsalter der betroffenen liegt bei über 70 Jahren (Possinger, Regierer and Eucker, 2017). Bei ca. jedem vierten Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein lokal fortgeschrittenes, metastasiertes oder inoperables Tumorstadium vor. Außerdem kommt es nicht selten vor, dass die Behandlung von Patienten durch Komorbiditäten und durch einen klinisch reduzierten Allgemeinzustand erschwert wird (Possinger, Regierer and Eucker, 2017). Eine systemische Chemotherapie ist für ein solches Patientenkollektiv häufig nicht, oder nur eingeschränkt möglich. Weiterhin sind die zugelassenen Zytostatika in der Folgetherapie begrenzt. Im Falle eines Rezidivs nach der Erstlinientherapie, ist Pembrolizumab die erste Wahl. Mit Vinflunin ist nur eine weitere Chemotherapie in der Zweitlinie zugelassen (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019). Aus diesem Grund ist eine weitere Forschung und Entwicklung neuer potenter Substanzen, für alle Patientengruppen, von großer Bedeutung um eine weitere Verbesserung der Therapie zu ermöglichen.

## 2. Risikofaktoren

Als entscheidender Risikofaktor für das Auftreten eines Urothelkarzinoms (UC) wurde, wie bei vielen anderen Neoplasien, das Zigarettenrauchen identifiziert. Das Erkrankungsrisiko liegt bei Rauchern, in Abhängigkeit der Dauer und des täglichen Konsums, im Vergleich zu Nichtrauchern in einem Verhältnis von bis zu 6:1 (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019). Neben inhalativen Noxen gelten chemische Kanzerogene, insbesondere aromatische Amine, als gesicherter Risikofaktor für Urothelkarzinome. Bei stattgehabter beruflicher Exposition mit diesen Noxen wird die Erkrankung nach der deutschen Berufskrankheiten-Verordnung als Berufskrankheit anerkannt. Im Zeitraum von 1978 bis 2010 wurden insgesamt 1935 Fälle eines neudiagnostizierten Harnblasenkarzinoms als Berufskrankheit klassifiziert, ca. 1000 Fälle stammen aus dem Chemie Sektor (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. ((AWMF), 2016). Frühere zytostatische Behandlungen mit beispielsweise Cyclophosphamid oder eine vorangegangene Radiatio können ebenfalls das Erkrankungsrisiko erhöhen. Des Weiteren können chronische Infektionen der Harnwege sowie genetische Veränderungen einen Risikofaktor darstellen, da familiäre Häufungen beobachtet wurden (Possinger, Regierer and Eucker, 2017).



### 3. Therapie

Die Therapie des Urothelkarzinoms richtet sich in erster Linie nach dem Tumorstadium. Auch Faktoren wie Alter, Vorerkrankungen und der klinische Allgemeinzustand nehmen Einfluss auf die Therapiemöglichkeiten.

#### 3.1 Platinbasierte Chemotherapie

Für die Therapie eines lokal fortgeschrittenen, inoperablen oder metastasierten Harnblasenkarzinoms erfolgt die Behandlung systemisch. Dabei sollte bei Patienten in einem guten Allgemeinzustand ohne signifikante Komorbiditäten<sup>1</sup>, die Erstlinienbehandlung cisplatinbasiert erfolgen. In den 1990er Jahren war eine Behandlung nach dem MVAC-Schema mit Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin Therapie der Wahl. Dieses Therapieregime ist zurückzuführen auf die Studien von Logothetis et al. und Loehrer et al. (Bukhari, Al-Shamsi and Azam, 2018). Verglichen wurden hier in einem Zeitraum von 1984 bis 1989 269 Patienten mit einem fortschreitenden Urothelkarzinom. Das MVAC Therapieregime zeigte sich hier der alleinigen Applikation von Cisplatin als signifikant überlegen (Loehrer *et al.*, 1992). Für junge Patienten in einem guten Allgemeinzustand ist eine Erweiterung um hochdosiertes Methotrexat indiziert, da diese Therapieeskalation mit einer höheren Ansprechrates und einem um 15% erhöhten Langzeitüberleben einhergeht (Possinger, Regierer and Eucker, 2017).

Aufgrund einer besseren Verträglichkeit bei vergleichbarer Effektivität wurde in der klinischen Praxis das MVAC Regime durch eine Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin abgelöst. So zeigte eine große randomisierte und multizentrische Phase-III-Studie mit 405 Patienten von von der Maase et al. ein vergleichbares Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben sowie eine ähnliche Zahl an Komplettremissionen für beide Studienarme. Deutlich überlegen war die Doublette in der Verträglichkeit: Vergleicht man die Rate der höhergradigen Anämien (27%), Thrombopenien (57%) sowie Neutropenien (82%) des MVAC Protokolls mit den Raten der Anämien (18%), Thrombopenien (21%) sowie Neutropenien (71%) unter

---

<sup>1</sup> Zu Komorbiditäten siehe 3.1.1

Cisplatin/Gemcitabin, liegen diese signifikant niedriger. Eine potentiell letale Nebenwirkung, die neutropene Sepsis, trat unter MVAC bei 12% der Patienten auf, mit Cisplatin/Gemcitabin dagegen nur bei 1% (von der Maase et al., 2000).

Dies hat dazu geführt, dass Cisplatin und Gemcitabin derzeit als Goldstandard in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms gelten.

### **3.1.1 Platinungeeignete Patienten**

Für Patienten, die durch Komorbiditäten oder einen eingeschränkten Allgemeinzustand nicht in der Lage sind eine platinhaltige Therapie zu erhalten, kann ein Wechsel auf Carboplatin erwogen werden. Kriterien für eine fehlende Cisplatin Eignung sind ECOG  $\geq 2$  oder Karnofsky-Index  $< 60\%$ , Kreatinin-Clearance  $< 40\text{ml/h}$ , Hörverlust oder Polyneuropathie von CTCAE Grad 2 sowie einer Herzinsuffizienz ab NYHA Grad 3 (Galsky *et al.*, 2011; Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), 2016b). Als adäquater Ersatz ist der Wechsel jedoch nicht anzusehen (Possinger, Regierer and Eucker, 2017).

Die EORTC-Studie hat zwei Carboplatin basierte Therapieregime für Patienten, welche nicht in der Lage waren eine Cisplatin basierte Therapie zu erhalten, verglichen. Es zeigte sich, dass die Kombination aus Carboplatin mit Gemcitabin, oder alternativ das M-CAVI Protokoll aus Methotrexat, Vinblastin und Carboplatin ein vergleichbares Gesamtüberleben von 9,3 bzw. 8,1 Monaten erbrachten (De Santis *et al.*, 2012).

Im direkten Vergleich mit Cisplatin basierten Therapien zeigen die Carboplatin basierten Behandlungen allerdings ein deutlich schlechteres Behandlungsergebnis. Ein Gesamtüberleben von 15 Monaten wurde für das MVAC Protokoll ermittelt, für die Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin hingegen 14 Monate.

Carboplatin basierte Therapien zeigen eine Ansprechrate von 41,2% für die Kombination mit Gemcitabin, beim M-CAVI Protokoll lediglich 30,3% (De Santis *et al.*, 2012). Ein signifikant verbessertes Ansprechen wird jedoch mit Cisplatin basierten Therapien erreicht. Hierbei werden Ansprechraten von 46% für die Kombination mit Gemcitabin bzw. 49% für das MVAC-

Protokoll berichtet. Komplette Remissionen wurden im Vergleich zur Cisplatin basierten Therapie nicht beobachtet (von der Maase et al., 2000).

Bezogen auf die Patientensicherheit, im Sinne des Nebenwirkungsspektrums bestätigen sich ebenfalls die ungünstigeren Therapieergebnisse unter der Umstellung auf Carboplatin. Vermehrte Todesfälle sowie hämatotoxische Nebenwirkungen wie Grad 4 Thrombozytopenien und neutropenes Fieber treten in den Carboplatin basierten Therapieprotokollen auf (De Santis et al., 2012). Die negativen Therapieverläufe sowie die höhergradigen Nebenwirkungen, sind zum Teil zumindest, auch durch das Kollektiv der Patienten zu erklären.

Neben der Umstellung auf carboplatinhaltige Kombinationstherapien ist auch die Einleitung einer Immuntherapie seit wenigen Jahren möglich.

### **3.2 Immuntherapie als Erstlinien Therapie**

Der Effekt der Immuntherapie bei neu diagnostizierten UC wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Studien untersucht. Mittlerweile wurden die Checkpoint-Inhibitoren Pembrolizumab sowie Atezolizumab als Erstlinientherapie für Cisplatin ungeeignete Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom zugelassen. Die FDA erweitert diese Zulassung in den USA um die PD-L1 Inhibitoren Avelumab und Durvalumab für den US-amerikanischen Raum. Voraussetzung für eine Therapie ist jedoch das Vorliegen einer hohen PD-L1 Expression auf dem untersuchten Tumorgewebe. Bei Atezolizumab wird die PD-L1 Expression auf tumorinfiltrierenden Immunzellen im Tumormaterial bestimmt, diese muss für eine Therapie mindestens 5% aufweisen (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019). Für eine Therapie mit Pembrolizumab wird ein combine positiv score (CPS) im Tumormaterial erhoben. Beim CPS wird die Anzahl PD-L1 positiver Tumorzellen durch die Gesamtzahl aller vitalen Tumorzellen dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert. Ein CPS von mindestens 10% gilt als positiver PD-L1 Status und damit als Zulassung für Pembrolizumab (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), 2016a). Insbesondere die IMvigor 210-Studie von Balar et al., bezüglich Atezolizumab als Erstlinientherapie, ist hier zu erwähnen (Bundesausschuss, 2019). Bei der Studie von Balar et. Al. handelt es sich um eine multizentrische, single-Arm Phase-II-Studie, in die insgesamt 123 Patienten eingeschlossen

wurden. 119 von ihnen bekamen alle drei Wochen 1200mg Atezolizumab als intravenöse Injektion. Das Gesamtüberleben in dieser Studie lag bei 15,9 Monaten, womit das Gesamtüberleben der platinbasierten Kombinationschemotherapie erreicht wird. Zudem konnte bei 9% der Patienten eine komplette Remission erzielt werden, bei einer Gesamt-Ansprechrates von 23% (Balar, Galsky, *et al.*, 2017). Bemerkenswert ist, dass Untersuchungen zur Nierenfunktion keinen signifikanten Einfluss von Atezolizumab auf die glomeruläre Filtrationsrate der Patienten zeigten (Balar, Galsky, *et al.*, 2017).

Ein weiterer Checkpoint-Inhibitor, der als Erstlinienmedikament für Cisplatin ungeeignete Patienten zugelassen wurde, wird in der KEYNOTE-052-Studie vorgestellt. In dieser Studie wurde 370 Patienten Pembrolizumab in einer Absolutdosis von 200mg alle drei Wochen verabreicht. Die Ansprechrates war mit 24% vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Studie bezüglich Atezolizumab (23%). Des Weiteren zeigte sich das weder ein hohes Patientenalter noch ein reduzierter Allgemeinzustand sich negativ auf das Ansprechen der Therapie äußerten (Balar, Castellano, *et al.*, 2017a).

Neben dem Ansprechen der Therapie und dem Gesamtüberleben stellte sich auch das Nebenwirkungsspektrum als günstiger verglichen mit der Carboplatin basierten Kombinationstherapie dar. Insbesondere höhergradige Nebenwirkungen (Grad 3-4) kamen in der IMvigor 210-Studie in 16% sowie in der Keynote 052-Studie in 15% der Fälle vor (Balar, Castellano, *et al.*, 2017b; Balar, Galsky, *et al.*, 2017).

### **3.3 Immuntherapie als Zweitlinien Therapie**

Seit Juni 2017 ist der PD-1-Inhibitor Nivolumab, nach Versagen einer cisplatinhaltigen Therapie durch die EMA zugelassen (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019). Die Zulassung von Nivolumab begründet sich maßgeblich auf der Checkmate 275-Studie. In dieser Phase-II-Studie wurde insgesamt 270 platinvorbehandelten Patienten Nivolumab in zweiwöchentlichem Abstand appliziert. Hierbei zeigte sich eine Ansprechrates von 19%. Bei der Subgruppe von Patienten mit einer PD-L1 Expression von mehr als 5% sogar eine Ansprechrates von 28,4% (Sharma *et al.*, 2017). Das Gesamtüberleben der Nivolumab Kohorte liegt mit 8,7 Monaten im historischen Vergleich höher als das der Patienten mit einer Vinflunin-Behandlung. In einer Subgruppenanalyse zeigte sich insbesondere ein unterschiedliches Gesamtüberleben in Bezug

auf die PD-L1 Expression. Patienten mit einer Expression von über 5% erreichten demnach 11,3 Monate, wobei eine Expression von weniger als 1% nur ein Gesamtüberleben von sechs Monaten erreichten (Sharma *et al.*, 2017).

Eine ähnliche Studie stellt die IMvigor 211 dar. In dieser randomisierten Phase-III-Studie wurde insgesamt 931 Patienten eingeschlossen und Atezolizumab gegenüber einer Chemotherapie aus Docetaxel, Paclitaxel oder Vinflunin verglichen (Powles *et al.*, 2018). Randomisiert wurden 467 Patienten in die Atezolizumab Kohorte und 464 Patienten in die Chemotherapie Kohorte, welche nochmal unterteilt wurde in 242 Patienten mit Vinflunin-Therapie, 148 Patienten mit einer Paclitaxel- sowie 53 Patienten mit einer Docetaxel Therapie (S3-Leitlinie AWMF, DKG, 2019).

Eine signifikante Verlängerung des Überlebens zugunsten der Atezolizumab Kohorte zeigte sich jedoch nicht, das mediane Gesamtüberleben erbrachte 11,1 Monate für die Atezolizumab Kohorte gegenüber 10,6 Monate in der Chemotherapie Kohorte. Es deutete sich jedoch ein deutlich verbessertes Nebenwirkungsspektrum zugunsten der Immuntherapie an. Schwere therapieassoziierte Vorfälle im Sinne einer Grad 3 oder 4, Nebenwirkung traten bei 7% Atezolizumab Kohorte auf. In der Chemotherapie Kohorte kam es zu 47% Grad 3 oder 4 Nebenwirkungen. Ein Abbruch der Therapie musste bei 17% der Chemotherapie Patienten und lediglich 3% der Immuntherapie Patienten durchgeführt werden. Das Therapieansprechen zeigte ein vergleichbares Ergebnis beider Gruppen mit 23% für die Immuntherapie- und 22% für die Chemotherapie Kohorte (Powles *et al.*, 2018).

Die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen schien in dieser Studie kein deutlicher Hinweis auf das Ansprechen der Therapie im Sinne eines prädiktiven Markers zu sein. Es zeigte sich, dass eine höhere PD-L1 Expression in allen Therapieformen sich günstiger auf das Langzeitüberleben und Therapieansprechen auswirkte. Die PD-L1 Expression stellt damit eher einen prognostischen Marker dar.

Durch die Zulassung der Immuntherapie in den letzten Jahren kommt es somit zu einer weiteren Verbesserung für bestimmte Patientengruppen. Jedoch profitieren nur ca. ein Drittel der Patienten von den neuen Substanzen. Aus diesem Grund ist die weitere Forschung und Entwicklung neuer Substanzen zur Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms unerlässlich.

### **3.3.1 Ausblick - Immuntherapie als Kombinationspartner**

Als erste Studie stellte die IMvigor 130 Studie, welche auf dem ESMO 2019 von Grande et. al. vorgestellt wurde, eine direkte Kombination einer Immuntherapie mit platinbasierter Chemotherapie dar. In dieser multizentrischen Studie wurden drei Kohorten miteinander verglichen. Eine Kohorte mit platinbasierte Therapie in Kombination mit Atezolizumab, eine mit Immuntherapie als Monotherapie, sowie eine weitere mit platinbasierter Therapie in Kombination mit einem Placebo (ESMO |Press | bladder, cancer, immunotherapy, invigor130, grande, 30.09.219). Im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben wurde die Kombinationskohorte aus Chemotherapie und Immuntherapie mit der Kohorte die Chemotherapie in Kombination mit einem Placebo erhalten hatte, verglichen. Es zeigte sich ein Unterschied von 8,2 Monaten gegenüber 6,3 Monaten zugunsten der Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie. Auch das mediane Gesamtüberleben deutete einen Trend zugunsten der Immunchemotherapie-Kombination (16,0 vs.13,4 Monate) an. Ein deutlicher Unterscheid bestand in der Rate der Komplettremissionen: diese traten in 13% der Fälle in der Kombinationskohorte auf, bei der Monotherapie mit Atezolizumab in 6% und in der Kombination aus platinbasierter Therapie mit einem Placebo in 7% (ESMO |Press | bladder, cancer, immunotherapy, invigor130, grande, 30.09.2019). Ein durch Nebenwirkung bedingter Therapieabbruch erfolgte in 34% der Fälle in beiden Kohorten, die Immuntherapie als Monotherapie zeigte dagegen nur 6% Therapieabbrüche (Tewari, 2019).

### **3.4 Zweitlinien Therapie**

Bei der Mehrzahl der Patienten tritt nach Abschluss der Erstlinientherapie erneut ein Krankheitsprogress nach unterschiedlichen Zeitintervallen auf. Liegt die Therapie mehr als sechs Monate zurück, kann bei guter Verträglichkeit die Erstlinientherapie wiederholt werden. (Possinger, Regierer and Eucker, 2017).

Ein direkter Vergleich aus Immuntherapie und Chemotherapie wurde in der randomisierten, multizentrischen Phase-3-Studie Keynote 045 untersucht. Verglichen wurden 270 Patienten mit einer Pembrolizumab Therapie und 272 Patienten mit konventioneller Mono-Chemotherapie (Vinflunin, Paclitaxel oder Docetaxel). Voraussetzung für eine Studienteilnahme war eine Platin basierte Vorbehandlung.

Die Studie erbrachte ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben der Pembrolizumab-Kohorte mit 10,3 verglichen mit 7,4 Monaten in der Chemotherapie-Kohorte. Auch die Ansprechraten zeigten sich mit 21,1% gegenüber 11% deutlich günstiger in der Pembrolizumab Gruppe. Das progressionsfreie Überleben war jedoch in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied. In dieser Studie hatte die PD-L1 Expression, keinen Einfluss auf das Ansprechen der Immuntherapie (Vaughn *et al.*, 2018).

Als weitere Therapieoption kann eine Chemotherapie mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Vinflunin angeboten werden. Vinflunin ist die einzige in Europa zugelassene Zweitlinienchemotherapie (Possinger, Regierer and Eucker, 2017). In einer Phase-III-Studie wurden Patienten nach cisplatinhaltiger Erstlinientherapie mit Best-Supportive-Care verglichen. Die Vinflunin Kohorte hatte hierbei ein signifikant verbessertes Gesamtüberleben mit 6,9 Monaten gegenüber 4,3 Monaten in der Best-Supportive-Care Kohorte (ITT-Population). Komplette Remissionen konnten jedoch hier nicht erzielt werden (Bellmunt *et al.*, 2009).

Auch eine Monotherapie mit Taxanen, Gemcitabin oder Ifosphamid ist ggf. denkbar (Possinger, Regierer and Eucker, 2017).

## 4. Frondoside A

Frondoside A (FrA) ist eine marine Substanz, welche aus der Seegurke „*Cucumaria okhotensis*“ gewonnen wird. Seit langem werden Seegurken im asiatischen Raum als Lebensmittel oder in der traditionellen Medizin genutzt, da sie als sehr nahrhaft gelten und eine gesundheitlich fördernde Wirkung vermutet wird (Shahinozzaman *et al.*, 2018). In verschiedenen Tumorentitäten konnte nun das anti-karzinogene Potenzial von FrA belegt werden. So wurde in Pankreaskarzinomzellen eine Hemmung des Zellwachstums sowie eine Induktion von Apoptose beobachtet (Al Shemaïli *et al.*, 2014). Auch in anderen Entitäten, wie Prostatakarzinomen und Bronchialkarzinomen wurden vielversprechende Ergebnisse mit FrA erzielt (Dyshlovoy *et al.*, 2016), (Attoub *et al.*, 2013). Weiterhin zeigte FrA neben dem eigenen anti-karzinogenen Potenzial auch die Fähigkeit die krebshemmenden Effekte der klassischen Zytostatika zu verstärken (Attoub *et al.*, 2013). In Maus-Modellen zeigte FrA keine signifikanten hämatotoxischen, hepatischen oder renale Nebenwirkungen, im Gegensatz zu etablierten Medikamenten, welche oft mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen. Ein signifikanter Verlust an Körpergewicht konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Somit dürfte FrA ein deutliches besseres Nebenwirkungsprofil als die klassische Chemotherapie haben (Dyshlovoy *et al.*, 2016; Adrian and Collin, 2018).



## 5. Das p53-Gen

Für die Prognose und das Ansprechen der Therapie des Urothelkarzinoms, ist die Wildtyp-Beschaffenheit, des p53-Gens relevant. Das p53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 lokalisiert und kodiert ein 375 Aminosäuren langes nukleäres Phosphoprotein mit der Aufgabe, die Vermehrung von genetisch veränderten Zellen zu verhindern (Yang *et al.*, 2013). Als Tumorsuppressorprotein überwacht p53 die Intaktheit der menschlichen DNA. Bei Schäden kommt es zu einem durch das p53-Protein blockierten Ende des Zellzyklus. Die Zelle geht in die Apoptose über, sofern der Schaden nicht durch DNA-Reparatursysteme behoben werden kann. Ist das p53-Gen defekt, erhöht sich durch die ausbleibende Apoptoseeinleitung die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die geschädigten Zellen vermehren und weiter entarten (J Rassow *et al.*, 2008). Bei bis zu 50% der Tumorerkrankungen können u.a. Mutationen des p53-Gens nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 2003), (Joachim Rassow *et al.*, 2008). Eine Veränderung des p53-Genstatus kann sich auf das Behandlungsergebnis der Erkrankung auswirken und für Patienten mit einer solchen Mutation zu einer schlechteren Prognose führen. Zurückzuführen ist dies zum Teil auf eine geringere Anfälligkeit solcher veränderten Zellen in die Apoptose überzugehen (Tandon *et al.*, 2010). Insbesondere im späten, häufig invasiven Stadium, können die Tumorzellen nur das mutierte p53-Protein exprimieren. Diese Zellen zeichnen sich vermehrt durch hohe metastatische und vor allem chemotherapieresistente Eigenschaften aus (Parrales and Iwakuma, 2015). Auch beim Urothelkarzinom wird eine Mutation im p53-Gen im Zusammenhang mit einer Tumorprogression, verminderter Chemotherapiesensitivität sowie einer insgesamt schlechteren Prognose gesehen. Die nukleare Akkumulation des p53-Proteins wird beim invasiven Urothelkarzinom mit einer hohen Mutationslast und damit einem schlechten klinischen Verlauf der Erkrankung in Verbindung gebracht. (George *et al.*, 2007).

## 6. Autophagie und Chemotherapieresistenz

Autophagie als zellulärer Abbaupfad, führt zur Beseitigung von beschädigten Proteinen sowie Zellorganellen. Bei diesem katabolen Prozess werden die zellulären Proteine und Organellen von Autophagosomen aufgenommen, um im nächsten Schritt von Lysosomen verdaut und recycelt zu werden. Das Recycling dieses intrazellulären Materials soll dem Organismus als weitere Energiequelle in Zeiten von metabolischem Stress dienen (Mathew, Karantza-Wadsworth and White, 2007); (Yang *et al.*, 2011).

Im Urothelkarzinom wurde die pro-survival Autophagie als einer der Hauptmechanismen für der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika identifiziert (Mathew, Karantza-Wadsworth and White, 2007; Sui *et al.*, 2013; Ojha, Shrawan K Singh, *et al.*, 2014). Urothelkarzinomzellen können den Mechanismus der Autophagie als Reaktion auf zellulären Stress oder auch bei erhöhten metabolischen Anforderungen, wie eine schnelle Zellproliferation, aktivieren. Eine zytotoxische Therapie kann Auslöser zellulären Stress sein. Durch die Autophagie bedingte Stresstoleranz kann das Zellüberleben durch konstante Energieversorgung gesichert und sowohl Tumorwachstum als auch therapeutische Resistenz begünstigt werden (Yang *et al.*, 2011).

## 7. Fragestellung

In den letzten Jahren haben sich mit der Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren neue Möglichkeiten in der Erst- und Zweitlinientherapie ergeben. Nicht jeder Patient profitiert jedoch von der neuen Therapie. So zeigen ca. zweidrittel der Immuntherapie-behandelten Patienten kein Ansprechen (Kobold *et al.*, 2015). Neue Substanzen können die Therapie weiter verbessern und über bisher nicht genutzte pharmakologische Wege eine höhere Ansprechrate der Patienten erreichen. In dieser Arbeit sollte dieses Potenzial der marinen Substanz FrA als neue Behandlungsoption für das fortgeschrittene Urothelkarzinom getestet werden. Insbesondere stellte sich die Frage nach der Effektivität der Substanz im Vergleich zur aktuellen Standardtherapie mit Cisplatin. Molekulare Wirkmechanismen der Substanz sollten *in vitro* werden analysiert. Durch die Kombination aus FrA mit Standardtherapien sollten mögliche Synergien zur Verbesserung der antikanzerogenen Wirkung beleuchtet werden. Der Einfluss des p53-Status sollte ebenfalls bestimmt werden (George *et al.*, 2007).

## 8. Material und Methoden

### 8.1 Substanzen

Die Zytostatika und Reagenzien, welche in den Experimenten dieser Arbeit genutzt wurden, werden im Folgenden genannt. Cisplatin (cis-Diamminedichloroplatin (II), 1 mg/ml), Gemcitabin und Anisomycin wurden der Firma NeoCorp (Weilheim, Deutschland) erworben; z-VAD(OMe)-fmk von Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA); MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Reagenz, Propidiumjodid (PI) und Chloroquin von Sigma (Taufkirchen, Deutschland); Annexin-V-FITC von BD Bioscience (San Jose, CA, USA); SP600125 sowie Bafilomycin A1 von LC Laboratories (Woburn, MA, USA).

FrA, das marine Triterpenglykosid, wurde aus der Seegurke *Cucumaria okhotensis* isoliert. Die Reinheit der einzelnen Verbindungen wurde durch HPLC-, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie überprüft. Hergestellt wurde FrA von Dr. Vladimir Kalinin, Dr. Alexandra Silchenko und Dr. Sergey Avilov und im Rahmen einer Kooperation mit dem „Laboratory of Marine Natural Products Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry“ in Wladiwostok freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 8.2 Urothelkarzinomzelllinien

Im Rahmen der Dissertation kamen sechs verschiedene humane Urothelkarzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status zum Einsatz. Die humanen Urothelkarzinomzelllinien RT-4 (p53 Wildtyp), HT-1197 (p53 Wildtyp), TCC-SUP (mutiertes p53), T-24 (mutiertes p53) wurden von ATCC (Manassas, VA, USA) erworben. Die RT-112 (p53 Wildtyp) Zelllinie wurde von DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Urothelkarzinomzelllinie 486p, mit unbekanntem Mutationsstatus, wurden freundlicherweise von der urologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine von Elliott et al. generierte Zelllinie, die als Grad IV Neoplasie der Blase mit Metastasierung in einem supraklavikulären Lymphknoten beschrieben wurde (Elliott *et al.*, 1977).

### **8.3 Zellkultur**

Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und für eine maximale Zeit von drei Monaten kontinuierlich in Kultur gehalten. Sie wurden routinemäßig mikroskopisch auf einen stabilen Phänotyp und regelmäßig auf Kontamination durch Mykoplasmen untersucht.

RT112, RT4, TCC(sup), T-24 und 486p Zellen wurden in 10% FBS/RPMI Medium (RPMI Medium ergänzt mit Glutamax<sup>TM</sup>-I (Invitrogen, Paisley, UK) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS, Invitrogen) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)) kultiviert. HT-1197-Zellen wurden in 10% FBS/DMEM-Medium kultiviert (RPMI-Medium ergänzt durch Glutamax<sup>TM</sup>-I mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat (Invitrogen)). HT-1197-Zellen wurden in 10% FBS/DMEM-Medium (DMEM-Medium ergänzt mit Glutamax<sup>TM</sup>-I (Invitrogen) mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)) kultiviert.

### **8.4 Trypanblau-basierte Bestimmung der Toxizität**

Die Trypanblau-Methode mit dem Beckman-Schar Vi-CELL (Beckman-Schar, Krefeld, Deutschland) diente der Bestimmung der Zellwachstumshemmung. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Urothelkarzinomzellen pro Well in insgesamt vier 6-Well-Platten gesät und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde durch frisches Medium ersetzt, das FrA in Konzentrationen von 0,03125µM, 0,0625µM, 0,125µM, 0,25µM, 0,5µM, 1,0µM, sowie 2,0µM in einem Gesamtvolumen von 2mL/Well enthielt. Die Zellen wurden anschließend für 48h inkubiert und anschließend mit 0,5mL PBS gewaschen. Um die Zellen aus dem Well zu lösen wurden sie mit 0,5mL Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen) trypsiniert. Die Anzahl der lebensfähigen (Trypanblau ausgenommen) sowie nicht lebensfähigen Zellen im Medium wurden mit dem Beckman Coulter Vi-CELL ausgewertet. Hierbei wurden Trypanblau-positive und Trypanblau-negative Zellen gezählt. Je Konzentration wurden Triplikate angefertigt und analysiert. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test verwendet.

## **8.5 Bestimmung der Wirkung zwischen Zytostatika**

Die Verstärkung der Toxizität in Kombination miteinander, gegenüber Urothelkarzinomzellen in vitro, sollte in diesem Experiment ermittelt werden. Zur Bestimmung der Beziehung zwischen den verschiedenen Zytostatika wurde die Chou-Talalay-Methode zur Hilfe genommen. Der hierbei ermittelte Kombinationsindex (CI) erlaubt eine Aussage über die Wirkung der Substanzen zueinander. Als eine Definition für die additive Wirkung in den zu untersuchenden Arzneimittelkombinationen wurde  $CI = 1$  ermittelt. Als Synergismus wurde  $CI < 1$ , als Antagonismus  $CI > 1$  festgelegt. (Ashton, 2015). Der CI wurde mit dem CompuSyn v.1.0 berechnet. Software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA). Die betroffene Fraktion (Fa) ist definiert als die nicht überlebensfähige Fraktion bei einer bestimmten Dosis von Verbindungen oder deren Kombinationen. Ein Synergismus ist bei der genutzten Software definiert als ein  $CI < 0,85$ , ein Antagonismus  $CI > 1,2$ . Ein CI von 0,85 bis 1,2 gilt als additive Wirkung.

## **8.6 Annexin-V-FITC/Propidiumiodid-Doppelfärbung zum Nachweis von apoptotischen Zellen**

Zum Nachweis der Apoptose wurde die FACS-Analyse genutzt. Üblicherweise findet sich Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran der lebenden Zellen. Kommt es jedoch zur Apoptose, transloziert Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran. Durch die abschließende Bindung von Annexin V an das Phosphatidylserin werden die apoptotischen Zellen im FACS nachweisbar. Zur anschließenden Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wird die Annexin V Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung kombiniert. In nekrotische Zellen mit einer durchlässigen Membran, kann das Propidiumiodid eindringen, apoptotische Zellen dagegen sind nicht permeabel für Propidiumiodid.

Für das Experiment wurden 6 Well-Platten verwendet und mit  $0,2 \times 10^6$  Zellen der RT-112 Urothelkarzinomzelllinie je Well befüllt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen schließlich mit verschiedenen Konzentrationen an FrA sowie Anisomycin als Positivkontrolle behandelt.

Zusätzlich wurde in die Hälfte der Wells zu dem behandelten Medium der Caspasehemmer zVAD in einer Konzentration von 100  $\mu$ M hinzugegeben. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden erfolgte nach Entfernung des behandelten Mediums und Waschen der Zellen mit PBS, die Behandlung der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung. Die gelösten Zellen wurden mit 0,1 ml Annexin-V-FLUOS und PI-haltiger Markierung inkubiert und für 15 Minuten in dunkler Umgebung bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit der FACS Calibur (BD Bioscience) und BD Bioscience Cell Quest Pro Software (BD Bioscience).

## **8.7 Western-Blot**

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden Western-Blot-Analysen genutzt. Zunächst wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in Petrischalen gesät und über Nacht in entsprechendem Medium inkubiert. Es erfolgte eine Behandlung mit FrA in verschiedenen Konzentrationen. Diese wurde für eine Dauer von 48 Stunden belassen. Nach entsprechender Behandlung wurden die Zellen lysiert, mit einem Zellscharber von der Petrischale entfernt und gewaschen. Die Lysate wurden im Anschluss über Nacht bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  in 10ml Tubes eingefroren. Am nächsten Tag wurde nach Zentrifugation die Proteinkonzentration im Überstand der Tubes nach dem Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). 20-30 $\mu$ g je Probe wurden schließlich einer Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen bei 120V unterzogen und im Anschluss vom Gel auf eine 0,2 $\mu$ m pore PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde blockiert und mit primären sowie sekundären Antikörpern gemäß deren Herstellerprotokollen inkubiert. Die entsprechenden Signale wurden mit dem ECL-Chemilumineszenzsystem (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll erfasst. Die untersuchten Proteine sowie die eingesetzten Konzentrationen sind in der unten stehenden Liste aufgeführt.

Antibodies	Clonality	Source	Cat.-No.	Used concentration	Manufacturer
anti- $\alpha$ -Tubulin	mAb	mouse	T5168	1:5000	Sigma-Aldrich
anti- $\beta$ -Actin-HRP	pAb	goat	sc-1616	1:10000	Santa Cruz
anti-Bad	mAb	rabbit	#9239	1:1000	Cell Signaling
anti-Bax	mAb	rabbit	#5023	1:1000	Cell Signaling
anti-Bcl-2	pAb	rabbit	#2876	1:1000	Cell Signaling
anti-cleaved Caspase-3	mAb	rabbit	#9664	1:1000	Cell Signaling
anti-ERK	mAb	mouse	#9107	1:2000	Cell Signaling
anti-JNK	mAb	rabbit	#9258	1:1000	Cell Signaling
anti-LC3B-I/II	pAb	rabbit	#2775	1:1000	Cell Signaling
anti-p21 <sup>Waf1/Cip1</sup>	mAb	rabbit	#2947	1:1000	Cell Signaling
anti-p38	mAb	rabbit	#9212	1:1000	Cell Signaling
anti-PAK1	pAb	rabbit	#2602	1:1000	Cell Signaling
anti-PARP	pAb	rabbit	#9542	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-ERK	mAb	rabbit	#4377	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-JNK	mAb	rabbit	#4668	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-p38	mAb	rabbit	#4511	1:1000	Cell Signaling
anti-SQSTM/p62	pAb	rabbit	#5114	1:1000	Cell Signaling
anti-Survivin	pAb	rabbit	NB500-201	1:1000	Novus
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488		goat	#4412	1:1000	Cell Signaling
anti-goat IgG-HRP		rabbit	#31433	1:10000	Thermo Scientific
anti-mouse IgG-HRP		sheep	NXA931	1:10000	GE Healthcare
anti-rabbit IgG-HRP		goat	#7074	1:5000	Cell Signaling

## 8.8 „Silencing“ des p53-Proteins durch siRNA-Transfektion

Das Ausschalten des p53-Proteins erfolgte durch die siRNA-Transfektionstechnik mit Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Transfektionsreagenz (Invitrogen, UK). Die RT-112 Zellen wurden über Nacht in 6 Well-Platten zu je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 2ml in RPMI-Medium vorinkubiert. Im Folgenden wurden zwei Lösungen vorbereitet: Lösung A: 20 $\mu$ l von 100 pmol/ $\mu$ l siRNA (Gesamtmenge 2nmol) + 230 $\mu$ l von Opti-MEM Medien. Lösung B: 7.5 $\mu$ l von Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Transfektionsreagenz + 242.5 $\mu$ l von Opti-MEM Medien. Mit beiden Lösungen wurde für je fünf Minuten inkubiert, gemischt und erneut 20 Minuten inkubiert. Das alte Medium in den Wells wurde mit 2ml frischem RPMI-Medium erneuert und 0,5ml beider Lösungen wurden jedem Well hinzugefügt. Nach 72h Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen gewaschen. Die Wells wurden daraufhin mit frischem RPMI-



Medium befüllt. Im Anschluss wurden die Zellen entweder für die Western-Blot Analyse gesammelt oder für weitere 48h zur FACS Analyse inkubiert. Die Duplexed siRNA wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) erworben. Das Ergebnis der Transfektion wurde mit Western-Blot überprüft.

## 9. Ergebnisse

### 9.1 Bestimmungen der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50)

Zu Beginn der Experimente wählten wir sechs humane Urothelkarzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status aus. Um einen Eindruck über das zytotoxische Potenzial von FrA zu erlangen, ermittelten wir die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanz in den jeweiligen Zelllinien. Für das Standardchemotherapeutikum Cisplatin (CIS) wurden ebenfalls die IC<sub>50</sub>-Werte in den verschiedenen Zelllinien ermittelt. Das Ziel dieses Vergleiches war es, die zytotoxische Wirkung von FrA im Vergleich zur Standardchemotherapie zu bestimmen. In der unten stehenden Grafik sind die Ergebnisse der verschiedenen IC<sub>50</sub>-Werte dargestellt.

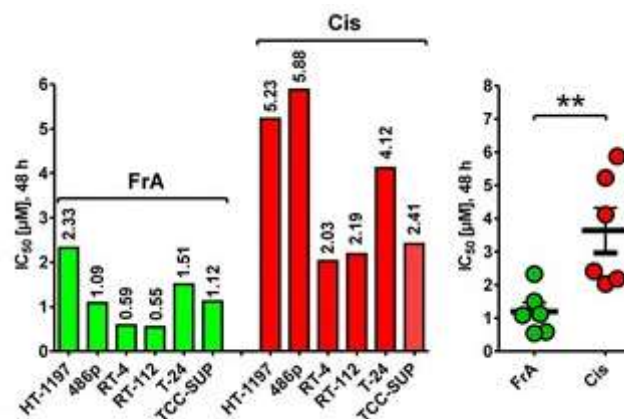


Abbildung 1: Die unterschiedlichen Urothelkarzinomzelllinien mit entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber den Substanzen.

In der Grafik ist zu erkennen, dass FrA eine signifikant höhere Toxizität gegenüber Cisplatin in allen untersuchten Urothelkarzinomzelllinien aufweist, unabhängig vom p53-Status. Die IC<sub>50</sub> Konzentrationen von FrA lagen zwischen 0,55µM und 2,33µM, von Cisplatin als Referenzzytostatikum dagegen zwischen 2,03µM und 5,88µM. Eine erhöhte Sensitivität von FrA im Vergleich zur üblichen Chemotherapie konnte somit mit der Trypan-blue-Methode nachgewiesen werden. Da die Zelllinie RT-112 eine besonders günstige Sensitivität mit einer IC<sub>50</sub> von 0,55 µM aufwies, wählten wir diese Zelllinie für weitere Experimente aus.

## 9.2 Synergistische Effekte der Zytostatika

Die Auswirkung einer FrA-Kombination auf die Effektivität der Standardchemotherapie wurde mit der Chou-Talalay-Methode überprüft. Hierzu kombinierten wir jeweils Cisplatin (CIS) und Gemcitabin (Gem) in verschiedenen Konzentrationen, höher sowie niedriger als die ermittelte IC50 der jeweiligen Substanz mit FrA.

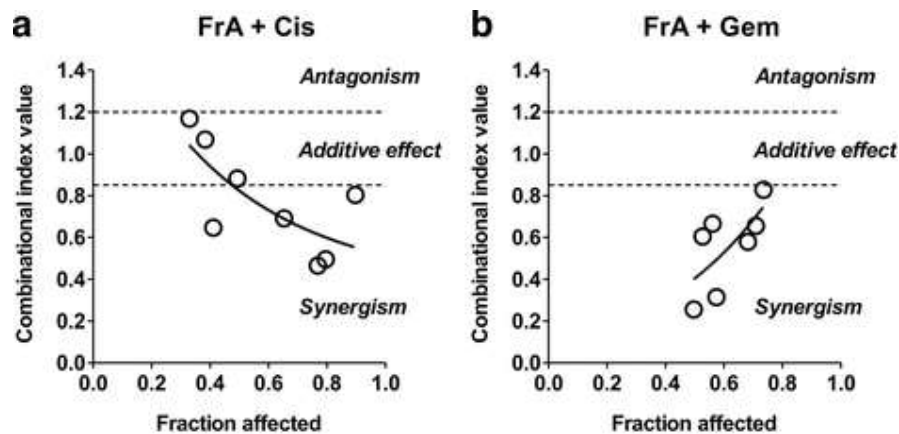


Abbildung 2: Wirkung von FrA in Kombination mit Cisplatin und Gemcitabin bei einer Behandlung von 48h. Behandelt wurden die RT-112 Urothelkarzinomzellen mit Molverhältnissen von  $C(\text{FrA}):C(\text{Cis}) = 1:4$  (a) und  $C(\text{FrA}):C(\text{Gem}) = 1:0,25$  (b).

Die ermittelten Werte für die Kombination aus FrA mit Cisplatin, zeigten bereits in geringen Konzentrationen einen additiven Effekt. In höheren Konzentrationen, ab der IC 50 von FrA, zeigten sich synergistische Effekte zwischen beiden Substanzen. Noch positiver war die Kombination mit Gemcitabin, hier traten bereits in sehr geringen Konzentrationen stark synergistische Effekte auf.

## 9.3 FrA induzierte Apoptose in RT-112 Urothelkarzinomzellen

Verschiedene zytotoxische Substanzen in der üblichen Krebstherapie wirken über Caspasen sowie über p53 vermittelte Kaskaden des Zelluntergangs. Diese Prozesse können insbesondere, jedoch auch beim Urothelkarzinom, verändert und damit nicht funktionsfähig sein. Folge ist

eine verminderte Empfindlichkeit der Krebszellen, bis hin zur Chemotherapieresistenz (Philchenkov, Zavelevich, *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden die Signalwege des FrA induzierten Zelluntergangs untersucht.

FrA zeigte bereits in anderen Karzinomentitäten, dass es die Einleitung der Apoptose begünstigen kann. Dies wurde auch in RT-112 Urothelkarzinomzellen überprüft (Attoub *et al.*, 2013; Adrian and Collin, 2018).

### 9.3.1 Caspase-induzierte Apoptose

Caspasen zählen zu den Proteasen und sind Hauptmediatoren der Apoptose (Joachim Rassow *et al.*, 2008). Sie können in zwei verschiedene Hauptgruppen unterteilt werden, die Initiator-Caspasen und die Effektor-Caspasen. Die Initiator-Caspasen, mit ihren Vertretern Caspase 2, 3, 8 und 9 steuern den Anfang der Signalkaskade, wobei die Effektor-Caspasen (3, 6 und 7) durch eine proteolytische Spaltung ihrer Substrate zum Zelltod führen (J Rassow *et al.*, 2008).

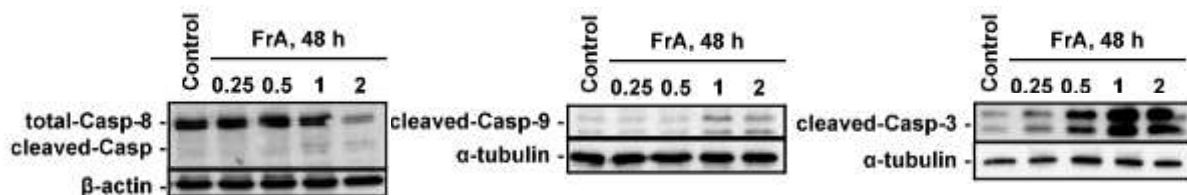


Abbildung 3: Western-Blot der Caspase-Proteine 8,9, und 3 als Zeichen der Caspase vermittelten Apoptose

Die Grafik zeigt eine dosisabhängige Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 3 in RT-112 Urothelkarzinomzellen. Dieses Western-Blot Experiment ergab Hinweise auf eine extrinsische Apoptose-Kaskade mit den Caspasen 8 und 9, sowie ebenfalls über die intrinsische Apoptose-Kaskade durch die Caspase 3 (J Rassow *et al.*, 2008).

### 9.3.2 Caspase unabhängige Apoptose

Die Apoptose wird häufig mit dem Vorhandensein funktionsfähiger Caspasen assoziiert (Kroemer and Martin, 2005). Jedoch wurden in den letzten Jahren ebenfalls vermehrt Signalkaskaden einer Caspase unabhängigen Apoptose identifiziert. Für verschiedene Onkogene konnte die Einleitung einer Signalkaskade, welche zum programmierten Zelltod führt, nachgewiesen werden. Das c-Myc Onkogen kann nachweislich über Caspase abhängige, als auch Caspase unabhängige Wege eine Apoptose auslösen, wohingegen das Ras-Onkogen das Vorliegen von Caspasen nicht benötigt und vollständig Caspase unabhängig zur Apoptose führt (Broker, Kruyt and Giaccone, 2005). Neben den Onkogenen ist auch für den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF), eine mitochondriale Oxidoreduktase, ein Zusammenhang einer Caspase unabhängigen Apoptose beschrieben (Bano and Prehn, 2018). Die Mitochondrien, als Quelle von proapoptischen Schlüssel molekülen, sind an der Caspase-Aktivierung beteiligt. Die Mitochondrien können jedoch ebenfalls als Reaktion auf apoptotische Stimuli auch Caspase unabhängige Zelltod-Effektoren wie AIF und Endonuklease G freisetzen (Cregan, Dawson and Slack, 2004).

Anisomycin, als bekannter Induktor der caspaseabhängigen Apoptose (Seo *et al.*, 2013), diente in diesem Experiment als Positivkontrolle des Apoptose bedingten Zelluntergangs. Die Caspase-Proteine, als Hauptmediatoren der Apoptose (Joachim Rassow *et al.*, 2008), wurden mit dem Caspase-Inhibitor zVAD effektiv geblockt.

In der unten dargestellten Grafik sind, neben der Kontrollgruppe, die Ergebnisse für FrA bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  sowie für Anisomycin für  $4\mu\text{M}$  abgebildet. Deutlich zu erkennen ist der Zelluntergang durch Apoptose in der linken Spalte der Abbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt zeigte sich verstärkt in der Anisomycin Gruppe gegenüber FrA und der Kontrollgruppe. Die rechte Spalte der Grafik stellt die gleiche Konzentration nach Zugabe von zVAD dar. Unter Anisomycinbehandlung ging die Zahl der apoptotischen Zellen erwartungsgemäß deutlich zurück. Die FrA Gruppe zeigte nach Hinzugabe des Caspaseinhibitors eine nur geringfügige Änderung der apoptotischen Zellen in der rechten Spalte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass FrA eine caspaseunabhängige Apoptose auslöst.

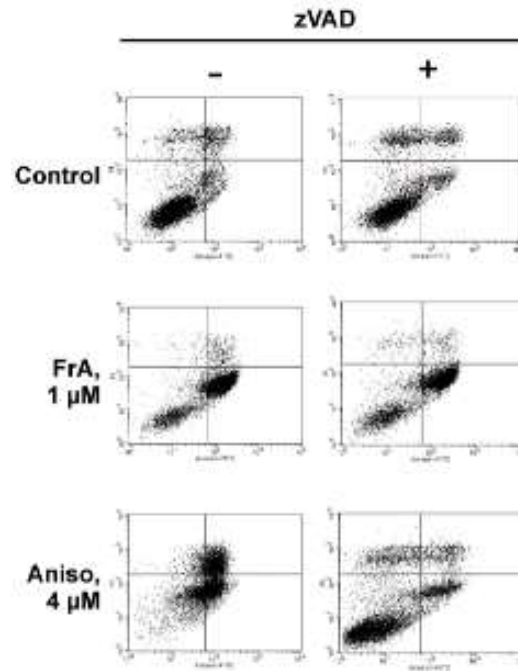


Abbildung 4: Die Lebensfähigkeit von transfizierten Zellen, die mit FrA 24h behandelt wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie mit Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung analysiert. Lebensfähige Zellen im unteren linken Quadranten wurden mit der Software Cell Quest Pro quantifiziert.

Zur vereinfachten Visualisierung zeigt die untere Grafik das Ergebnis der Durchflusszytometrie mit Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung im Balkendiagramm. Wie zu erkennen ist, wird die apoptotische Zellrate mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD bei der mit FrA behandelten Zellen nicht vermindert.

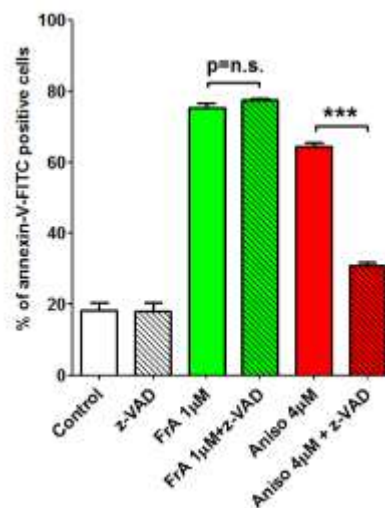


Abbildung 5: Durchflusszytometrie von RT-112-Urothelkarzinomzellen, behandelt mit FrA sowie Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung

Erwartungsgemäß ließ sich die Anisomycin-induzierte Apoptose durch den Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD hemmen (rot markierte Balken). In der mit FrA behandelten Gruppe (grün markiert) zeigte sich dagegen kein Unterschied der Zelluntergangsrate durch Apoptose, eine Hemmung durch z-VAD blieb hier weitestgehend aus. Hieraus ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Inhibition mit z-VAD keinen Einfluss auf die Aktivität von FrA hat und FrA in der Lage ist eine Caspase unabhängige Apoptose in den Urothelkarzinomzellen zu induzieren. Die Aktivierung der Caspase-Proteine kann als ein weiterer Apoptose-Pfad interpretiert werden, womit FrA über verschiedene Signalkaskaden Apoptose auslösen könnte.

#### 9.4 Silencing des p53-Gen durch siRNA

Mutationen im p53-Gen können die Entstehung einer Vielzahl von Neoplasien begünstigen, wenn die Funktion als „Wächter des Genoms“ nicht mehr korrekt ausgeführt werden kann. Bei der untersuchten Zelllinie RT-112 liegt jedoch ein Wildtyp p53 und damit ein unmutiertes Gen vor (Bamford *et al.*, 2004). Um den Effekt von FrA auf die mutierte Zelllinie zu simulieren, wurde das p53-Gen in seiner Funktion ausgeschaltet.

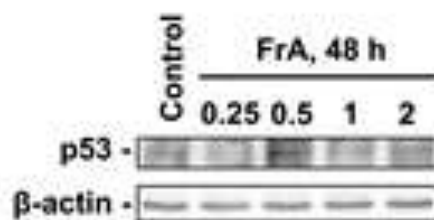


Abbildung 6: Western-Blotting-Analyse der p53-Expression in RT112-Zellen

Die obere Grafik zeigt die Beständigkeit des P53-Proteins, welche sich unabhängig von der applizierten Dosis von FrA darstellt. Der Gesamtwert des p53-Proteins wird in den RT-112 Zellen demnach von FrA nicht verändert. Im nächsten Schritt des Experiments sollte mittels siRNA die Expression des p53-Proteins weitestgehend ausgeschaltet werden. Eine erneute Western-Blot-Analyse als Erfolgskontrolle mit siRNA behandelten Zellen, zeigt wie in der unteren Grafik dargestellt, eine deutliche Reduktion der p53-Expression.

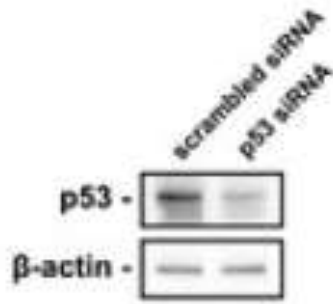


Abbildung 7: Western-Blotting–Analyse der RT-112 Zellen behandelt mit siRNA

Die folgende Grafik zeigt die RT-112 Zellen nach Behandlung mit FrA und Cisplatin. Zu erkennen ist, dass FrA und Cisplatin im Wildtyp, also unbehandelten Zellen, beide zytotoxisch signifikante Reaktionen aufweisen. In den mit siRNA behandelten Zellen, den Zellen mit verringerter p53 Expression, sind signifikant mehr vitale Urothelkarzinomzellen bei der Behandlung mit Cisplatin vorhanden. In der mit FrA behandelten Gruppe zeigte sich, auch bei verminderter p53-Expression, ein weiterhin deutlich vorhandenes zytotoxisches Potenzial der Substanz. Der p53-Status hat demnach einen nachweisbaren Einfluss auf das Therapieansprechen mit Cisplatin. Dies ist nicht der Fall für FrA, es kann seine zytotoxische Wirkung unabhängig von p53 entfalten.

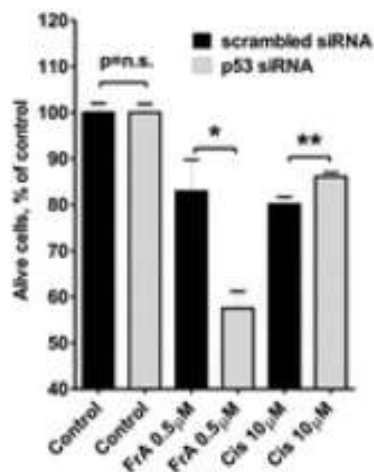


Abbildung 8: Transfizierte Zellen, welche mit FrA oder CIS für 48 Stunden behandelt worden sind. Die lebenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung analysiert.



Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Inhibition des p53-Gens durch Pifithrin- $\alpha$ . Durch das Pifithrin- $\alpha$  wird die Aktivität des p53-Gen effektiv gehemmt und konnte über diesen Mechanismus als weiteren Ansatz des Experimentes genutzt werden. In der unten stehenden Grafik ist deutlich nachzuvollziehen, dass die Zytotoxizität von Cisplatin unterdrückt wurde, wobei FrA weiterhin seine zytotoxische Wirkung entfalten konnte. Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass die Effektivität von FrA unabhängig von der p53-Funktion der Urothelkarzinomzellen ist.

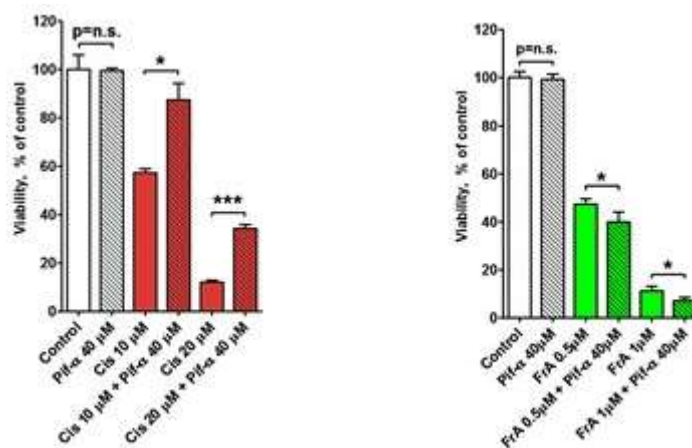


Abbildung 9: Wirkung von Pifithrin- $\alpha$  auf die zytotoxische Aktivität von FrA und CIS. Die Zellen wurden mit 40  $\mu$ M von Pif- $\alpha$  für 30min vorbehandelt und dann mit CIS oder FrA für 48h behandelt. Die Zellebensfähigkeit wurde mit MTT-Test bestimmt.

## 9.5 Autophagie in Urothelkarzinomzellen

LC3B, mit ihren Isoformen LC3B-I und LC3B-II und p62-Proteine, werden als Haupteffektoren des Prozesses der pro-survival Autophagie aufgefasst und daher als Marker zur Messung von Autophagieveränderung verwendet (Klionsky *et al.*, 2016). Durch den Prozess der Autophagie wandelt sich LC3-I zu LC3-II um, dieser Schritt ist für die Bildung der Autophagosomenmembran erforderlich. Das p62, als Autophagosomenladungsprotein, bindet andere Proteine für die selektive Autophagie (Klionsky *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnten wir aufzeigen, dass FrA sowohl eine zeit- als auch eine dosisabhängige Akkumulation dieser autophagischen Proteine induziert. Als Positivkontrollen dienten die bekannten Autophagiehemmer Bafilomycin A1 (BafA1) und Chloroquin (CQ) (Redmann *et al.*, 2017).

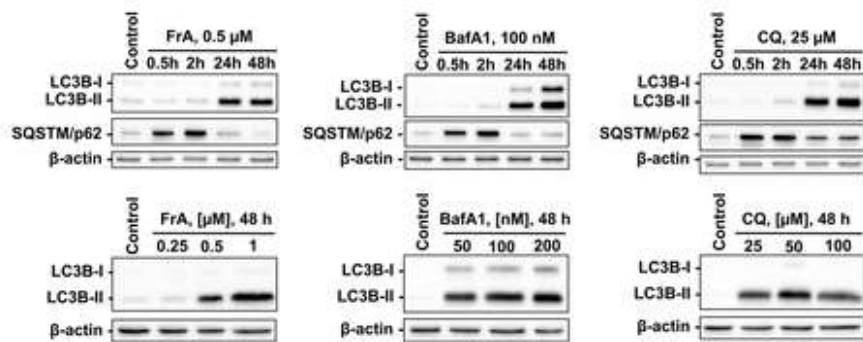


Abbildung 10: Mit FrA behandelte Zellen zeigen eine zeit- und dosisabhängige Hemmung der Autophagie. Bafilomycin A1 (BafA1) und Chloroquin (CQ) als bekannte Autophagiehemmer dienen als Positivkontrolle.

In der Grafik ist zu erkennen, dass der maximale Proteinspiegel des p62 nach 2h, der maximale Spiegel beim LC3B-II-Wert jedoch erst nach 48h erreicht wurde. Die Positivkontrollen Bafilomycin A1 und Chloroquin zeigten ein vergleichbares Bild, wodurch die Wirkung von FrA als Hemmung der pro-survival Autophagie bestätigt werden konnte.

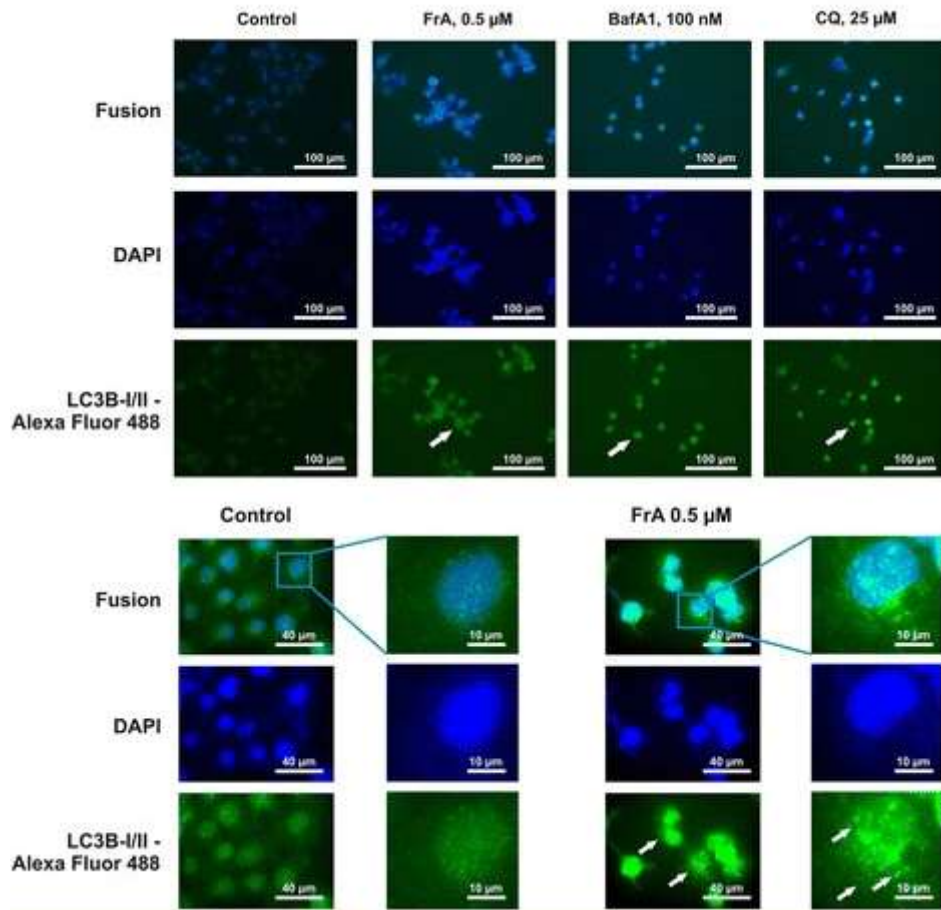


Abbildung 11: Die Zellen wurden mit FrA, BafA1, sowie CQ für 48h behandelt und mit dem Anti-LC3B-I/II-Antikörper inkubiert, gefolgt von der Behandlung mit Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von  $\times 400$  oder  $\times 1000$  aufgenommen. LC3B-I/II-positive Organellen (Autophagosomen/Autolysosomen), die als Punkte erscheinen, werden durch Pfeile angezeigt.

In einem weiteren Versuch wurde mittels Immunzytochemie die behandlungsinduzierte Akkumulation von Autophagosomen sichtbar gemacht. Hierzu behandelten wir RT-112 Zellen mit FrA und den Autophagiehemmern Bafilomycin A1 und Chloroquin. Die Bildung von Autophagosomen ist mit einem Pfeil auf der Grafik nachzuvollziehen und zeigt demnach eine behandlungsinduzierte Akkumulation. Da sich in beiden Versuchen ein vergleichbares Bild, wie bei den bekannten Autophagiehemmern Bafilomycin A1 und Chloroquin zeigte, ist auch bei den mit FrA behandelten Zellen, von einer Hemmung der Autophagie auszugehen.

## 9.6 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) in der RT112 Zelllinie

Die MAP-Kinasen lassen sich in drei verschiedene Gruppen einteilen, die ERK-Gruppen, JNK-Gruppen sowie einer Untergruppe der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen. Sie alle werden innerhalb von Proteinkinasekaskaden aktiviert, welche sowohl die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung als auch die Apoptose bzw. den Zelluntergang regulieren (Morrison, 2012). Sie können demnach sowohl pro-apoptotische als auch proliferative Funktionen in der untersuchten Urothelkarzinomzelllinie ausführen (Otto, Acharya and Robinson, 2012; Grieco *et al.*, 2013). Aus diesem Grund untersuchten wir in dieser Arbeit auch den Einfluss von FrA auf die MAP-Kinasen in RT112-Zellen.

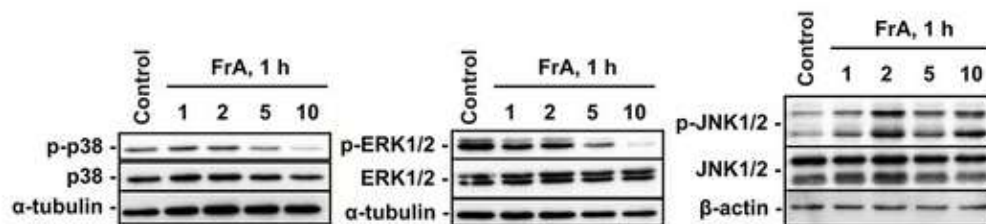


Abbildung 12: Die RT112-Zellen wurden für 1h mit FrA behandelt und anschließend wurde die Aktivierung von p-ERK 1/2, p-p38 sowie p-JNK 1/2 nach 1h durch Western-blotting analysiert.

Wie in der Grafik zu sehen, führt FrA zu einer Suppression von p38 und von ERK1/2 bei Konzentrationen von FrA ab  $\geq 5\mu\text{M}$ , gleichzeitig wird JNK1/2 jedoch aktiviert. Die Behandlung erfolgte in der oberen Grafik über eine Dauer von einer Stunde, die Aktivierung von JNK1/2 zeigte sich ebenfalls in einem weiteren Versuch mit einer Behandlungsdauer von 48 Stunden.

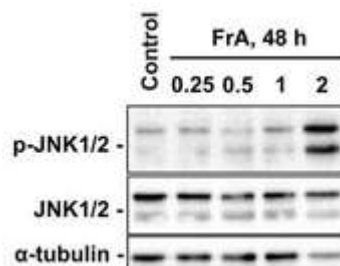


Abbildung 13: Die RT112-Zellen wurden für 48h mit FrA behandelt und anschließend wurde die Aktivierung von p-JNK1/2 nach 48h durch Western-blotting analysiert.

Um die Rolle der FrA vermittelten JNK1/2-Aktivierung weiter zu analysieren, untersuchten wir die Wirkung des JNK1/2-Inhibitors SP600125 in Kombination mit FrA.

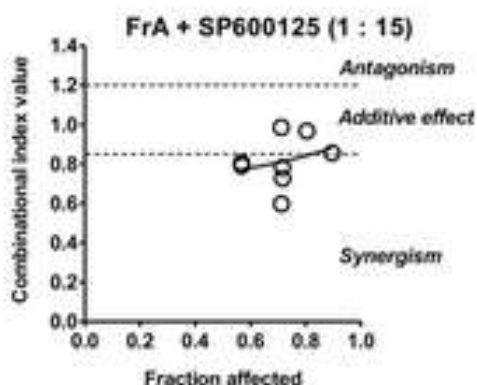


Abbildung 14: Wirkung des JNK1/2-Inhibitors SP600125 auf RT112-Zellen, welche mit FrA für 48h behandelt wurden. Die Daten wurden mit Trypan-Blau-basierten Viabilitäts-Assays generiert und anschließend mit der Software CompuSyn v.1.0. berechnet.

Die Kombination aus dem Inhibitor in Verbindung mit FrA zeigte eindeutig synergistische Effekte im MTT basierten Chou-Talalay-Assay. Dies lässt auf eine pro-survival Funktion des JNK1/2 in den untersuchten RT112 Urothelkarzinomzellen schließen. Anders als die MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38 ist JNK1/2 in diesem Experiment demnach nicht an der Apoptose bzw. Zelluntergang, sondern der Proliferation der RT112 Zellen beteiligt (Pinal, Calleja and Morata, 2019). Durch die gezielte Blockade dieser pro-survival Funktion und den dadurch entstehenden dosisabhängigen Synergismus im geschilderten Experiment, konnte FrA somit stärker apoptotisch wirken.

## 10. Diskussion

Die cisplatinbasierte Therapie gilt weiterhin als Standardtherapie für die Erstlinientherapie von fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Urothelkarzinomen. Trotz anfänglich gutem Ansprechen, mit einem signifikantem Rückgang des Tumolvolumens, kommt es im Verlauf der Erkrankung häufig zu Rezidiven (Kim, 2012; Ojha, Shrawan K Singh, *et al.*, 2014; Massari *et al.*, 2015). Als Grund für die Rezidiventwicklung wurden verschiedene mögliche Faktoren, wie die Überexpression von ERCC1, Nrf2, CTR1/2, hENT1, BRCA1 sowie der Funktionsverlust des p53 Protein, oder auch die pro-survival Autophagie identifiziert (Ojha, Shrawan K Singh, *et al.*, 2014; Massari *et al.*, 2015).

FrA wies *in vitro* ein höheres zytotoxisches Potenzial als Cisplatin auf (Abb. 1.). Die zytotoxische Wirkung von FrA wurde unter anderem durch die Induktion der Apoptose ausgelöst (Abb. 3). Diese wird über verschiedene pro-apoptotische Signalwege, wie gesplante Caspasen-3, -8 und -9, gesplantes PARP, Bax und p21 vermittelt (siehe Anhang). Des Weiteren zeigte sich eine Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Eine Aktivierung von JNK kann je nach Zellart ein pro- oder auch antiapoptotisches Signal ausüben (LIU and LIN, 2005). In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass die Hemmung von JNK zu einem Anstieg der zytotoxischen Wirkung von FrA führte (Abb. 13). Daraus ist zu schließen, dass die Aktivierung von JNK in dieser Urothelzelllinie ein antiapoptotisches Signal ausübt und dadurch den Effekt der marinen Substanz antagonisieren könnte.

Synergistische Effekte zwischen den Substanzen wurden beobachtet, wenn die marine Substanz mit einer der üblichen Standardchemotherapien Cisplatin oder Gemcitabin bei RT112-Zellen kombiniert wurde (Abb. 2). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die Hemmung der pro-survival Autophagie durch FrA sein. Tatsächlich wurde die überlebensfördernde Autophagie in humanen Urothelkarzinomzelllinien als möglicher Resistenzmechanismus gegen Cisplatin identifiziert (Ojha, Shrawan K. Singh, *et al.*, 2014).

Die Mutation des p53 Protein und die damit bedingte verminderte tumorsuppressive Funktion wird mit einer schlechten Prognose bzw. einer erhöhten Tumorprogression assoziiert. Wie in vielen Tumorentitäten, sind auch bei über 60% der Urothelkarzinome p53-Mutation vorhanden (Berggren *et al.*, 2001); (George *et al.*, 2007). Zudem ist die caspaseabhängige Apoptose in humanen Karzinomzellen häufig gestört. Ursächlich ist eine Überexpression endogener

Caspaseinhibitoren sowie Mutationen in Genen, die für Caspasen kodieren (Philchenkov, Zavelich, *et al.*, 2004). Unter diesen Gesichtspunkten sind Wirkstoffe, welche unabhängig von Caspase- und p53-Aktivität Apoptose induzieren können, von größtem klinischem Interesse. Aus diesem Grund wurde das p53-Gen in zwei unterschiedlichen Ansätzen stillgelegt bzw. gehemmt. Es zeigte sich das FrA sowohl in Urothelzellen mit Wild-Typ p53 (RT112, RT4, HT-1197) als auch in p53-mutierten Zelllinien (T24 und TCC-Sup) aktiv ist. Bemerkenswert ist, dass die Aktivität von FrA sogar höher in p53-mutierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp war. Cisplatin, als Standardchemotherapie, zeigte sich sowohl beim gehemmten als auch im stillgelegten p53-Gen nicht nur als signifikant weniger effektiv als FrA, darüber hinaus ist auch ein Rückgang der zytotoxischen Aktivität zu erkennen. Die Abhängigkeit eines intakten p53-Gens für die Therapie mit Cisplatin wurde in diesem Experiment deutlich und zeigt hiermit einen möglichen Resistenzmechanismus des Urothelkarzinoms gegenüber Cisplatin auf. FrA hingegen benötigte die Anwesenheit bzw., Intaktheit des p53 nicht und ist somit für diese Art der Resistenz potenziell unempfindlich.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass FrA keine Caspaseaktivität zur Auslösung der Apoptose in humanen Urothelkarzinomzellen benötigt. Es zeigte sich zwar eine Hochregulierung verschiedener Caspaseproteine, jedoch gehen wir davon aus, dass es sich hierbei um ein sekundäres Geschehen handelt und der Zelltod Caspase-unabhängig ausgelöst wurde. (Erdal *et al.*, 2005). Der Weg des Caspase unabhängigen Zelluntergangs kann auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Der Zelluntergang kann beispielsweise durch eine vom Todesrezeptor induzierte Nekroptose oder die mitochondriale, lysosomale oder eine endoplasmatische Retikulumbelastung ausgeführt werden (Broker, Krut and Giaccone, 2005; Chipuk and Green, 2005; Kroemer and Martin, 2005). Anders als beim Weg über den Todesliganden, welcher das aktive Vorliegen eines solchen Liganden erfordert, werden die anderen Wege häufig von kleinen Molekülen ausgelöst. Diese Moleküle führen zu einer Schädigung der jeweiligen Zellstruktur (Broker, Krut and Giaccone, 2005; Tait and Green, 2008). So kann die mitochondriale Permeabilisierung der äußeren Membran (MOMP) die Freisetzung von HtrA2/Omi, Endonuklease G und AIF verursachen, während die lysosomale Membranpermeabilisierung (LMP) zur Freisetzung von Kathepsinen führt und das endoplasmatische Retikulum (ER) zur Kalziumfreisetzung. Dies führt wiederum zur Aktivierung von nicht-lysosomalen Cysteinproteasen (Broker, Krut and Giaccone, 2005; Kroemer and Martin, 2005). Hierbei wird bei dieser caspaseunabhängigen-Apoptose kein

aktives p53-Gen mehr benötigt. Möglicherweise könnte einer dieser Wege, die in dieser Arbeit gezeigt, p53- und caspaseunabhängige Apoptose der Urothelkarzinomzellen erklären. Ein expliziter Nachweis eines Weges, erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Des Weiteren ist anzunehmen, dass FrA über verschiedene Zellkaskaden eine Apoptose auslösen kann und der Caspase-induzierte Zelltod hierbei lediglich einen von mehreren Wegen aufzeigt.



## **11. Schlussfolgerung**

Zusammenfassend stellt die marine Substanz FrA eine interessante mögliche neue Therapie für fortgeschrittene Urothelkarzinome dar. Von besonderer Bedeutung ist dabei eine effektive Apoptose-Induktion unabhängig von aktiven Caspasen oder einem funktionsfähigen p53-Gen. Zudem wird ein für die Resistenzentwicklung gegen Standardchemotherapien wichtiger Resistenzmechanismus, die pro-survival Autophagie, effektiv gehemmt. Dies dürfte ursächlich für die synergistische Wirkung mit Cisplatin und Gemcitabin sein. Damit kann mit dem marinen Wirkstoff diesen in der Behandlung des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms großen Herausforderungen effektiv begegnet werden, eine präklinische und klinische Weiterentwicklung des Wirkstoffs ist daher dringend wünschenswert.

## Zusammenfassung

Harnblasenkarzinome nehmen in der deutschen Bevölkerung seit Jahren weiter zu, die therapeutischen Möglichkeiten sind, gerade in einer Rezidiv Situation jedoch begrenzt. In den letzten Jahren haben sich mit der Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren neue Möglichkeiten in der Erst- und Zweitlinientherapie ergeben. Ein Ansprechen auf die Therapie erreichen jedoch nur ein Drittel der Patienten. Aus diesem Grund ist eine weitere Entwicklung neuer Substanzen zur Verbesserung der Therapie von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde das zytotoxische Potenzial der marinen Substanz Frondoside A (FrA) auf Urothelkarzinomzellen *in vitro* dargestellt. Es zeigten sich starke synergistische Effekte in Kombination mit der Leitlinien gerechten Chemotherapie, darüber hinaus konnten verschiedene pro-apoptotische Signalwege identifiziert werden. Zu diesen Signalwegen gehört auch die Caspase induzierte Apoptose. Die Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 3 in RT-112 Urothelkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden. Die apoptotische Wirkung konnte jedoch auch bei der Hemmung der Caspasen mit z-VAD weiterhin aufrechterhalten werden.

Besonders hervorzuheben ist der Einfluss von FrA auf das ausgeschaltete p53-Gen. Während Cisplatin die Anwesenheit eines intakten p53 Gen benötigt, konnte FrA weiterhin sein zytotoxisches Potenzial entfalten. Der Status des p53-Gens hat demnach einen Einfluss auf das Therapieansprechen mit der Standardchemotherapie nicht jedoch auf die marine Substanz. Zudem wird ein für die Resistenzentwicklung gegen Standardchemotherapien wichtiger Resistenzmechanismus, die pro-survival Autophagie, effektiv gehemmt.

Unter diesen Gesichtspunkten sind Wirkstoffe, welche unabhängig von Caspase- und p53-Aktivität Apoptose induzieren können, von größtem klinischem Interesse.

## Summary

Bladder carcinomas have been increasing in the German population for years; the therapeutic options are limited, especially in a recurrent situation. In recent years, the approval of checkpoint inhibitors has opened up new possibilities in first and second line therapy. However, only one third of patients respond to the therapy. For this reason, further developments of new substances to improve therapy are of great importance.

In this thesis the cytotoxic potential of the marine substance Frondoside A (FrA) on urothelial carcinoma cells was demonstrated in vitro. Strong synergistic effects in combination with guideline-equitable chemotherapy were shown. Furthermore, different pro-apoptotic signalling pathways could be identified. Caspase-induced apoptosis is one of these signalling pathways. The activation of caspases 8, 9 and 3 in RT-112 urothelial carcinoma cells was demonstrated. However, the apoptotic effect could be maintained even when the caspases were inhibited with z-VAD.

The influence of FrA on the switched-off p53 gene is particularly noteworthy. While cisplatin requires the presence of an intact p53 gene, FrA continued to unfold its cytotoxic potential. The status of the p53 gene therefore has an influence on the response to standard chemotherapy but not on the marine substance. Furthermore, a resistance mechanism that is important for the development of resistance to standard chemotherapy, pro-survival autophagy, is effectively inhibited.

From this point of view, drugs that can induce apoptosis independently of caspase and p53 activity are of greatest clinical interest.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die unterschiedlichen Urothelkarzinomzelllinien mit entsprechenden IC50-Werten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber den Substanzen. _____	34
Abbildung 2: Wirkung von FrA in Kombination mit Cisplatin und Gemcitabin bei einer Behandlung von 48h. Behandelt wurden die RT-112 Urothelkarzinomzellen mit Molverhältnissen von C(FrA):C(Cis) = 1:4 (a) und C(FrA):C(Gem) = 1:0,25 (b). _____	35
Abbildung 4: Wetsern-Blot der Caspase-Proteine 8,9, und 3 als Zeichen der Caspase vermittelten Apoptose__	36
Abbildung 3: Die Lebensfähigkeit von transfizierten Zellen, die mit FrA 24h behandelt wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie mit Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung analysiert. Lebensfähige Zellen im unteren linken Quadranten wurden mit der Software Cell Quest Pro quantifiziert. _____	38
Abbildung 5: Durchflusszytometrie von RT-112-Urothelkarzinomzellen, behandelt mit FrA sowie Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung _____	38
Abbildung 6: Western-Blotting-Analyse der p53-Expression in RT112-Zellen _____	39
Abbildung 7: Western-Blotting –Analyse der RT-112 Zellen behandelt mit siRNA _____	40
Abbildung 8: Transfizierte Zellen, welche mit FrA oder CIS für 48 Stunden behandelt worden sind. Die lebenden Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin-V-FITC/PI-Doppelfärbung analysiert. _____	40
Abbildung 9: Wirkung von Pifithrin- $\alpha$ auf die zytotoxische Aktivität von FrA und CIS. Die Zellen wurden mit 40 $\mu$ M von Pif- $\alpha$ für 30min vorbehandelt und dann mit CIS oder FrA für 48h behandelt. Die Zelllebensfähigkeit wurde mit MTT-Test bestimmt. _____	41
Abbildung 10: Mit FrA behandelte Zellen zeigen eine zeit- und dosisabhängige Hemmung der Autophagie. Bafilomycin A1 (BafA1) und Chloroquin (CQ) als bekannte Autophagiehemmer dienen als Positivkontrolle. __	42
Abbildung 11: Die Zellen wurden mit FrA, BafA1, sowie CQ für 48h behandelt und mit dem Anti-LC3B-I/II-Antikörper inkubiert, gefolgt von der Behandlung mit Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von $\times 400$ oder $\times 1000$ aufgenommen. LC3B-I/II-positive Organellen (Autophagosomen/Autolysosomen), die als Punkte erscheinen, werden durch Pfeile angezeigt. _____	43
Abbildung 12: Die RT112-Zellen wurden für 1h mit FrA behandelt und anschließend wurde die Aktivierung von p-ERK 1/2, p-p38 sowie p-JNK 1/2 nach 1h durch Western-blotting analysiert. _____	44
Abbildung 13: Die RT112-Zellen wurden für 48h mit FrA behandelt und anschließend wurde die Aktivierung von p-JNK1/2 nach 48hdurch Western-blotting analysiert. _____	44
Abbildung 14: Wirkung des JNK1/2-Inhibitors SP600125 auf RT112-Zellen, welche mit FrA für 48h behandelt wurden. Die Daten wurden mit Trypan-Blau-basierten Viabilitäts-Assays generiert und anschließend mit der Software CompuSyn v.1.0. berechnet. _____	45

## Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen

Erstautor-Publikation in BMC Cancer

*“The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells”*

## Weitere Vorveröffentlichungen aus der Laborzeit der Dissertation

Koautorschaft:

- 1. Frondoside A induces AIF-associated caspase-independent apoptosis in Burkitt lymphoma cells.*
- 2. Proteomic-based investigations on the mode of action of the marine anticancer compound rhizochalinin.*
- 3. Anti-migratory activity of marine alkaloid monanchocidin A - proteomics-based discovery and confirmation.*
- 4. The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity in vitro and in vivo in prostate cancer.*

## **Erklärung des Eigenanteils**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation, „Effektivität und Wirkweise der marinen Substanz Frondoside A in humanen Urothelkarzinomzelllinien“ als gleichberechtigte Erstautor angefertigt und den Hauptanteil an dieser Arbeit wie nachfolgend dargestellt, geleistet habe.

### **Experimente:**

#### **1. Bestimmungen der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) mittels Trypanblau-Methode mit dem Beckman-Schar Vi-CELL**

Ramin Madanchi: 80%

Dr. Sergey Dyshlovoy: 20%

#### **2. Durchflusszytometrie: Annexin-V-FITC/PI Doppelfärbung**

Ramin Madanchi: 70%

Dr. Sergey Dyshlovoy: 30%

#### **3. Proteinexpressionsanalyse mittels Westernblot**

Ramin Madanchi: 70%

Dr. Sergey Dyshlovoy und Jessica Hausschild: 30%

#### **4. Bestimmung der Wirkung der Zytostatika zueinander mittels Chou-Talalay-Methode**

Ramin Madanchi: 70%

Dr. Sergey Dyshlovoy 30%

#### **5. „Silencing“ des p53-Proteins durch siRNA-Transfektion**

Ramin Madanchi: 50%

Dr. Sergey Dyshlovoy 50%

### **Einordnung und Diskussion der Ergebnisse im Gesamtkontext der Doktorarbeit:**

Ramin Madanchi

### **Statistische Auswertung:**

Ramin Madanchi: 80%

Dr. Sergey Dyshlovoy: 20%

**Recherche und Studienkonzept:**

Ramin Madanchi: 50%

Dr. Sergey Dyshlovoy: 50%

**Publikationsmanuskript:**

Hauptanteil (60%) durch Ramin Madanchi, unterstützt und angeleitet von Prof. Dr. med. Gunhild von Amsberg und Dr. Sergey Dyshlovoy (40%).

**Zusammenfassende Darstellung der Publikation:**

Ramin Madanchi

## Literaturverzeichnis

- Adrian, T. E. and Collin, P. (2018) ‘The Anti-Cancer Effects of Frondoside A.’, *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 16(2). doi: 10.3390/md16020064.
- Ashton, J. C. (2015) ‘Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou–Talalay Method—Letter’, *Cancer Research*, 75(11), pp. 2400–2400. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3763.
- Attoub, S. *et al.* (2013) ‘Frondoside a suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis.’, *PloS one*. Edited by S. P. Chellappan, 8(1), p. e53087. doi: 10.1371/journal.pone.0053087.
- Balar, A. V, Galsky, M. D., *et al.* (2017) ‘Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial’, *The Lancet*, 389(10064), pp. 67–76. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32455-2.
- Balar, A. V, Castellano, D., *et al.* (2017a) ‘First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study’, *The Lancet Oncology*, 18(11), pp. 1483–1492. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30616-2.
- Balar, A. V, Castellano, D., *et al.* (2017b) ‘First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study’, *The Lancet Oncology*, 18(11), pp. 1483–1492. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30616-2.
- Bamford, S. *et al.* (2004) ‘The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website.’, *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 91(2), pp. 355–8. doi: 10.1038/sj.bjc.6601894.
- Bano, D. and Prehn, J. H. M. (2018) ‘Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer’, *EBioMedicine*. Elsevier B.V., pp. 29–37. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.016.
- Bellmunt, J. *et al.* (2009) ‘Phase III Trial of Vinflunine Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone After a Platinum-Containing Regimen in Patients With



Advanced Transitional Cell Carcinoma of the Urothelial Tract', *Journal of Clinical Oncology*, 27(27), pp. 4454–4461. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5534.

Berggren, P. *et al.* (2001) 'p53 mutations in urinary bladder cancer.', *British journal of cancer*. Nature Publishing Group, 84(11), pp. 1505–11. doi: 10.1054/bjoc.2001.1823.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> (Accessed: 8 June 2018).

Broker, L. E., Kruyt, F. A. E. and Giaccone, G. (2005) 'Cell Death Independent of Caspases: A Review', *Clinical Cancer Research*, 11(9), pp. 3155–3162. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223.

Bukhari, N., Al-Shamsi, H. O. and Azam, F. (2018) 'Update on the Treatment of Metastatic Urothelial Carcinoma', *The Scientific World Journal*, 2018, pp. 1–7. doi: 10.1155/2018/5682078.

Bundesausschuss, G. (2019) 'Atezolizumab ( Urothelkarzinom , erneute Nutzenbewertung § 13 )', (April).

Chipuk, J. E. and Green, D. R. (2005) 'Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(3), pp. 268–75. doi: 10.1038/nrm1573.

Cregan, S. P., Dawson, V. L. and Slack, R. S. (2004) 'Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death', *Oncogene*, pp. 2785–2796. doi: 10.1038/sj.onc.1207517.

Dyshlovoy, S. A. *et al.* (2016) 'The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity *in vitro* and *in vivo* in prostate cancer', *International Journal of Cancer*, 138(10), pp. 2450–2465. doi: 10.1002/ijc.29977.

Elliott, A. Y. *et al.* (1977) 'Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract.', *Cancer research*, 37(5), pp. 1279–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/66978> (Accessed: 6 June 2018).

Erdal, H. *et al.* (2005) 'Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(1), pp. 192–7. doi: 10.1073/pnas.0408592102.

ESMO |Press | bladder, cancer, immunotherapy, imvigor130, grande (no date). Available at: <https://www.esmo.org/newsroom/press-office/esmo-congress-bladder-cancer-immunotherapy-imvigor130-grande> (Accessed: 22 March 2020).

Galsky, M. D. *et al.* (2011) ‘Treatment of patients with metastatic urothelial cancer &quot;unfit&quot; for Cisplatin-based chemotherapy.’, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(17), pp. 2432–8. doi: 10.1200/JCO.2011.34.8433.

George, B. *et al.* (2007) ‘p53 Gene and Protein Status: The Role of p53 Alterations in Predicting Outcome in Patients With Bladder Cancer’, *Journal of Clinical Oncology*, 25(34), pp. 5352–5358. doi: 10.1200/JCO.2006.10.4125.

Grieco, L. *et al.* (2013) ‘Integrative Modelling of the Influence of MAPK Network on Cancer Cell Fate Decision’, *PLoS Computational Biology*. Edited by S. Miyano, 9(10), p. e1003286. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003286.

Kim, J. J. (2012) ‘Recent advances in treatment of advanced urothelial carcinoma.’, *Current urology reports*. NIH Public Access, 13(2), pp. 147–52. doi: 10.1007/s11934-012-0238-0.

Klionsky, D. J. *et al.* (2016) ‘Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)’, *Autophagy*. Taylor & Francis, 12(1), p. 1. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

Kobold, S. *et al.* (2015) ‘Immunotherapy in Tumors’, *Deutsches Aerzteblatt Online*. doi: 10.3238/arztebl.2015.0809.

Kroemer, G. and Martin, S. J. (2005) ‘Caspase-independent cell death.’, *Nature medicine*, 11(7), pp. 725–30. doi: 10.1038/nm1263.

Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D. K. e. V. (DKG) und D. K. (DKH). (2016a) ‘S3-Leitlinie Früherkennung , Nachsorge des Harnblasenkarzinoms’, *S3-Leitlinie*, (November), pp. 1–94.

Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D. K. e. V. (DKG) und D. K. (DKH). (2016b) ‘S3-Leitlinie Früherkennung , Nachsorge des Harnblasenkarzinoms’, *S3-Leitlinie*, (November), pp. 1–94. Available at: <http://leitlinienprogramm->

onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html.

LIU, J. and LIN, A. (2005) 'Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword', *Cell Research*, 15(1), pp. 36–42. doi: 10.1038/sj.cr.7290262.

Loehrer, P. J. *et al.* (1992) 'A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study.', *Journal of Clinical Oncology*, 10(7), pp. 1066–1073. doi: 10.1200/JCO.1992.10.7.1066.

von der Maase, H. *et al.* (2000) 'Gemcitabine and Cisplatin Versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: Results of a Large, Randomized, Multinational, Multicenter, Phase III Study', *Journal of Clinical Oncology*, 18(17), pp. 3068–3077. doi: 10.1200/JCO.2000.18.17.3068.

Massari, F. *et al.* (2015) 'Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: Implications for future strategies', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(1), pp. 81–90. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.005.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2007) 'Role of autophagy in cancer.', *Nature reviews. Cancer*. NIH Public Access, 7(12), pp. 961–7. doi: 10.1038/nrc2254.

Morrison, D. K. (2012) 'MAP kinase pathways.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(11). doi: 10.1101/cshperspect.a011254.

Ojha, R., Singh, Shrawan K, *et al.* (2014) 'Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent.', *The Journal of urology*, 191(6), pp. 1889–98. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.006.

Ojha, R., Singh, Shrawan K., *et al.* (2014) 'Inhibition of Grade Dependent Autophagy in Urothelial Carcinoma Increases Cell Death under Nutritional Limiting Condition and Potentiates the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Agent', *The Journal of Urology*, 191(6), pp. 1889–1898. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.006.

Otto, K. B., Acharya, S. S. and Robinson, V. L. (2012) 'Stress-activated kinase pathway alteration is a frequent event in bladder cancer', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 30(4), pp. 415–420. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.03.002.

Parrales, A. and Iwakuma, T. (2015) 'Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy.',

*Frontiers in oncology*. Frontiers Media SA, 5, p. 288. doi: 10.3389/fonc.2015.00288.

Philchenkov, A., Zavelevich, M., *et al.* (2004) ‘Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities.’, *Experimental oncology*, 26(2), pp. 82–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273659> (Accessed: 4 June 2018).

Philchenkov, A., Zavelvich, M., *et al.* (2004) ‘Caspases and Cancer: Mechanisms of Inactivation and new Treatment modalities’, *Experimental Oncology*, 26, pp. 82–97. Available at:

<https://access.uke.de/+CSCO+0h756767633A2F2F7976682E7176696E2D636265676E792E626574++/smash/get/diva2:584208/FULLTEXT01.pdf> (Accessed: 10 June 2018).

Pinal, N., Calleja, M. and Morata, G. (2019) ‘Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila* : roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration’, *Open Biology*, 9(3), p. 180256. doi: 10.1098/rsob.180256.

Possinger, K., Regierer, A. C. and Eucker, J. (2017) *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*. 4. Auflage. Elsevier.

Powles, T. *et al.* (2018) ‘Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial’, *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 391(10122), pp. 748–757. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33297-X.

Rassow, Joachim *et al.* (2008) ‘Biochemie’, in *Duale Reihe Biochemie*. 2. Auflage. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio, pp. 692–734. Available at: <https://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-85529>.

Rassow, J *et al.* (2008) *Duale-Reihe Biochemie*. 2. Auflage. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio.

Redmann, M. *et al.* (2017) ‘Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons.’, *Redox biology*. Elsevier, 11, pp. 73–81. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.004.

Riede, Werner and Freudenberg (2009) *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer Berlin Heidelberg.

S3-Leitlinie AWMF, DKG, D. (2019) ‘S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms’, (September), pp. 1–400.

- De Santis, M. *et al.* (2012) ‘Randomized Phase II/III Trial Assessing Gemcitabine/Carboplatin and Methotrexate/Carboplatin/Vinblastine in Patients With Advanced Urothelial Cancer Who Are Unfit for Cisplatin-Based Chemotherapy: EORTC Study 30986’, *Journal of Clinical Oncology*, 30(2), pp. 191–199. doi: 10.1200/JCO.2011.37.3571.
- Seo, B. R. *et al.* (2013) ‘Anisomycin treatment enhances TRAIL-mediated apoptosis in renal carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2, c-FLIP(L) and Mcl-1’, *Biochimie*, 95(4), pp. 858–865. doi: 10.1016/j.biochi.2012.12.002.
- Shahinozzaman, M. *et al.* (2018) ‘Cytotoxic Desulfated Saponin from *Holothuria atra* Predicted to Have High Binding Affinity to the Oncogenic Kinase PAK1: A Combined In Vitro and In Silico Study’, *Scientia Pharmaceutica*, 86(3), p. 32. doi: 10.3390/scipharm86030032.
- Sharma, P. *et al.* (2017) ‘Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial’, *The Lancet Oncology*, 18(3), pp. 312–322. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30065-7.
- Al Shemali, J. *et al.* (2014) ‘Fronodoside A enhances the antiproliferative effects of gemcitabine in pancreatic cancer’, *European Journal of Cancer*, 50(7), pp. 1391–1398. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.002.
- Smith, N. D. *et al.* (2003) ‘The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer’, *Journal of Urology*, 169(4), pp. 1219–1228. doi: 10.1097/01.ju.0000056085.58221.80.
- Sui, X. *et al.* (2013) ‘Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment.’, *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 4(10), p. e838. doi: 10.1038/cddis.2013.350.
- Tait, S. W. G. and Green, D. R. (2008) ‘Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut.’, *Oncogene*, 27(50), pp. 6452–61. doi: 10.1038/onc.2008.311.
- Tandon, S. *et al.* (2010) ‘A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck.’, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. Europe

PMC Funders, 19(2), pp. 574–87. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0981.

Tewari, A. (Dana-F. C. I. (2019) ‘ESMO 2019: IMvigor130: Efficacy and Safety from a Phase 3 Study of Atezolizumab as Monotherapy or Combined with Platinum-based Chemotherapy vs Placebo + PBC in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma’, in. Available at: <https://www.urotoday.com/conference-highlights/esmo-2019/esmo-2019-bladder-cancer/115398-esmo-2019-imvigor130-efficacy-and-safety-from-a-phase-3-study-of-atezolizumab-as-mono-therapy-or-combined-with-platinum-based-chemotherapy-pbc-vs-placebo-pbc-in-previo> (Accessed: 22 March 2020).

Vaughn, D. J. *et al.* (2018) ‘Health-Related Quality-of-Life Analysis From KEYNOTE-045: A Phase III Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Previously Treated Advanced Urothelial Cancer’, *Journal of Clinical Oncology*, 36(16), pp. 1579–1587. doi: 10.1200/JCO.2017.76.9562.

Yang, P. *et al.* (2013) ‘The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 3(1), p. 2246. doi: 10.1038/srep02246.

Yang, Z. J. *et al.* (2011) ‘The role of autophagy in cancer: therapeutic implications.’, *Molecular cancer therapeutics*. NIH Public Access, 10(9), pp. 1533–41. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0047.

Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016) ‘Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016’, p. 274. doi: 10.17886/rkipubl-2016-014.

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Gunhild von Amsberg, die mir die Möglichkeit zur Erarbeitung meiner Dissertation gegeben hat. Außerdem danke ich Jessica Hauschild für ihr technisches Geschick und die viele Hilfe bei den alltäglichen Laborarbeiten. Ein Besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herr Dr. rer. nat. Sergey A. Dyshlovoy für seine wissenschaftliche und methodische Anleitung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation, für die zahlreichen und unermüdlichen fachliche Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen und für seine Geduld. Auch die vielen nicht-fachlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit unterstützt.

Besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie danken, die mich auf meinem Lebensweg und nicht zuletzt auch durch das Studium stets unterstützt und motiviert hat.

**„Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**



## **Eidesstattliche Versicherung**

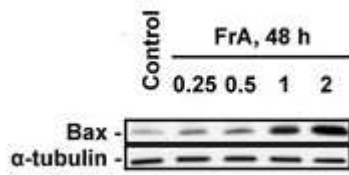
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

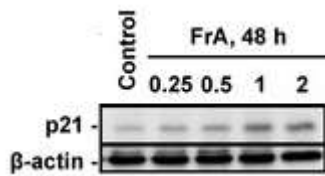
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

## Anhang



In der Grafik ist die Hochregulierung des pro-apoptischen Proteins Bax zu erkennen, die RT-112-Zellen wurden mit FrA behandelt.



In der oben stehenden Grafik zeigt sich die schwache Expression des p21-Proteins bei mit FrA behandelten RT-112-Zellen.