

**Regulation von Apoptose, Autophagie und DNA-Integrität
in Leukämiezellen durch replikativen Stress und
pharmakologische Hemmung der Histondeacetylasen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Nisinth Mahendrarajah
geb. am 25.08.1988 in Meisenheim

Mainz, Januar 2019

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

“Education is the most powerful weapon which you can use to change the world.”

Nelson Mandela, südafrikanischer Aktivist und Politiker (1918-2013)

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XV
Abstract	XVI
1 Einleitung	17
1.1 Die Entstehung von Leukämie	17
1.1.1 Chronische Myeloische Leukämie	19
1.1.2 Therapieoptionen für Chronische Myeloische Leukämie	19
1.2 Histondeacetylasen und Histondeacetylase-Inhibitoren	20
1.2.1 Die Familie der Histondeacetylasen	20
1.2.2 Histondeacetylase-Inhibitoren	23
1.2.3 Histondeacetylase-Inhibitoren in der Krebstherapie	24
1.3 DNA-Schäden, Ursachen, Reparatur und Signalweiterleitung	27
1.3.1 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen	27
1.3.2 Replikativer Stress	28
1.3.3 DNA-Schadensantwort	29
1.3.4 Inhibitoren gegen <i>Checkpoint</i> -Kinasen	33
1.4 Zellzyklus	34
1.5 Apoptose	35
1.4.1 Intrinsischer Apoptoseweg	36
1.6 Nekrose	38
1.7 Autophagie	38
1.8 Zielsetzung	42
2 Material und Methoden	43
2.1 Material	43
2.1.1 Geräte	43
2.1.2 Chemikalien	44
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	45
2.1.4 Kits	45
2.1.5 Medien und Medienzusätze	46
2.1.6 Zelllinien	46
2.1.6.1 Adhärente Zelllinien	46
2.1.6.2 Suspensionszelllinien	46
2.1.7 Antikörper	47
2.1.7.1 Primärantikörper	47
2.1.7.2 Sekundärantikörper	48

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide	48
2.1.9 Puffer und Lösungen	49
2.1.10 Inhibitoren	52
2.1.11 Software	52
2.2 Methoden	53
2.2.1 Zellkultur	53
2.2.1.1 Zellkryokonservierung	53
2.2.1.2 Zelllinien und Erhaltungskultur	53
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellaussaat	54
2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	55
2.2.2 Untersuchung der Proteinexpression	55
2.2.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	55
2.2.2.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	55
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.2.2.4 Western Blot	57
2.2.2.5 Immundetektion mithilfe des Odyssey [®] - <i>Infrared-Imaging-Systems</i>	58
2.2.3 Durchflusszytometrische Messungen	58
2.2.3.1 Zelltodmessung mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung	58
2.2.3.2 Bestimmung der Zellzyklusverteilung mittels PI-Färbung	59
2.2.3.3 Messung der Autophagie mittels Cyto-ID [®] -Färbung	60
2.2.3.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels DiOC6-Färbung	60
2.2.4 Immunfluoreszenz-Färbungen	61
2.2.4.1 RPA/γH2AX-Färbung	61
2.2.4.2 LC3B-Färbung	62
2.2.5 Transfektion von siRNA mittels Elektroporation	63
2.2.6 Einzelzellgelelektrophorese (<i>Comet Assay</i>)	64
2.2.6.1 Alkalischer <i>Comet Assay</i>	64
2.2.6.2 Neutraler <i>Comet Assay</i>	65
2.2.7 Untersuchung der mRNA Expression	65
2.2.7.1 RNA-Isolation	65
2.2.7.2 Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase	66
2.2.7.3 Quantitative <i>Real-Time PCR</i>	66
2.2.8 Statistische Analysen	67
3 Ergebnisse	68
3.1 Replikativer Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs induzieren apoptotische und nekrotische Prozesse in CML Zellen	68
3.2 Replikativer Stress induziert Autophagie in CML Zellen	70

3.3 Replikativer Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs führen in CML Zellen zu einem Caspase-abhängigen Abbau von Autophagieregulatoren	73
3.4 Genexpression von pro- und anti-apoptotischen Faktoren in CML Zellen nach replikativem Stress und Hemmung von Klasse I HDACs	76
3.5 NOXA ist ein wichtiger Regulator in der Induktion von Apoptose durch replikativen Stress und Hemmung von Klasse I HDACs in CML Zellen	78
3.6 Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs in CML Zellen	81
3.7 Hemmung von ATR-CHK1 verringert in CML Zellen die Apoptoseinduktion durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs	85
3.8 ATR Inhibition verstärkt in CML Zellen die Induktion von DNA-Schäden durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs	91
3.9 Replikationsstress und die Hemmung von Klasse I HDACs induzieren in CML Zellen Apoptose über die c-ABL-p73-NOXA Achse	93
4 Diskussion	97
4.1 Möglicher Mechanismus für den durch HDACi bewirkten G1 Arrest	98
4.2 Mechanismus zur Aktivierung der DDR und Induktion von DSBs durch Replikationsstress und HDACi	98
4.3 Signalkaskade zur Induktion von Apoptose durch Replikationsstress und HDACi	101
4.4 Mögliche Ursachen für die Induktion von Zellzyklus relevanten Genen nach Replikationsstress und HDACi	107
4.5 Potentielle Mechanismen für die durch Replikationsstress induzierte Autophagie	108
4.6 Der <i>Crosstalk</i> zwischen Autophagie und Apoptose	111
4.7 ATR und CHK1 agieren als pro-apoptotische Faktoren durch die Regulation von NOXA	113
4.8 Möglicher Signalweg zur Apoptoseinduktion und Autophagiehemmung durch Zusammenwirken von Replikationsstress und HDACi	115
5 Referenzen	117
6 Anhang	138
Publikationen	145
Konferenzteilnahmen	150
Danksagung	151
Lebenslauf	152
Erklärung	153

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Ausgewählte HDACi und deren Zugehörigkeit zu den verschiedenen Klassen	23
Tab. 1.2:	Ausgewählte Klinische Studien mit HDACi und in Kombinationsbehandlung mit anderen Chemotherapeutika	26
Tab. 1.3:	Effekte auf DDR durch HDACi	32
Tab. 2.1:	Herkunft, Phänotyp und p53 Status von humanen Leukämie Zelllinien ...	46
Tab. 2.2:	Verdünnung der BSA Standards	56
Tab. 2.3:	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für die SDS-PAGE	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Hierarchie des hämatopoetischen Systems und Entwicklung von Leukämie.	18
Abb. 1.2:	Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und Histon-Deacetylierung.	21
Abb. 1.3:	Die Familie der Histondeacetylasen.	22
Abb. 1.4:	Die Struktur von HDACi.	24
Abb. 1.5:	Effekte von HDACi.	25
Abb. 1.6:	Hemmung der Synthese von dNTPs mittels Hydroxyurea.	28
Abb. 1.7:	Schematische Darstellung der Aktivierung von ATR.	30
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung des Zellzyklus und dessen Regulation.	34
Abb. 1.9:	Intrinsischer Apoptoseweg.	37
Abb. 1.10:	Schematische Darstellung der Makroautophagie.	39
Abb. 3.1:	Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	68
Abb. 3.2:	Expression von Apoptosemarkern in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	69
Abb. 3.3:	Zellzyklusverteilung von K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	70
Abb. 3.4:	Autophagieinduktion in K562 Zellen durch Hydroxyurea.	71
Abb. 3.5:	Expression von Autophagieregulatoren in K562 Zellen nach Behandlung mit Hydroxyurea.	72
Abb. 3.6:	Akkumulation von LC3B in K562 Zellen nach Behandlung mit Hydroxyurea.	73
Abb. 3.7:	Caspase-abhängiger Abbau von Autophagieregulatoren in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	74
Abb. 3.8:	Einfluss von Beclin1 <i>Knock-down</i> auf Autophagie- und Apoptoseinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	75
Abb. 3.9:	mRNA- <i>Microarray</i> von pro- und anti-apoptotischen Regulatoren in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	76
Abb. 3.10:	Expression von pro- und anti-apoptotischen Faktoren in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	77
Abb. 3.11:	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	78
Abb. 3.12:	Einfluss von NOXA <i>Knock-down</i> auf Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	79
Abb. 3.13:	Unterdrückung der Apoptoseinduktion in NOXA-negativen MEFs durch MS-275 und Hydroxyurea.	80
Abb. 3.14:	DNA-Schadensantwort in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	81
Abb. 3.15:	Expression von γ H2AX in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	82
Abb. 3.16:	Immunfluoreszenz-Färbung von γ H2AX und RPA in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	83
Abb. 3.17:	Nachweis von ESBs und DSBs in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea mittels alkalischem <i>Comet Assay</i>	84
Abb. 3.18:	Nachweis von DSBs in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea mittels neutralem <i>Comet Assay</i>	85
Abb. 3.19:	Hemmung von ATR schützt K562 Zellen vor Apoptoseinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea.	86
Abb. 3.20:	Hemmung von ATR und CHK1 reduziert die NOXA Expression in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	87
Abb. 3.21:	Wirksamkeit von VE-821 und MK-8776.	88
Abb. 3.22:	Hemmung von ATR und CHK1 beeinflussen die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen.	89

Abb. 3.23:	<i>Knock-down</i> von ATR reduziert in K562 Zellen die Induktion von Apoptose durch MS-275 und Hydroxyurea.	90
Abb. 3.24:	<i>Knock-down</i> von NOXA und ATR beeinflussen die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen.	90
Abb. 3.25:	Hemmung von ATM in K562 Zellen hat keinen Einfluss auf die Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea.	91
Abb. 3.26:	Hemmung von ATR fördert in K562 Zellen die Induktion von ESBs und DSBs durch Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	92
Abb. 3.27:	Potentielle upstream Regulatoren von NOXA.	93
Abb. 3.28:	Überexpression von p73 verstärkt in K562 Zellen die Apoptoseinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea.	94
Abb. 3.29:	<i>Knock-down</i> von p73 reduziert in K562 Zellen die Induktion von Apoptose durch MS-275 und Hydroxyurea.	95
Abb. 3.30:	Hemmung von c-ABL durch Imatinib reduziert die Expression von p73 und NOXA in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. .	96
Abb. 4.1:	Induktion von DSBs durch Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea in Leukämiezellen.	100
Abb. 4.2:	Modell zum Mechanismus der Apoptoseinduktion in Leukämiezellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	115
Abb. 6.1:	Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	138
Abb. 6.2:	Zelltodinduktion in CML Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	139
Abb. 6.3:	Autophagieinduktion in K562 Zellen durch Hydroxyurea.	139
Abb. 6.4:	Autophagieinduktion in CML Zellen durch Hydroxyurea.	140
Abb. 6.5:	Einfluss von Beclin1 <i>Knock-down</i> auf Autophagie- und Apoptoseinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	141
Abb. 6.6:	Expression von NOXA in CML Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	141
Abb. 6.7:	Expression von γ H2AX in CML Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	141
Abb. 6.8:	Caspase-abhängige Induktion von γ H2AX in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea.	141
Abb. 6.9:	Einfluss der Hemmung von ATR, CHK1 und ATM auf Zelltodinduktion und Zellzyklusverteilung in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea.	142
Abb. 6.10:	Hemmung von ATR schützt CML Zellen vor Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea.	143
Abb. 6.11:	Hemmung von ATR beeinflusst die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen.	143
Abb. 6.12:	Hemmung von ATR schützt K562 Zellen vor Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea.	144
Abb. 6.13:	Hemmung von ATR unterdrückt in CML Zellen die Expression von NOXA und verstärkt zugleich den durch MS-275 und Hydroxyurea induzierten DNA-Schaden.	144

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ
%	Prozent
*p	Signifikanzwert
+	positiv
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
9-1-1	RAD9-HUS1-RAD1
Abb.	Abbildung
abh.	abhängig
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACK1	<i>Activated CDC42-associated kinase-1</i>
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML1-ETO	<i>Acute myeloid leukemia 1-eight twenty one</i>
AMPK	<i>Adenosin-monophosphate-activating protein kinase</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara-C	Cytarabin
aSZT	allogene Stammzelltransplantation
A-T	<i>Ataxia-telangiectasia</i>
AT13387	Onalespib
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated protein kinase</i>
ATR	<i>ATM-RAD3-related protein kinase</i>
ATRA	<i>All-trans retinoic acid/All-trans-Retinsäure</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
B/T	B-/T-Lymphozyten
BAK	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma 2-extra large</i>
BH3-only	<i>BCL2 homology 3-only</i>
BCR	Breakpoint cluster region
BER	Basenexzisionsreparatur
bidest.	<i>double distilled</i>
BIM	<i>B cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
Casp	Caspase
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CDC	<i>Cell division control</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKi	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFS	<i>Common fragile sites</i>

CHK1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CMA	<i>Chaperon-mediated autophagy</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CQ	Chloroquin
Cyto c	Cytochrom c
D	Aspartat
d.h.	das heißt
dAZA	<i>5-aza-2'-deoxycytidine</i>
DC	Dendritische Zelle
DDB2	<i>DNA damage-binding protein 2</i>
DDR	<i>DNA damage response</i> /DNA-Schadensantwort
DiOC6	<i>3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide</i> /DiOC6(3)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	<i>DNA double-strand break</i> /DNA-Doppelstrangbruch
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Erythrozyten
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
EndoG	<i>Endonuclease G</i>
ERFS	<i>Early replicating fragile sites</i>
ESB	<i>DNA single-strand break</i> /DNA-Einzelstrangbruch
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> /Durchflusszytometer
FANCD2	<i>Fanconi anemia complementation group D2</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> /Fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (USA)
FITC	Fluorescein
FK-288	Romidepsin
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
G	Granulozyten
GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein 45</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	<i>hour</i> /Stunde
H₂O	Wasser
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HR	<i>Homologous recombination</i> /Homologe Rekombination
HECT	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HSC70	<i>Heat shock cognate 70</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i> /Hitzeschockprotein 90
HtrA2	<i>High temperature requirement A2</i>
HU	Hydroxyurea

IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis</i>
ICL	<i>interstrand crosslinks</i>
IgG	Immunglobulin G
Ima/Imatinib	Imatinib-Mesylat
IR	<i>Ionizing radiation</i> /Ionisierende Strahlung
ITCH	<i>Itchy E3 ubiquitin protein ligase</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
LAMP2A	<i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LBH589	Panobinostat
LC3	<i>Light chain 3</i>
LMP	<i>Low-melting-point</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i> /konfokales Mikroskop
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCL-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MDR1	<i>Multi drug resistance 1</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mk	Makrophagen
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMS	<i>Methyl methanesulfonate</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilisation</i>
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
MS-275	Entinostat
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MULE	<i>MCL-1 ubiquitin ligase E3</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene cellular homolog</i>
n	nano
n = X	X-unabhängige Experimente
N4BP1	<i>Nedd4-binding protein 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBS11	<i>Nijmegen breakage syndrome 11</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NHEJ	<i>Non-homologous Endjoining</i> /Nicht-homologe Endverknüpfung
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-P-40
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>

NTP	Nukleotidtriphosphat
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
p. a.	<i>per annum</i>
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PIN	<i>prolyl isomerase.</i>
PIR	<i>p73-induced ring finger protein 2</i>
pmol	Pikomol
PP2A	<i>protein phosphatase 2 regulatory subunit A</i>
pRb	<i>retinoblastoma protein</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time PCR</i>
RAD17-RFC	<i>RAD17-replication factor C</i>
RAD51	Rekombinase (RECA)
RhoB	<i>Ras homolog family member B, small GTPase</i>
rIFNα	rekombinantes Interferon-alpha
RIP1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLIM	<i>Ring finger protein 12, lim interacting/E3 Ubiquitin-Ligase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNRi	Ribonukleotidreduktase-Inhibitor
ROS	<i>Reactive oxygen species/reaktive Sauerstoffspezies</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRM2	<i>Ribonucleotide reductase M2</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAHA	Superoylanilid-Hydroxaminsäure/Vorinostat
SD	<i>Standard deviation/Standardabweichung</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SIAH1/2	<i>Seven-in-absentia homologue 1/2/E3 Ubiquitin-Ligasen</i>
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT	Sirtuin
SL	Stammlösung
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
SSB	<i>DNA single-strand break/DNA-Einzelstrangbruch</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA/einzelsträngige DNA</i>
STAT1/3/5	<i>Signal transducer and activator of transcription 1/3/5</i>
T	Threonin
TA	<i>transcriptionally active</i>
Tab.	Tabelle
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Th	Thrombozyten
TK	Tyrosinkinase
TKi	Tyrosinkinase-Inhibitor
TOPBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UBCH8	E2 Ubiquitin-Konjugase 8/UBE2L6
UCH-L1	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i>
ULK1	<i>Unc-51-like-kinase 1</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
Vol	Volumen
VPA	<i>Valproic acid</i> /Valproinsäure
Vps34	<i>Vacuolar protein sorting 34</i>
vs.	<i>versus</i>
wt	Wildtyp
x	mal
x g	x Gravität
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
Y	Tyrosin
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
z.B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink
α	alpha
β	beta
ΔN	<i>N-terminal truncated</i>
γ	gamma
γH2AX	an S139 phosphoryliertes Histon H2AX
ε	eta
Ψm	mitochondriales Membranpotential

Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine Krebserkrankung, die durch das onkogene BCR/ABL Fusionsprotein charakterisiert ist. Die zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ermöglicht in bis zu 80% der Fälle eine normale Lebenserwartung. Allerdings bleiben leukämische Stammzellen meist erhalten und können zu einer Neuerkrankung führen. Derzeit werden Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) entwickelt, die als vielversprechende Krebsmedikamente in der Therapie von hämatologischen Erkrankungen eingesetzt werden. Dabei sind Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika im Fokus, da sie effizienter als Monotherapien sind. Hydroxyurea wird aktuell als stabiles Medikament gegen Sichelzellanämie sowie gegen chronische myeloproliferative Erkrankungen eingesetzt. Aufgrund der Funktion als Ribonukleotidreduktase-Inhibitor wird Hydroxyurea in Laboren oft dazu verwendet, gezielt replikativen Stress durch Depletion von dNTPs zu induzieren. Replikativer Stress setzt in den Zellen eine komplexe Zellantwort in Gang. Dabei spielen Prozesse wie die DNA-Schadensantwort, Apoptose und Autophagie eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Klasse I HDACi MS-275 CML Zellen gegenüber Hydroxyurea sensitiviert. Die Daten zeigen, dass MS-275 die Expression des CDKi p21 und einen G1 Arrest der Zellen auslöst. Hydroxyurea hingegen arretiert die Zellen in der S-Phase und fördert die Autophagie. Die kombinierte Gabe von MS-275 und Hydroxyurea führt zu einer signifikanten und synergistischen Zunahme der Apoptose, sowie zu einer Caspase-abhängigen Proteolyse von Autophagieregulatoren. Als kritischen Faktor für eine von dem Tumorsuppressor p53-unabhängige Apoptoseinduktion wurde das pro-apoptotische Protein NOXA ermittelt. Experimente mit einer genetischen Eliminierung von NOXA sowie Versuche mit NOXA-defizienten MEFs belegen eine unabdingbare Rolle von NOXA in der Aktivierung der Apoptosekaskade nach Kombinationsbehandlung in CML Zellen. Als weitere wichtige Faktoren des Apoptosewegs wurden c-ABL und p73 als vorgeschaltete Regulatoren von NOXA ausfindig gemacht. Die Untersuchung der DNA-Schadensantwort ergab, dass MS-275 die von Hydroxyurea induzierte Aktivierung von *Checkpoint*-Kinasen, sowie insbesondere die Mengen an DNA-Strangbrüchen deutlich erhöht. Die pharmakologische Hemmung von ATR und CHK1 hat eine zusätzliche Zunahme an DNA-Schäden in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen zur Folge. Die Inaktivierung der ATR-CHK1 Achse führt zu einer signifikanten Reduktion der durch MS-275/Hydroxyurea induzierten Apoptose. Diese Daten legen eine bisher unbekannte pro-apoptotische Rolle von ATR und CHK1 durch eine transkriptionelle Regulation von NOXA offen. Zudem wird dargelegt, dass Klasse I HDACs unerlässlich für die DNA-Reparatur, die Hemmung der Apoptose sowie für den Erhalt der Autophagie in CML Zellen nach replikativem Stress sind. Der aufgedeckte Mechanismus kann als generelles Konzept für die Wirkungsweise von Hydroxyurea und HDACi, insbesondere im Kontext der CML verstanden werden. Da die Behandlungsstrategie mit Hydroxyurea und HDACi vielversprechende Daten liefert, ermutigt dies zu Analysen der Kombinationstherapie in klinischen Studien.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematological disorder characterized by the presence of the oncogenic fusion protein BCR/ABL. The targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors allows in up to 80% of all CML cases an ordinary life expectancy. However, remaining leukemic stem cells can lead to new cases. At present, histone deacetylase inhibitors (HDACi) are newly developed and used as promising cancer drugs in therapy of leukemia. Combination therapies of chemotherapeutics are gaining in importance more and more, as they show higher efficacies than monotherapies. Hydroxyurea is currently the stable drug for the treatment of sickle cell anemia and chronic myeloproliferative disorders. As hydroxyurea acts as a ribonucleotide reductase inhibitor, it is commonly used in laboratories for generating replicative stress through depletion of the dNTP pool. Replicative Stress induces a complex cellular program involving DNA damage response, apoptosis and autophagy. In this thesis, I analysed if the class I HDACi MS-275 sensitizes CML cells towards hydroxyurea. Here I show that MS-275 induces the expression of the CDKi p21 and stalls the cells in G1 phase. Whereas hydroxyurea arrests the cells in S phase and triggers autophagy. The additional application of MS-275 leads to a significant and synergistic increase in apoptosis as well as to a caspase-dependent cleavage of autophagic regulators. As critical factor in inducing p53-independent apoptosis the pro-apoptotic protein NOXA was determined. Genetic elimination of NOXA as well as experiments with NOXA deficient MEFs confirmed the important role of this protein in activation of the apoptotic cascade upon MS-275/Hydroxyurea treatment in CML cells. As further critical factors in the apoptotic pathway c-ABL and p73 were found as upstream regulators of NOXA. The investigation of the DNA damage response revealed that the class I HDACi MS-275 enhances the hydroxyurea-induced activation of checkpoint kinases as well as the amount of DNA strand breaks, notably. The pharmacological inhibition of ATR and CHK1 results in a distinct accumulation of DNA damage in MS-275/Hydroxyurea-treated CML cells. The inactivation of the ATR-CHK1 axis evokes a significant reduction of the MS-275/Hydroxyurea induced apoptosis. My data reveal a previously unidentified pro-apoptotic role of ATR and CHK1 through a transcriptional control of NOXA. Furthermore, I demonstrate that class I HDACs are necessary to initiate DNA repair, to prevent apoptosis and to sustain autophagy during replicative stress in CML cells. The disclosed mechanism is to be taken as a concept for the efficacy of hydroxyurea and HDACi especially in the context of CML. As the therapeutic strategy of hydroxyurea and HDACi show promising results, this encourages one to introduce the combinatorial therapy in clinical trials.

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung von Leukämie

Die Leukämie ist im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, wie Brustkrebs, Lungenkrebs oder Dickdarmkrebs eine seltene Erkrankung. So werden in Deutschland pro Jahr rund 13.700 Leukämie-Fälle neu diagnostiziert. Das macht bei Frauen etwa 2,7% und bei Männern etwa 3,1% der Tumorerkrankungen aus. Die verschiedenen Leukämieformen sind dabei wie folgt verteilt: 10% chronische myeloische Leukämie (CML), 50% chronische lymphatische Leukämie (CLL) und 40% akute lymphatische und myeloische Leukämie (ALL, AML). Die meisten Menschen erkranken an Leukämie im Alter von 60-70 Jahren, dabei betrifft es Männer etwas häufiger als Frauen. Leukämien können grundsätzlich in jedem Lebensalter auftreten. Die ALL stellt bei Kindern und Jugendlichen die häufigste Leukämieform dar. AML und CML kommen oft bei Erwachsenen im mittleren und hohen Lebensalter vor, wobei insbesondere ältere Patienten von CLL betroffen sind [1].

Die Leukämie stellt eine bösartige Erkrankung des hämatopoetischen Systems dar. Der Begriff Leukämie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus „leukos, weiß“ und „häima, Blut“ zusammen, weshalb die Erkrankung umgangssprachlich auch als Blutkrebs bezeichnet wird [2]. Eine Übersicht über die normale und die entartete Zellteilung zeigt **Abb. 1.1**. Die Hämatopoese beschreibt ein hierarchisches System von multipotenten Stammzellen des Knochenmarks, die durch Selbsterneuerung und Differenzierung verschiedene Arten von Vorläuferzellen hervorbringen. Dabei bilden die frühen hämatopoetischen Stammzellen Vorläuferzellen der lymphoiden und myeloiden Linie aus. Durch den Einfluss von zahlreichen Zytokinen wachsen diese zu ausgereiften Blutzellen heran, welche schließlich in den peripheren Blutkreislauf freigesetzt werden und/oder ins Gewebe migrieren [3-6]. Die einzelnen Zelltypen können während der Differenzierungsphase durch spezifische Oberflächenmarker charakterisiert werden. Dabei stellt CD34 (*cluster of differentiation 34*) den Hauptmarker für humane Stamm- und Vorläuferzellen dar [7].

Bei der Entstehung von Leukämie entarten lymphoide oder myeloide Vorläuferzellen aufgrund von genetischen Mutationen oder chromosomalen Translokationen (BCR/ABL1; AML1-ETO [8]) durch äußere (z.B. ionisierende Strahlung) oder innere Einflüsse zu leukämischen Stammzellen, welche sich im weiteren Verlauf zu unreif bleibenden Vorstufen (Blasten) entwickeln können. Eine genetische Prädisposition für die Entstehung von Leukämie wurde durch Studien ebenfalls bestätigt. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit chromosomalen Abnormalitäten, wie z.B. dem Down-Syndrom, ein signifikant höheres Risiko haben Leukämie zu entwickeln als gesunde Menschen [9, 10]. Genetische Mutationen, die zur Entstehung von Leukämie führen, betreffen meistens Gene, die eine

regulierende Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung oder der Apoptose spielen. Meistens wird dabei entweder ein Tumorsuppressor inaktiviert oder ein Proto-Onkogen zu einem Onkogen aktiviert, somit sind mehrere Mutationen in verschiedenen Genen notwendig, damit eine Zelle zu einer Krebszelle entartet. Leukämien zeichnen sich durch die Anhäufung von bösartigen und schnell proliferierenden Zellen aus, welche u.a. Defizite in der Induktion von programmiertem Zelltod aufweisen [11-13].

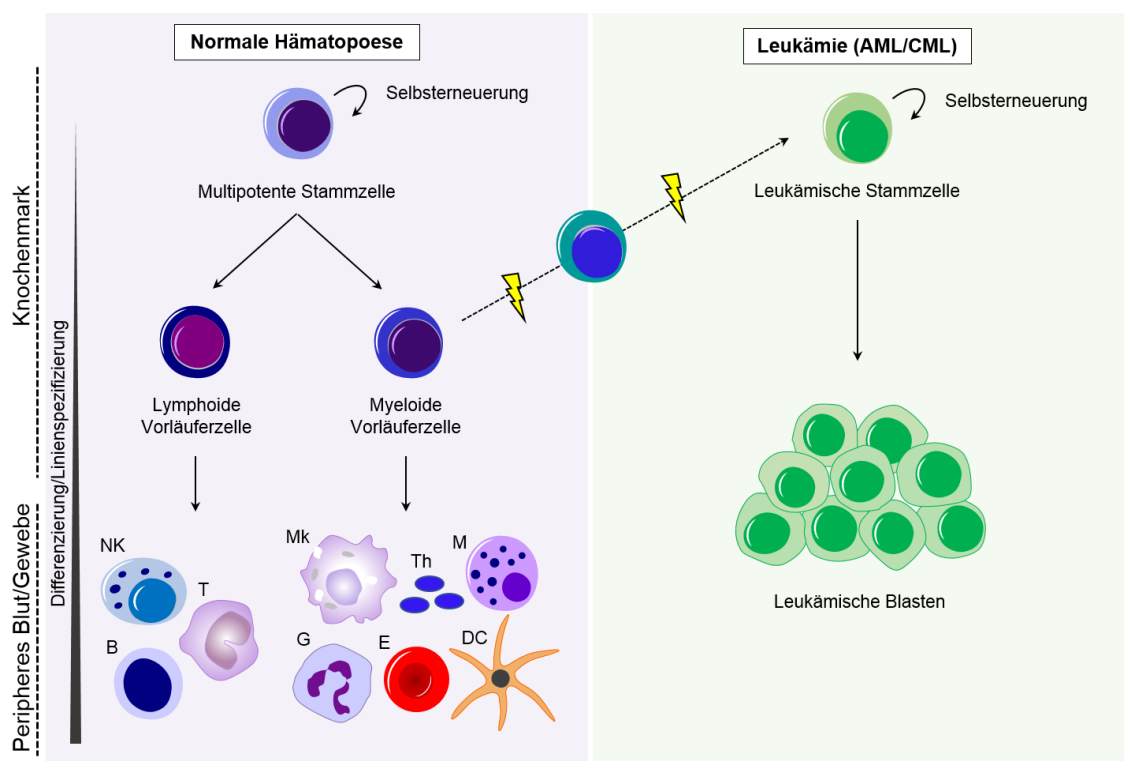


Abb. 1.1: Hierarchie des hämatopoetischen Systems und Entwicklung von Leukämie. In der frühen Hämatopoese teilt sich die multipotente Stammzelle, die in der Lage ist sich selbst zu erhalten, symmetrisch in Vorläuferzellen der lymphoiden und myeloiden Linie. Aus diesen Vorläuferzellen entstehen ausgereifte Blutzellen, wie Granulozyten (G), Makrophagen (Mk), Dendritische Zellen (DC), Thrombozyten (Th), Erythrozyten (E), Mastzellen (M), sowie NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten. Aufgrund von Mutationen (Blitz) kann sich aus einer myeloiden Vorläuferzelle eine Leukämienstammzelle entwickeln. Aus dieser können sich undifferenzierte und/oder funktionsgestörte Blasten entwickeln.

Je nach Verlaufsform und je nach dem welcher Zelltyp betroffen ist, werden Leukämien in akute und chronische lymphatischer Leukämien (ALL, CLL) sowie in akute und chronische myeloische Leukämien (AML, CML) unterteilt [14]. Bei der AML können sowohl Vorstufen der Leukozyten als auch der von Erythrozyten entarten. Ursprung bei der CML hingegen sind ausschließlich unreife Leukozyten. Charakteristisch für die CML ist eine abnorme Vermehrung der Granulozyten. Typische Symptome bei Leukämiepatienten sind u.a. Anämie oder exzessives Bluten aufgrund von Erythrozyten- oder Thrombozytenmangel. Zudem besitzen sie aufgrund des zellulären Reifungsdefizits ein defektes Immunsystem, welches ein effektives Bekämpfen von Infektionen unmöglich macht [15].

1.1.1 Chronische Myeloische Leukämie

Die Gesamtinzidenz beträgt in Deutschland bei CML jährlich 1,5 pro 100.000 Einwohner. Dabei treten die meisten Neuerkrankungen bei Erwachsenen im Alter von 60-80 Jahren auf [10]. Die CML wird laut der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation den myeloproliferativen Neoplasien zugeordnet. Diese Leukämieform kann in drei Krankheitsphasen unterteilt werden, in die chronische Phase, akzelerierte Phase und die Blastenkrise. Charakteristisch für die langsam verlaufende chronische Phase ist eine unkontrollierte Proliferation der Leukozyten im Knochenmark, welche ins Blut abgegeben werden. In dieser Phase ist die CML noch gut therapierbar. Schreitet die CML in die nächste, aggressivere Akzelerationsphase fort, so nimmt die Zahl an Granulozyten deutlich zu. Die Bildung von gesunden und funktionsfähigen Blutzellen im Knochenmark wird dadurch vermindert. In der dritten Phase der CML, der Blastenkrise, vermehren sich die Leukozyten im Knochenmark explosionsartig. Die Folge ist eine Anhäufung von Blasten, was zur Verdrängung von gesunden und funktionsfähigen Blutzellen im Blut führt. Unbehandelt geht die chronische und akzelerierte Phase in die Blastenkrise über, welche meist tödlich für CML Patienten verläuft. Aus diesem Grund besteht das primäre Ziel der CML-Therapie darin, den Übergang in die Blastenkrise zu verhindern [10].

Auf genetischer Ebene lässt sich CML durch das Philadelphia-Chromosom charakterisieren. Dieses stellt einen wichtigen Marker in der Diagnostik dar, das in fast 90% der CML-Patienten vorkommt [16-18]. Das Philadelphia-Chromosom $t(9;22)(q34;q11)$ kommt durch eine reziproke Translokation zwischen der *breakpoint cluster region* (BCR) auf Chromosom 22 Region 11 und dem Gen für das *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (ABL) auf Chromosom 9 Region q34 zustande. Dabei entsteht ein Onkogen, welches für das Fusionsprotein BCR/ABL kodiert [17]. Das unkontrollierte Wachstum der Leukämiezellen in der CML lässt sich auf diese konstitutiv aktive Tyrosinkinase zurückführen. Zugleich fördert BCR/ABL die Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Agenzien durch Aktivierung von verschiedenen Molekülen und Signalwegen (*downstream* Signalwege), wie MYC und JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) [18, 19].

1.1.2 Therapieoptionen für Chronische Myeloische Leukämie

Anfangs bestand die Therapie für CML-Patienten aus Bestrahlung der Milz und Behandlung mit Chemotherapeutika wie Busulfan und Hydroxyurea. Die beiden Medikamente halfen zwar die schnelle Vermehrung der Leukozyten in der chronischen Phase zu bremsen, jedoch beeinflussten sie den Verlauf der CML nicht grundlegend [20-26]. Die Einführung von allogener Stammzelltransplantation (aSZT) stellte eine wichtige Therapiemöglichkeit

für CML dar. Etwa 50% der unter 40-jährigen Patienten, die sich der aSZT unterzogen hatten, waren vollständig geheilt. Bestätigt wurde dies durch negative Ergebnisse für das BCR/ABL-Protein und das Philadelphia-Chromosom in behandelten Patienten [20, 21, 24-26]. Eine weitere Behandlungsmethode für CML-Patienten basierte auf humanem rekombinanten Interferon-alpha (rIFNa). Auf rIFNa sprachen 15-30% der Patienten zytogenetisch sehr gut an und auch die Überlebensrate war höher als nach konventioneller Chemotherapie [27, 28].

Der Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKi) Imatinib-Mesylat (Imatinib) in den späten 90er Jahren erwies sich als sehr vielsprechend in der Therapie von CML [21, 29]. Imatinib hemmt die BCR/ABL Tyrosinkinase spezifisch, in dem es kompetitiv an die ATP Bindestelle der ABL-Kinase Domäne bindet. Auf diese Weise werden von BCR/ABL aktivierte Moleküle und Signalwege (*downstream* Signalwege) gehemmt, wodurch das Zellwachstum gestoppt bzw. die Apoptose induziert wird [27]. Imatinib als Standardmedikament für CML ist sehr sicher und hat sehr wenige Nebenwirkungen. Die Überlebensrate in CML-Patienten mit Imatinib als Erstlinienmedikament lag bei 86% und das Fortschreiten in die nächsten Phasen konnte ebenfalls zu 93% reduziert werden [30]. Seit der Einführung von Imatinib ist die Gesamtüberlebensrate von Philadelphia-Chromosom-positiven CML- und ALL-Patienten erheblich gestiegen [31]. Dennoch kommt es bei einigen CML-Patienten zu einem Rückfall aufgrund von initialer oder mit der Zeit erworbener Resistenz gegenüber dem TKi [32]. Die häufigste Ursache für den Verlust der TKi-Sensitivität ist das Auftreten von Punktmutationen innerhalb der BCR/ABL-Kinase Domäne, welche eine reduzierte Bindeaffinität von Imatinib zur Folge hat [33]. In diesen Fällen werden die Patienten mit TKis der zweiten Generation, wie Nilotinib oder Dasatinib, behandelt. Diese haben sich in Phase III klinischen Studien inzwischen als vielversprechender erwiesen. Deshalb wurden diese neuen TKis von der *Food and Drug Administration* (FDA) nun als Erst- und Zweitlinientherapien für Philadelphia-Chromosom-positive CML-Patienten in der chronischen Phase zugelassen [32, 34, 35]. Mit der revolutionären Entwicklung von TKis stehen heute molekular zielgerichtete Medikamente zur Verfügung, die in vielen Fällen eine normale Lebenserwartung trotz CML ermöglichen [10].

1.2 Histondeacetylasen und Histondeacetylase-Inhibitoren

1.2.1 Die Familie der Histondeacetylasen

In eukaryotischen Zellen sind DNA, Histone und Histon-ähnliche Proteine zu sogenannten Nukleosomen verpackt, welche die fundamentalen Einheiten des Chromatins bilden. Die Histone stellen die Hauptproteinkomponenten des Chromatins dar, um die die DNA gewickelt ist. Histone können an den terminalen Seitenketten der Aminosäuren und an den

globulären Domänen posttranslational modifiziert werden. Zu den posttranslationalen Modifikationen zählen u.a. die Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung sowie die Sumoylierung [36, 37]. Die Acetylierung von Proteinen, als einer der am häufigsten in Eukaryoten auftretenden posttranslationalen Modifikationen, ist ein umkehrbarer hoch dynamischer Prozess, der durch die Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird [37, 38]. Dabei katalysieren HATs die kovalente Bindung von einer Acetyl-Gruppe (Ac) aus dem Acetyl-Coenzym A (Ac-CoA) an die ϵ -Amino-Gruppe der Aminosäure-Seitenkette von Lysin, während HDACs die Acetyl-Gruppe in einer hydrolytischen Reaktion entfernen (**Abb. 1.2**). Aufgrund der Acetylierung nimmt die positive Ladung von Histon-Enden ab, was eine reduzierte Interaktion mit dem negativ geladenen DNA-Gerüst sowie reduzierte internukleosomale Interaktion zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer offenen Chromatinstruktur, die eine Bindung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren an die DNA und somit eine Aktivierung der Transkription ermöglicht [36, 39].

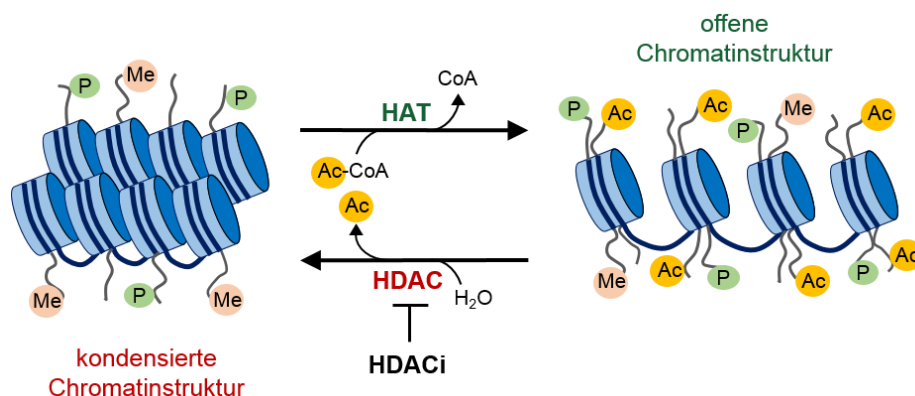


Abb. 1.2: Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und Histon-Deacetylierung. Histonacetyltransferasen (HATs) katalysieren den Transfer von Acetyl-Gruppen (Ac) aus Acetyl-Coenzym A (Ac-CoA) auf die ϵ -Amino-Gruppe der Aminosäure-Seitenkette von Lysin. Die Folge ist eine offene Chromatinstruktur. Die Umkehrreaktion wird von Histondeacetylasen (HDACs) ausgeführt. Dabei entfernen HDACs die Acetyl-Gruppe in einer hydrolytischen Reaktion, was zu einer kondensierten Chromatinstruktur führt. Die pharmakologische Hemmung von HDACs durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) bewirkt eine Acetylierung von Proteinen und somit eine offene Chromatinstruktur; Ac, Acetylierung; Me, Methylierung; P, Phosphorylierung.

Im Gegensatz dazu, kann die Aktivität von HDACs zu einer kondensierten Chromatinstruktur und somit zu einer Unterdrückung der Transkription führen [40]. Allerdings zeigen Versuche, bei denen HDACs gehemmt wurden, dass die Regulation der Gen- und Proteinexpression durch HDACs wesentlich komplexer ist [37, 41-43].

Die erste Deacetylase-Aktivität wurde 1969 beschrieben [44], kurz nach Entdeckung der Histon-Acetylierung und deren potentieller Rolle für die Genexpression [45-47]. Da Histone als erste Substrate für Deacetylasen identifiziert wurden, erhielten diese Enzyme den Namen Histondeacetylasen. Die stetig steigende Anzahl an identifizierten Nicht-Histon-Substraten der HATs und HDACs führte dazu, dass Histone nicht mehr als

Hauptziele dieser Enzyme gelten [45, 48-50]. Neben der Rolle in der Genexpression, wurden nun auch zahlreiche andere biologisch wichtige Funktionen der HDACs identifiziert. Die Modifikation von Nicht-Histon Substraten kann eine Rolle in der Regulation der Lokalisierung, Stabilität, Aktivität und Interaktion von Proteinen, sowie der Weiterleitung von Signalen spielen. Deshalb steht eine Fehlregulation der HDACs im Zusammenhang mit der Krebsentstehung [37, 45, 48, 49, 51, 52].

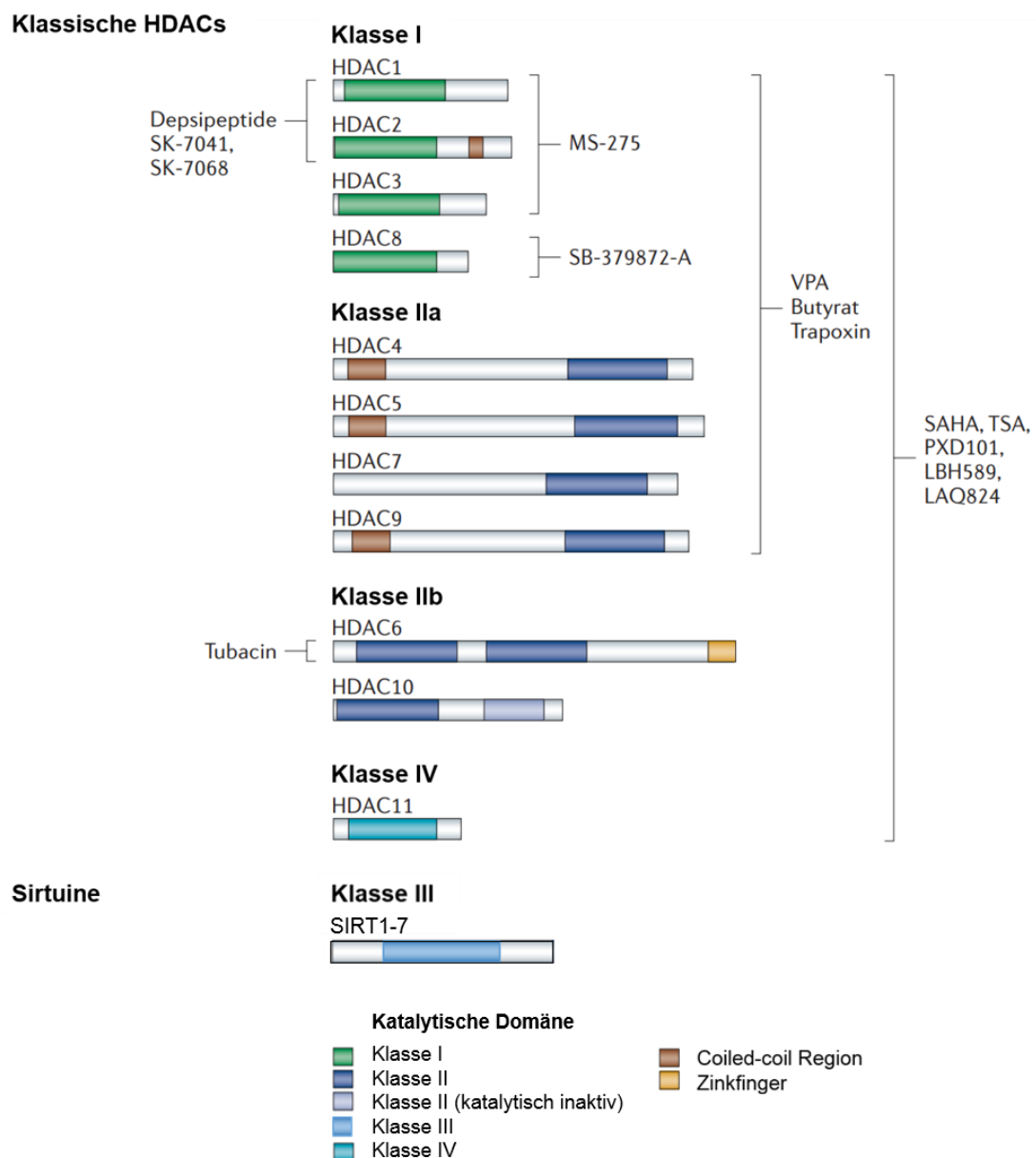


Abb. 1.3: Die Familie der Histondeacetylasen. Die humanen HDACs werden in vier Klassen unterteilt. Klasse I, II und IV zählen zu den klassischen Zink-abhängigen HDACs, Klasse III dagegen beinhaltet die NAD⁺-abhängigen Sirtuine. Spezifische HDACi sind ebenfalls dargestellt. SAHA, Superoylanilid-Hydroxaminsäure; TSA, Trichostatin A; VPA, Valproinsäure; modifiziert nach [53].

Bisher wurden 18 humane HDACs identifiziert, die in klassische HDACs und in Sirtuine eingeteilt wurden (**Abb.1.3**). Die Einteilung erfolgte basierend auf der strukturellen Verwandtschaft zu den Homologen der Deacetylasen in der Hefe, der subzellulären

Lokalisation, sowie der enzymatischen Aktivität. Die katalytische Aktivität der klassischen HDACs ist von Zink [37, 54] und die der Sirtuine von NAD⁺ abhängig [55, 56]. Aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung werden die HDACs weiter in vier Klassen eingeteilt [57]. Die klassischen HDACs werden in Klasse I, II und IV unterteilt. Klasse I HDACs (HDAC1, 2, 3 und 8) sind Protein-Orthologe der Hefe Deacetylase RPD3. Diese HDACs sind ubiquitär exprimiert und kommen vorwiegend im Zellkern vor [58]. Klasse II HDACs werden in die Unterklassen IIa (HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10) und IIb (HDAC6 und HDAC10) eingeteilt. Dabei zeigen Klasse IIa HDACs Homologien zu dem Hefe HDA1 Protein. Diese Enzyme können sowohl im Zellkern, als auch im Zytosol detektiert werden. Klasse IIb HDACs hingegen sind im Zytosol zu finden. HDAC6 besitzt zwei katalytische Domänen und HDAC10 eine Kat- und eine Pseudodomäne [59]. Dabei weist HDAC6 Substratspezifität mit der Deacetylase-Domäne des Zytoskelettproteins α -Tubulin auf [60]. Klasse III repräsentiert die ubiquitär exprimierten Sirtuine (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7), die homolog zu Sir2 (*silent information regulator 2*) der Hefe sind [61, 62]. Es ist bekannt, dass SIRT1 durch Deacetylierung von p53 dessen Tumorsuppressor-Aktivität unterdrückt [63]. Klasse IV besteht bisher nur aus HDAC11. Da dieses Enzym zu den beiden Hefe Deacetylase RPD3 und HDA1 Sequenzhomologien aufweist, wird es in eine separate Gruppe untergliedert [57, 58, 64].

1.2.2 Histondeacetylase-Inhibitoren

Derzeit gibt es eine Vielzahl an natürlich abgeleiteten und synthetisch hergestellten Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) mit unterschiedlichen Strukturen und Spezifitäten gegenüber den einzelnen (klassischen) HDACs [50]. Die HDACi werden entsprechend ihrer Struktur in folgende Kategorien eingeteilt: Carboxylsäuren, Benzamide, zyklische Peptide und Hydroxamsäure-Derivate (**Tab. 1.1**) [65].

Tab. 1.1: Ausgewählte HDACi und deren Zugehörigkeit zu den verschiedenen Klassen (modifiziert nach [65])

Klasse	HDACi
Carboxylsäuren	Butyrat, VPA
Benzamide	MS-275
Zyklische Peptide	Romidepsin/FK228, Depsipeptide, SK-7041, SK-7068
Hydroxamsäure-Derivate	TSA, SAHA, LBH589, Tubacin, Belinostat

Dabei stellen Trichostatin A (TSA), Vorinostat/SAHA oder Panobinostat/LBH589 eher unspezifische HDACi dar. Da diese HDACi alle klassischen HDACs hemmen können, werden sie auch als pan-HDACi bezeichnet. Entinostat/MS-275 inhibiert ausschließlich

Klasse I HDAC1-3 und Valproinsäure (VPA) hemmt Klasse I sowie IIa HDACs. Die höchste Substratspezifität besitzen Depsipeptide. Diese binden selektiv Klasse I HDAC1-3 (**Abb.1.3**) [50, 53, 66, 67]. Alle HDACi sind nach dem Pharmakophor-Modell aufgebaut (**Abb. 1.4**). Das Modell setzt sich aus einer Metall-Bindedomäne (ZnC), einer Linker-Einheit, sowie einer Oberflächendomäne (*Rim*) zusammen. Dabei kann ZnC das katalytische Zn^{2+} chelatieren und so die enzymatische Aktivität blockieren. Die Linker-Einheit imitiert die Substrat-Struktur und besetzt den katalytischen Kanal. Oberflächenkontakte mit dem „Kranz/Rand“ der katalytischen Tasche werden über den *Rim*-Anteil hergestellt [65].

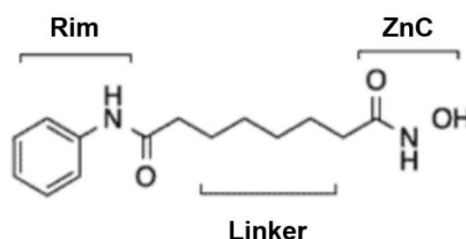


Abb. 1.4: Die Struktur von HDACi. Das Pharmakophor-Modell besteht aus drei Einheiten: Metall-Bindedomäne (ZnC), Linker-Einheit und Oberflächendomäne (Rim); modifiziert nach [68].

1.2.3 Histondeacetylase-Inhibitoren in der Krebstherapie

Die Entstehung von soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen wurde bisher überwiegend auf Genmutationen und Chromosomenabberationen zurückgeführt. Diese genetischen Defekte haben oftmals eine Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder eine Aktivierung von Onkogenen zur Folge [69, 70]. Eine zunehmende Anzahl an Studien belegt eine Korrelation zwischen epigenetischen Veränderungen und dem Entstehen und Fortschreiten von Tumorerkrankungen. So ist die Überexpression von Klasse I HDACs oftmals mit einem schlechterem Krankheitsverlauf und einer geringeren Überlebensrate assoziiert [71, 72]. Deshalb wurden HDACs als prognostische Marker und HDACi (**Abb. 1.3, Tab.1.1**) als vielversprechende Krebsmedikamente in Betracht gezogen [37, 53, 65, 66, 73-76].

Die anti-tumoralen Aktivitäten von HDACi sind in **Abb. 1.5** dargestellt. Auf molekularer Ebene moduliert die Hemmung von HDACs durch Veränderung der Chromatinstruktur die Genexpression bzw. das Transkriptom. Der Acetylierungsstatus von Nicht-Histonproteinen (p53, STAT1, Tubulin, HSP90, etc.) wird durch HDACi beeinflusst [53, 77-79]. Dadurch wird die Expression von vielen verschiedenen Genen aktiviert oder unterdrückt. Deshalb können HDACi ein breites Spektrum an biologischen Effekten induzieren, welche zur Aufhebung von entarteten, mit Krebs assoziierten epigenetischen Zuständen beitragen [65]. Derzeit werden zahlreiche HDACi in klinischen Studien getestet (**Tab. 1.2**). Dabei wurden SAHA (2006), Romidepsin (2009), Belinostat (2014) und LBH589 (2015) von der FDA bereits zur

Therapie von kutanen und peripheren T-Zell-Lymphomen (CTCL, PTCL) sowie von Multiplem Myelom zugelassen [66, 68, 80-83].

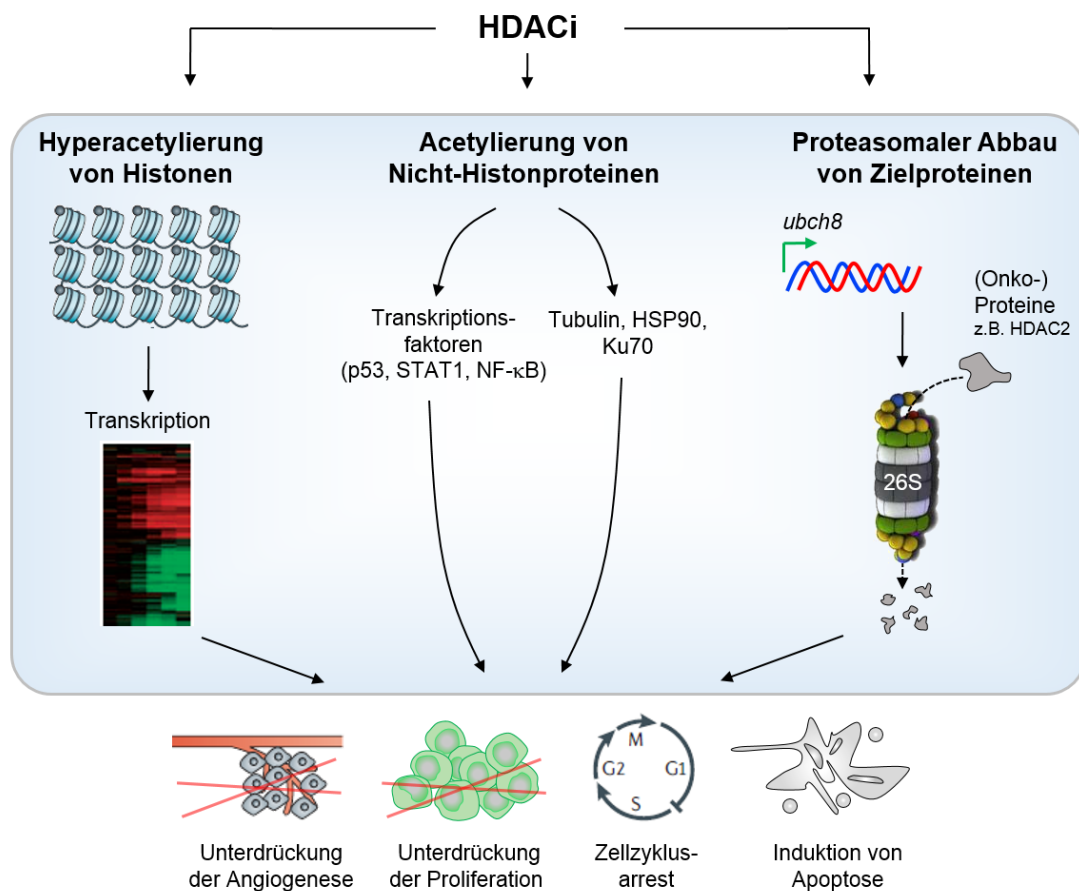


Abb. 1.5: Effekte von HDACi. Auf molekularer Ebene verändern HDACi die Chromatinstruktur und somit die Genexpression. Der Acetylierungsstatus von Nicht-Histonproteinen und die Proteinestabilität von bestimmten Zielproteinen, wie z.B. von HDAC2 [84], werden beeinflusst. Auf zellulärer Ebene bewirken HDACi eine Unterdrückung der Angiogenese, einen Proliferationsstopp, einen Zellzyklusarrest oder eine Induktion der Apoptose; modifiziert nach [53] und [77-79].

Die Proteinestabilität wird durch HDACi ebenfalls reguliert. Dabei findet eine verstärkte Aktivierung des proteasomalen Abbaus statt (**Abb.1.5**). Mechanistisch fördert z.B. die Induktion von UBCH8 (*ubiquitin-conjugating enzyme*, E2 Ubiquitin-Konjugase 8) zusammen mit den E3 Ubiquitin-Ligasen SIAH1/SIAH2 (*seven-in-absentia homologue 1/2*) oder RLIM (*ring finger protein 12, lim interacting*) den Abbau von Onkoproteinen [48, 66, 77, 78, 84-93].

Auf zellulärer Ebene können HDACi in Tumorzellen biologische Prozesse, wie Differenzierung, Zellzyklusarrest, Seneszenz, Apoptose, DNA-Schäden, ROS (*reactive oxygen species*), Proliferationsstopp oder eine Unterdrückung der Angiogenese auslösen (**Abb. 1.5**) [53, 94]. Leukämiezellen, die aufgrund von MDR1 (*multi drug resistance*) Resistenzen gegenüber vielen Standardchemotherapeutika zeigen, sprechen gut auf HDACi an [95]. Auch *in vivo* verringern HDACi Tumorangiogenese, Tumorinvasivität und

Metastasierung [37, 38, 65, 66, 74]. In ruhenden Tumorzellen mit einem geringen mitotischen Index können HDACi selektiv die Apoptose einleiten. Dabei wirken sie ausschließlich gegenüber Krebszellen zytotoxisch. Normale Zellen bleiben unbeeinflusst, da sie relativ resistent gegenüber HDACi sind [96]. Die selektive Toxizität gegenüber Tumorzellen lässt diesen Inhibitoren große pharmakologische Bedeutung zukommen. Deren zielgerichtete Zytotoxizität ist eine gute Voraussetzung für ihren klinischen Einsatz [37, 66, 74, 96].

Einige klinische Studien haben bereits gezeigt, dass HDACi als Monotherapie sehr effizient in Patienten mit Leukämie oder soliden Tumoren wirken [53, 97]. In Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika (Topoisomerase II-Inhibitoren, S-Phase-Inhibitoren, Alkylierende Agenzien, Proteasomale Inhibitoren, Strahlung, Todesrezeptor-Agonisten) hingegen, erwiesen sich HDACi als besonders effizient [98-105]. Ausgewählte klinische Studien sind in **Tab. 1.2** aufgeführt.

Tab. 1.2: Ausgewählte klinische Studien mit HDACi und in Kombinationsbehandlung mit anderen Chemotherapeutika (modifiziert nach [106])

HDACi/Chemotherapeutika	Phase	Krebsart
SAHA	zugelassen	CTCL
SAHA/Doxorubicin	I	Solide Tumore im fortgeschrittenen Stadium
SAHA/Bortezomib	II	NSCLC
SAHA/ Rituximab	II	Lymphom, Leukämie
VPA	III	Gebärmutterhalskrebs, Ovarialkarzinom
VPA/Temozolomid	II	Glioblastom
VPA/Decitabin	I/II	Leukämie
LBH589	zugelassen III	Multiples Myelom CTCL
LBH589/Sorafenib	I	Leberzellkarzinom, Nieren- und Weichteilkarzinom
LBH589/Ipilimumab	I	Melanom
FK228	zugelassen	CTCL
FK228/Carfilzomib	I/II	Rückfälliges/Refraktäres PTCL
Belinostat	zugelassen	PTCL
Belinostat/Doxorubicin	I/II	Weichteilsarkom
Belinostat/Carboplatin und/oder Paclitaxel	I	Solide Tumore
MS275	II	Hodgkin Lymphom, Lungenkrebs, Brustkrebs
MS-275/Sorafenib Tosylat	I	Solide Tumore, AML
MS-275/Pembrolizumab	I	Solide Tumore im fortgeschrittenen Stadium
MS-275/Nivolumab	II	NSCLC
MS-275/Atezolizumab	I/II	Brustkrebs

Viele klinische Studien mit HDACi sind noch nicht abgeschlossen [50]. So befindet sich z.B. MS-275, ein Klasse I-spezifischer HDACi, noch in klinischer Entwicklung [107]. MS-275 wird derzeit in Phase I/II Studien untersucht. Dabei wird MS-275 als Monotherapie u.a. in Patienten mit lokal wiederkehrendem oder metastatischem Brustkrebs getestet. Die Wirksamkeit von MS-275 in Kombination mit Pembrolizumab, einem *Checkpoint*-Inhibitor (PD-1-Inhibitor), wird aktuell in Patienten mit Lungenkrebs (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), Dickdarmkrebs, Melanom oder refraktärem und rückfälligem Lymphom, untersucht [108].

Neben der Hemmung Zink-abhängiger HDACs können auch Sirtuine interessante pharmakologische Zielstrukturen darstellen. So führten z.B. Studien mit MHY2256, einem neuen SIRT-Inhibitor, in humanen Brustkrebszellen (MCF-7) ebenfalls zu Zellzyklusarrest (G1), zur Zunahme der Apoptose, sowie zur Reduktion der Proteinexpression von SIRT1-3. In einem Tumor Xenograft Model von MCF-7 Zellen konnte nach Behandlung mit MHY2256 ein vermindertes Tumorwachstum beobachtet werden. Dabei lassen sich die Effekte von MHY2256 in MCF-7 Zellen auf die Acetylierung von p53, einem Zielgen von SIRT, zurückführen [109].

1.3 DNA-Schäden, Ursachen, Reparatur und Signalweiterleitung

1.3.1 DNA-Schäden und Reparaturmechanismen

DNA-Schäden sind maßgeblich an der Mutagenese, der Karzinogenese sowie an Alterungsprozessen beteiligt. Sie können sowohl durch exogene Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung und chemische Mutagene, als auch durch endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und chemische Reaktionen (Alkylierung/Desaminierung) verursacht werden. Zu den DNA-Läsionen zählen DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), DNA-Einzelstrangbrüche (ESBs) sowie Basenschäden in der DNA. Dabei wirken vor allem DSBs stark mutagen und zytotoxisch. Basenmodifikationen und ESBs werden über die Basenexzisionsreparatur repariert [110-112]. Die Reparatur von DSBs erfolgt entweder über die homologe Rekombination (HR) oder über die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous-endjoining*, NHEJ) [113]. Da die HR eine homologe Sequenz der Schadensregion benötigt, findet sie in der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus statt. Das NHEJ hingegen kann während des gesamten Zellzyklus der Zelle stattfinden und kommt überwiegend in der G1- und der G0-Phase des Zellzyklus vor. NHEJ hat im Gegensatz zur HR eine hohe Fehleranfälligkeit [114, 115]. Nicht reparierte DSBs können zu Mutationen, Krebs oder Zelltod führen. Als Marker für DSBs dienen z.B. die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139

(S139; p-S139-H2AX = γ H2AX) und die Bildung von Foci mit dem p53 Bindeprotein 53BP1 [116-118].

1.3.2 Replikativer Stress

Replikativer Stress entsteht während der DNA-Replikation durch DNA-Läsionen, durch Limitierung von DNA- und Chromatinkomponenten, wie Nukleotiden, Histonen und Histonchaperonen oder durch andere Ursachen, die das Fortschreiten der Replikationsgabel behindern [119, 120]. Zusätzlich können im Menschen sogenannte „empfindliche DNA Loci“ (*fragile sites*) replikativen Stress verursachen. *Fragile sites* werden in spät- und früh-replizierende *fragile sites* (*common fragile sites*, CFS; *early replicating fragile sites*, ERFS) unterteilt [121, 122]. CFS haben wenig aktive Replikationsursprünge, was dazu führt, dass an diesen Stellen vermehrt blockierte DNA-Polymerasen auftreten [123].

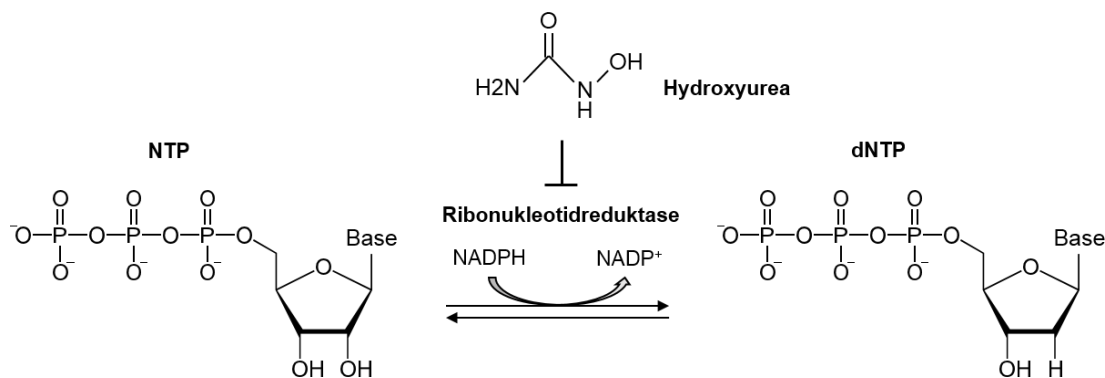


Abb. 1.6: Hemmung der Synthese von dNTPs mittels Hydroxyurea. Die reversible Umwandlung von Nucleotidtriphosphat (NTP) in Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP) wird durch die Ribonucleotidreduktase katalysiert. Dabei wird über Reduktion die 2'-Hydroxylgruppe am NTP entfernt und durch ein Wasserstoffatom ersetzt, wobei NADPH als Reduktionsmittel dient.

Hydroxyurea wurde früher als Standardmedikament gegen Leukämie verwendet [124, 125]. Das Medikament bewirkt hämatologische, jedoch keine zytogenetischen Remissionen, weshalb es heute nur zur initialen Zytoreduktion eingesetzt wird [126]. Molekular hemmt Hydroxyurea die Ribonucleotidreduktase (RNR), die für die Synthese der Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) verantwortlich ist (**Abb. 1.6**). Während der DNA-Replikation führt der Mangel an dNTPs zum Arrest der Zellen in der G1/S-Phase. Zusätzlich kommt es zu DSBs, die durch den Zusammenbruch von blockierten Replikationsgabeln entstehen und mithilfe der HR repariert werden [127-131]. Hydroxyurea ist weiterhin eine der am meisten eingesetzten Substanzen, um definiert replikativen Stress zu induzieren [127, 128, 132].

1.3.3 DNA-Schadensantwort

Die zelluläre DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) beginnt mit der Erkennung von DNA-Läsionen mithilfe von DNA-Schadenssensoren. Die Detektion von DSBs löst eine Signalkaskade aus, die letztendlich zum Zellzyklusarrest, zur DNA-Reparatur oder bei irreparablem DNA-Schaden zur Apoptose führt. Schlüsselrollen bei der DDR übernehmen folgende drei Signalproteine: ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) [133-135], ATR (*ATM-Rad3-related*) und DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) [136]. Diese drei DNA-Schadenssensoren werden der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks) zugeordnet [137].

DNA-PKcs bildet bei DSBs ein aktives Heterotrimer mit KU70-KU80, wodurch die DNA-Reparatur über die NHEJ initiiert wird. ATM wird durch den MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1) zum DSB rekrutiert und durch Autophosphorylierung am Ser1981 aktiviert, woraufhin die zuvor inaktiven ATM Homodimere in ihre Monomere dissoziieren [138]. Aktives ATM bindet an den MRN-Komplex und phosphoryliert *downstream* Zielproteine wie CHK2 (*checkpoint kinase 2*) an Threonin 68 (T68), Histon H2AX an S139 oder p53 an S15 [139-143]. Im Gegensatz zu ATM, das primär durch DSBs aktiviert wird, findet die Aktivierung von ATR in jeder replizierenden Zelle statt. Das bedeutet, dass ATR hauptsächlich nach replikativem Stress durch blockierte Replikationsgabeln, die vor allem an einzelsträngiger DNA entstehen, aktiviert wird [144-146]. Einzelsträngige DNA entsteht, wenn bei der Replikation trotz angehaltener DNA-Polymerase (aufgrund von dNTP-Mangel oder DNA-Läsionen) die DNA durch die DNA-Helikase weiter entwindet wird [119, 147]. Auch eine Endresektion von DSBs durch Nukleasen kann zur Entstehung von einzelsträngiger DNA führen [148]. Aktives ATR phosphoryliert seinerseits CHK1 (*checkpoint kinase 1*) an S317 oder S345, H2AX an S139 und p53 an S15 [139, 149-154].

Die Aktivierung von ATR ist in **Abb. 1.7** dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt die Erkennung von einzelsträngiger DNA durch RPA (*replication protein A*) [148]. Der Komplex aus RPA und einzelsträngiger DNA (ssDNA-RPA) löst die Rekrutierung von weiteren DDR Proteinen aus. ATR bindet mithilfe von ATRIP (*ATR-interacting protein*) an ssDNA-RPA [145, 155]. Dies führt zur trans-Phosphorylierung von ATR an T1989 [133, 156], was jedoch noch keine vollständige Aktivierung von ATR bewirkt [147, 157-159]. ATRIP beeinflusst auch die Stabilität von ATR [160]. Der heterotrimere ringförmige Komplex aus RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) wird zur DNA-Schadensregion rekrutiert. Der *clamp loader* RAD17-RFC (*RAD17-replication factor C*) bildet eine 5' Primer Verbindung an doppelsträngiger DNA, was für ssDNA-RPA charakteristisch ist [161]. Im nächsten Schritt lädt RAD17-RFC den 9-1-1-Komplex auf die DNA [162]. Der 9-1-1-Komplex ist für die Regulation von ATR durch die Rekrutierung des allosterischen Aktivators TOPBP1 (*topoisomerase binding protein 1*)

verantwortlich. TOPBP1 bindet an den 9-1-1-Komplex und an ATR, wodurch ATR vollständig aktiviert wird [163-166]. CHK1 als eines der wichtigsten *downstream* Zielgene von ATR kontrolliert durch Phosphorylierung von CDKs (*cyclin-dependent kinases*) den Zellzyklus [149, 151, 167]. Exzessive Aktivierung von Replikationsursprüngen und daraus resultierende DNA-Strangbrüche durch eine Erschöpfung des RPA Pools werden ebenfalls durch ATR verhindert [128, 168-170]. Aber auch ATM kann die Aktivierung von Replikationsursprüngen hemmen sowie Zellzyklusarrest und DSB-Reparatur über HR auslösen [149].

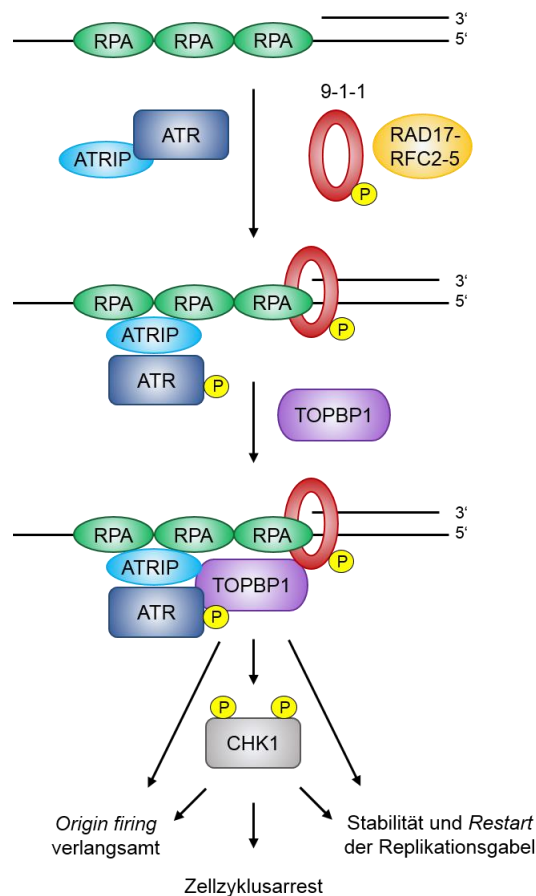


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Aktivierung von ATR. ATR-ATRIP und RAD17-RFC2-5 werden zum ssDNA-RPA-Komplex rekrutiert. ATRIP bindet an RPA, wodurch ATR an T1989 trans-phosphoryliert wird. RAD17-RFC2-5 sorgt dafür, dass der 9-1-1-Komplex auf die DNA geladen wird. 9-1-1 rekrutiert den ATR-Aktivator TOPBP1 zur DNA-Schadensregion. Die Bindung von TOPBP1 an 9-1-1 sowie an ATR löst die Phosphorylierung von ATR *downstream* Zielproteinen, wie von CHK1, aus. Die Aktivierung von ATR durch replikativen Stress oder DNA-Läsionen führt zur Hemmung der Aktivierung von DNA-Replikationsursprüngen (*Origin firing*), zum Zellzyklusarrest sowie zur Stabilisierung und zum Neustart der blockierten Replikationsgabel; modifiziert nach [149]

Dies zeigt, dass ATM, ATR und ihre nachgeschalteten Kinasen CHK1/CHK2 maßgeblich an der Erhaltung der Genomstabilität beteiligt sind. ATM Mutationen führen beim Menschen zur Ataxia telangiectasia (A-T) Erkrankung. A-T Patienten weisen eine erhöhte genomische Instabilität und somit ein erhöhtes Risiko der Krebsentstehung auf [135]. Mutationen im ATR-Gen verursachen im Menschen eine seltene und schwerwiegende

Entwicklungsstörung, namens Seckelsyndrom [171]. Zudem können ATR Mutationen (*loss of function*) das Tumorstadium von Melanomen fördern [172]. Ein Verlust von ATR sensitiviert Zellen gegenüber replikativen Stress, führt zu Defekten an Zellzyklus-Kontrollpunkten sowie zu Chromosomenabberationen [121, 173, 174]. Dauert die Aktivierung der DDR durch kontinuierlichen replikativen Stress an, so führt dies in der Zelle zu einem Zustand eines irreversiblen Zellzyklusarrests, oder zu zellulärer Seneszenz [175, 176]. Eine Deletion von ATR wirkt sich in der frühen Embryonalentwicklung von Mäusen letal aus. Dies liegt an dem Verlust von genomischer Integrität [177]. Allerdings kann eine Überexpression von RRM2 (*ribonucleotide reductase M2*) ein ATR-Defizit teilweise ausgleichen [178, 179]. Dies spricht für eine kritische Rolle von ATR im Nukleotidhaushalt. Zu den Substraten von ATM, ATR und DNA-PKcs zählen auch DNA-Reparaturproteine. So können NBS11, BRCA1 und c-ABL von ATM phosphoryliert werden [180-184]. Die katalytische Untereinheit DNA-PKcs kann ebenfalls c-ABL aktivieren. Aktives c-ABL kann wiederum RAD51 aktivieren, ein essentieller Faktor der HR, oder über p73 Apoptose induzieren [185-187]. Insgesamt können die drei Signalproteine über 700 Proteine aktivieren, die in der Regulation von Zellzyklusarrest, Zelltod oder DNA-Reparatur involviert sind [135, 188, 189]. Neben spezifischen Zielgenen, besitzen ATM und ATR auch überlappende Zielgene. Folglich können beide Signalwege nicht strikt voneinander getrennt werden. Auch die Prozessierung von dem DSB-Schadensbereich und der Zusammenbruch der blockierten Replikationsgabeln können die Aktivierung der jeweils anderen Kinase auslösen. Ebenso gibt es Studien, die zeigen, dass ATM nach replikativem Stress direkt von ATR phosphoryliert werden kann [190, 191].

Wird die DDR durch DSBs oder blockierte Replikationsgabeln aktiviert, so können ATM, ATR und DNA-PKcs das Histon H2AX in direkter Umgebung des DNA-Schadens phosphorylieren [116, 117, 139]. Weitere Faktoren wie Artemis, 53BP1 und MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) werden durch ATM und ATR ebenfalls aktiviert. Die Interaktion von MDC1 und γ H2AX führt zur Stabilisierung von ATM und dem MRN-Komplex am DSB. Dadurch wird das Chromatin so strukturiert, dass eine Rekrutierung und Anlagerung von weiteren DDR-Faktoren und DNA-Reparaturproteinen an die DNA-Schadensregion erleichtert wird. γ H2AX stellt somit nicht nur einen Marker für DSBs dar, sondern ermöglicht als Vermittler der DDR auch eine effiziente Reparatur und Signalweiterleitung [149, 152, 189, 192, 193].

Defekte in der DDR können zu Genom- und Epigenominstabilität führen, die letztendlich die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, Immundefizienzen sowie Krebs fördern [194-196]. Epigenetische Regulatoren, wie HATs und HDACs, spielen eine wichtige Rolle in der DDR und der DNA-Reparatur. Diese Enzyme sind oft in

DNA-Schadensregionen vorzufinden [197]. So fördert z.B. durch TIP60 acetyliertes Histon H2AK15 die DSB-Reparatur mittels HR. Dabei verhindert H2AK15ac die Ubiquitylierung von der E3 Ubiquitin Ligase RNF168, wodurch die Rekrutierung von 53BP1 gehemmt wird [198]. Unter den HDACs spielen insbesondere HDAC1 und HDAC2 eine zentrale Rolle in der DDR. Dabei sind sie z.B. in der Regulation der Acetylierung von Histon H3K56 und Histon H4K16 involviert. HDAC1 und HDAC2 werden rasch zur Schadensregion rekrutiert, um die DSB-Reparatur mittels NHEJ durch Deacetylierung von H3K56 und H4K16 zu fördern. Demnach führt eine Depletion von HDAC1 und HDAC2 zu einer Sensitivierung von Zellen gegenüber IR aufgrund von defizienter DSB-Reparatur (NHEJ) und anhaltendem DNA-Schaden [199]. HDACi können in soliden Tumorzellen und in Leukämiezellen die Reparaturkapazität unterdrücken, u.a. durch reduzierte Expression oder posttranslationale Modifikation von essentiellen Reparaturproteinen, wie KU70/80 in NHEJ oder RAD50/RAD51 in HR [200-204]. Weitere Beispiele für Effekte auf die DDR durch HDACi und/oder Chemotherapeutika in verschiedenen Krebsarten sind in **Tab. 1.3** aufgeführt.

Tab. 1.3: Effekte auf DDR durch HDACi (modifiziert nach [205])

Abkürzungen: c.t., Kombinationsbehandlung; IR, ionisierende Strahlung; IRI, ionisierende Strahlung induzierte; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; s.c., subkutanes Xenograft Tumor Model; Ara-C, Cytarabin; DR, Daunorubicin; 5-FU, 5-Fluorouracil; OS, Osteosarkom; RMS, Rhabdomyosarkom; MM, Multiples Myelom. (-) Abnahme und (+) Zunahme des Levels.

Target HDACs	HDACi	getestete Krebsart	Effekte auf DDR	Referenzen
Klasse I/II	SAHA	OS/RMS, MM, Prostata/Gliom, Lunge, Melanom	IR Sensitivität; (-) HR und NHEJ Proteine, z.B. RAD50, KU70; (+) IRI γ H2AX Foci; (-) IRI HR und NHEJ Proteine, z.B. RAD51, KU80	[200, 201, 203, 206, 207]
Klasse I	FK228	Eierstock	(+) γ H2AX/RAD51/53BP1 Foci mit Cisplatin c.t., und im s.c.	[208]
		Lunge	IR Sensitivität; (+) IR- γ H2AX	[209]
Klasse I/II	Belinostat	Schilddrüse	(+) γ H2AX/ROS; (-) KU70/80 und RAD51; (+) γ H2AX im s.c.	[210]
		Niere	(+) γ H2AX/ROS mit 5-FU c.t. und im s.c.	[211]
Klasse I/II	LBH589	Lunge, Blase	IR Sensitivität; (+) IR- γ H2AX; (-) MRE11/NBS1/RAD51 Protein	[212, 213]
		Leukämie (AML)	(+) γ H2AX; (-) DNA-Reparaturproteine/Signalkaskade, z.B. BRCA1, CHK1, RAD51 mit Ara-C oder DR c.t.	[214]

Meine Arbeitsgruppe hat aufgedeckt, dass HDAC1 und HDAC2 auch in Darmkrebszellen für die replikative Stressantwort und somit für die Erhaltung der Phosphorylierung von ATM und CHK1/2 essentiell sind. HDAC1 und HDAC2 hemmen die Expression von PR130, einer regulatorischen Untereinheit der PP2A (*protein phosphatase 2 regulatory subunit A*) Phosphatase. Die Applikation von MS-275 sensitiviert Darmkrebszellen gegenüber

Hydroxyurea, indem es die Expression von PR130 und somit die Dephosphorylierung von ATM, CHK1 und CHK2 fördert. Eine genetische Elimination von PR130 führt zum Verlangsamen der G1/S Transition und zur Zunahme an p-CHK1, RPA Foci und DNA-Schaden nach Hydroxyurea Behandlung. Die Folge ist eine Induktion von Apoptose sowie eine Reduktion des HR-Reparaturproteins RAD51.

1.3.4 Inhibitoren gegen *Checkpoint*-Kinasen

Die *Checkpoint*-Kinasen ATR und CHK1 nehmen in der DDR eine Schlüsselrolle ein. Die DDR dient dazu bei DNA-Schädigung durch Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose die DNA-integrität aufrechtzuerhalten und so die Transformation von Zellen zu verhindern [215]. Wie bereits erwähnt, gilt replikativer Stress aufgrund der Erzeugung von ssDNA als Hauptauslöser des ATR-CHK1 Signalwegs. Es wird berichtet, dass die Aktivierung von Onkogenen, wie MYC, BCR/ABL oder FLT3/ITD, durch Induktion von Replikationsstress ein verändertes Expressionsmuster von DDR-Proteinen hervorruft. In Tumorzellen kann häufig eine Hyperaktivierung von DDR-Proteinen beobachtet werden, wodurch die Zellen der hohen Proliferationsrate gerecht werden. Ein Beispiel dafür, ist die Induktion von ATR und CHK1 in MYC-abhängigen B-Zell-Lymphomzellen [216-218]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ATR und CHK1 BCR/ABL-positive Leukämiezellen vor der Zytotoxizität von *Cross-linking* Agenzien, wie Mitomycin, schützen, indem sie die Zellzyklusprogression verlangsamen und der Zelle ermöglichen die induzierten DSBs zu reparieren [219]. Deshalb werden ATR und CHK1 in der Krebstherapie als vielversprechende Zielgene betrachtet. Aufgrund der zentralen Rolle in der DDR, wurden verschiedene Inhibitoren gegen *Checkpoint*-Kinasen entwickelt, um spezifisch die Mechanismen zu hemmen, die von Tumorzellen als Antwort auf DNA-schädigende Substanzen aktiviert werden [220]. Anfangs wurden diese Inhibitoren entwickelt, um Tumore und Leukämien mit mutiertem p53 zu behandeln, weil sie einen defekten G1/S *Checkpoint* besitzen. Danach wurden diese Art von Inhibitoren auch auf Krebsarten mit wildtypischem p53 ausgeweitet [221, 222].

Als erster selektiver ATRi sensitivierte VE-821 Leukämiezellen gegenüber IR [223, 224]. Die Verwendung von ATRi in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika (IR, Gemcitabin, PARPi, Topoisomerase I-Inhibitor, Etoposid, Oxaliplatin) in vitro und in vivo bestätigten die gesteigerte Anti-Tumoraktivität in zahlreichen Tumorarten [225-227]. MK-8776 ist ein selektiver CHK1i, der sich aktuell in klinischer Entwicklung befindet. Dieser CHK1i zeigte in verschiedenen Tumorarten ebenfalls eine Chemosensitivierung, was auf der erhöhten Menge an DSBs beruht. Derzeit wird MK-8776 in Phase II der klinischen Studien in Kombination mit diversen Chemotherapeutika weiter untersucht [228-231].

Außerdem sensitiviert MK-8776 AML Zellen gegenüber dem HDACi SAHA unabhängig vom mutierten p53 Status. Dabei wird der Intra-S *Checkpoint* aufgehoben, Proteine der DNA-Replikation und Reparatur herunterreguliert und dadurch mehr γ H2AX generiert und Apoptose eingeleitet [231].

1.4 Zellzyklus

In Eukaryoten kann der Zellzyklus in zwei Perioden unterteilt werden, in die Interphase und die Mitose. Die Interphase ist gekennzeichnet durch Zellwachstum und Stoffwechselaktivität. Auf die Interphase folgt die Mitose, die Phase der Kernteilung (Karyokinese), welche sich weiter in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase untergliedern lässt. In der Mitose findet eine Verdopplung des Chromosomensatzes sowie dessen Verteilung auf die Zellkerne der potentiellen Tochterzellen statt. Anschließend kommt es zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen (Zytokinese) [232]. Die Interphase kann weiter in die G1-Phase (*gap1*), S-Phase (Synthese) und G2-Phase (*gap2*) unterteilt werden (**Abb. 1.8**). Der Übergang von der einen in die nächste Phase ist abhängig von der korrekten Zellzyklusprogression und dem Abschluss der vorherigen Phase. Bevor die Zelle in die S-Phase übergeht, durchläuft sie den Restriktionspunkt. An diesem *Checkpoint* (G1-S) wird entschieden, ob der Zellzyklus weiter durchlaufen wird oder ob die Zelle in die G0-Phase eintritt. Dabei gehen nur Zellen, die die Teilung temporär oder reversibel gestoppt haben, in die G0-Phase, einen Zustand der Quieszenz (Ruhe), über. Die terminale Differenzierung von Zellen findet ebenfalls aus der G0-Phase heraus statt [232].

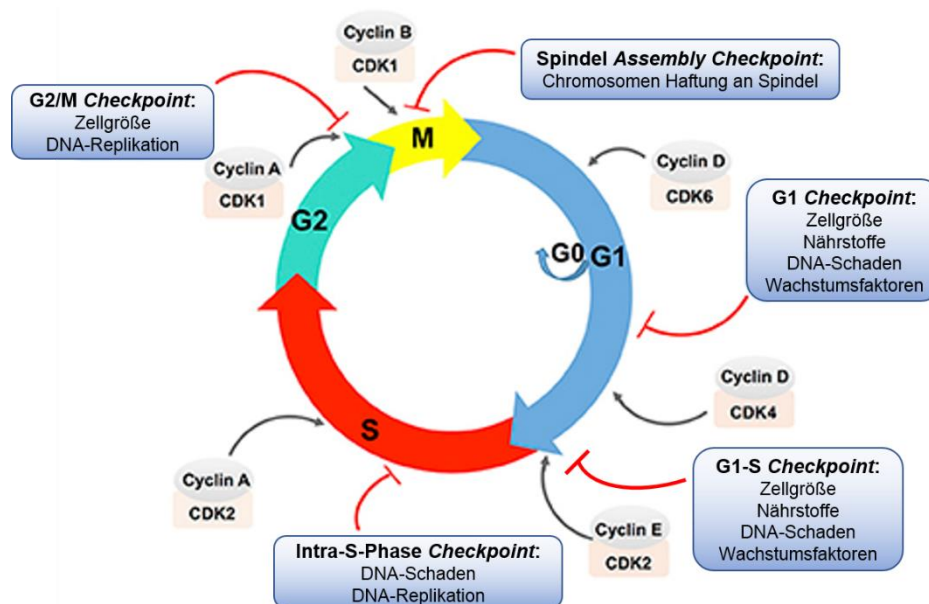


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des Zellzyklus und dessen Regulation. Der Zellzyklus wird unterteilt in die G1-, S-, G2-Phase und die Mitose (M). Die Zelle kann in den Ruhezustand (G0) eintreten. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über Cyclin-CDK Komplexe. Diese werden in jeder Phase durch bestimmte *Checkpoints* kontrolliert. Die *Checkpoints* können durch verschiedene Faktoren aktiviert werden; modifiziert nach [233].

Eine zentrale Rolle im Zellzyklusprozess nehmen CDKs ein. Diese bilden Komplexe mit Cyclinen. CDKs werden durch Cycline phosphoryliert, aktiviert und stabilisiert. Sie sind verantwortlich für die G1-S und G2-M Transition. Die Expression der Cycline wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie p53, p21 und CDC25, reguliert. CDKs können nach Aktivierung bestimmte nachgeschaltete Proteine, wie pRb (*retinoblastoma protein*) und E2F, phosphorylieren. In jeder einzelnen Zellzyklusphase werden bestimmte CDKs und Cycline exprimiert und aktiviert. Die Cyclin-CDK Komplexe werden durch bestimmte *Checkpoints* reguliert (**Abb. 1.8**). Diese *Checkpoints* werden u. a. durch beschädigte DNA oder unvollständig abgelaufene DNA-Replikation aktiviert. Es folgt eine Hemmung der CDK-Aktivität, was zur Verzögerung der Zellzyklusprogression führt, bis die DNA-Reparatur erfolgt oder die DNA-Replikation abgeschlossen ist. Die Inaktivierung der CDKs erfolgt durch Ubiquitinierung und Abbau von Cyclinen [167, 232, 234, 235].

1.5 Apoptose

Apoptose ist ein streng regulierter physiologischer Prozess, wodurch geschädigte Zellen durch programmierten „Selbstmord“ beseitigt werden. Geschädigte Zellen können u.a. durch Mutationen, virale Infektionen oder durch Gentoxine entstehen [236]. Diese Form des programmierten Zelltodes geschieht zum Schutz des Gesamtorganismus. Die Apoptose spielt bei vielen verschiedenen physiologischen Prozessen eine große Rolle. Dazu zählt die embryonale Entwicklung, die Differenzierung von Organen, die Entwicklung des Immunsystems, sowie die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase [237, 238]. Eine Fehlregulation der Apoptose kann zu malignen Entartungen oder Autoimmunerkrankungen führen [239]. Morphologisch lassen sich apoptotische Zellen durch Kondensation des Chromatins, Blasenbildung der Membran, Verringerung des Zellvolumens, sowie durch Fragmentierung der DNA charakterisieren. Die intakten Organellen und die durch Endonukleasen fragmentierte DNA werden in Vesikel (apoptotische Körperchen) verpackt und durch Phagozytose ohne Entzündungsreaktion beseitigt. Die Apoptose kann entweder über den intrinsischen mitochondrial vermittelten Signalweg oder über den extrinsischen Rezeptor-vermittelten Signalweg stattfinden. Die Induktion von Apoptose kann durch DNA-Schäden infolge von physikalischen/chemischen Noxen oder durch eine nicht korrekt verlaufende Zellteilung erfolgen. Beide Signalwege führen zu einer Aktivierung von Initiatorcaspasen mittels Oligomerisierung und Spaltung. Die Initiatorcaspasen aktivieren ihrerseits Effektorcaspasen. Diese sind sowohl für den Abbau von Zellbestandteilen, als auch indirekt für die Fragmentierung der DNA verantwortlich [236, 240]. Der apoptotische Prozess wird entsprechend in eine Initiator-, eine Effektor- und eine Degradationsphase unterteilt [241]. Im Folgenden wird näher auf den intrinsischen Signalweg eingegangen.

1.5.1 Intrinsischer Apoptoseweg

Eine Induktion des intrinsischen Wegs (**Abb. 1.9**) durch ein Stresssignal hat zunächst eine Veränderung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP) zur Folge. Die Regulation dieser Art der Apoptoseaktivierung erfolgt durch die Proteine der BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) Familie. Die BCL-2 Mitglieder lassen sich nach ihrer Funktion in pro- und anti-apoptotische Proteine unterteilen. Die pro-apoptotischen Faktoren lassen sich in Proteine mit Multi-Domänen, wie BAX und BAK, sowie in Proteine mit einer BH3-only (*BCL2 homology 3 only*) Domäne unterteilen. Zu den Pro-apoptotischen BH3-only Proteinen zählen u.a. BAD, BIM (*B cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death*), PUMA und NOXA. Anti-apoptotische Faktoren sind BCL-2, BCL-XL und MCL-1 [242, 243]. Diese hemmen die Freisetzung von Cytochrom c, indem sie durch Interaktion die Aktivierung von BAX und BAK blockieren. Die BH3-only Proteine agieren oft *upstream* von BAX und BAK. Ihre Aktivität ist streng reguliert durch diverse transkriptionelle und posttranslationale Mechanismen [244, 245]. Als Effektorproteine können die pro-apoptotischen BCL-2 Proteine BAX und BAK das mitochondriale Membranpotential (ψ_m) und somit die MOMP direkt beeinflussen. Eine Aktivierung von BAX im Zytosol führt zu dessen Konformationsänderung und Translokation in die äußere Mitochondrienmembran. Es kommt zur Oligomerisierung des Proteins und folglich zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran. Der Anstieg der MOMP führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium [242, 246]. Das ausgeschüttete Cytochrom c bildet mit APAF-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und Pro-Caspase 9 einen Komplex, das Apoptosom. In diesem findet die ATP-abhängige Autoaktivierung der Pro-Caspase 9 durch Proteolyse statt [247, 248]. Anschließend aktiviert die aktive Caspase 9 eine Kaskade von Effektorcaspasen, wie die Caspase 3, welche über CAD (*caspase-activated DNase*) die Fragmentierung der DNA auslöst [249, 250].

Aus dem Mitochondrium werden neben Cytochrom c auch weitere pro-apoptotische Regulatoren wie Diablo, AIF (*apoptosis inducing factor*), HtrA2 (*high temperature requirement A2*) und EndoG (*endonuclease G*) freigesetzt [251, 252]. DIABLO und HTRA2 tragen zur Inaktivierung der Inhibitoren der Apoptose (IAPs, *inhibitors of apoptosis*), wie z.B. von Survivin oder XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) bei [252, 253] [254-256]. AIF und EndoG hingegen sind an einer Caspase-unabhängigen Fragmentierung der DNA im Zellkern beteiligt [257, 258]. In nicht-apoptotischen Zellen binden anti-apoptotische Proteine an pro-apoptotische Proteine (BCL-2 an BAX; BCL-XL und MCL-1 an BAK) und verhindern so die Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran [259-261]. Bei zytotoxischen Signalen werden pro-apoptotische BH3-only Faktoren (NOXA, BIM) aktiviert. Diese sind in der Lage anti-apoptotische Proteine, wie MCL-1 und BCL-XL, zu neutralisieren. Dabei kann z.B. NOXA an MCL-1 binden und dessen proteasomalen Abbau

aktivieren, sodass BAK aus der Bindung mit MCL-1 entlassen wird. BAK kann jedoch erst dann Apoptose auslösen, wenn auch BCL-XL durch andere BH3-*only* Proteine (BIM, BAD) neutralisiert wird [261-263]. Somit können je nach Stresssignal und Zelltyp unterschiedliche Faktoren die Apoptose einleiten.

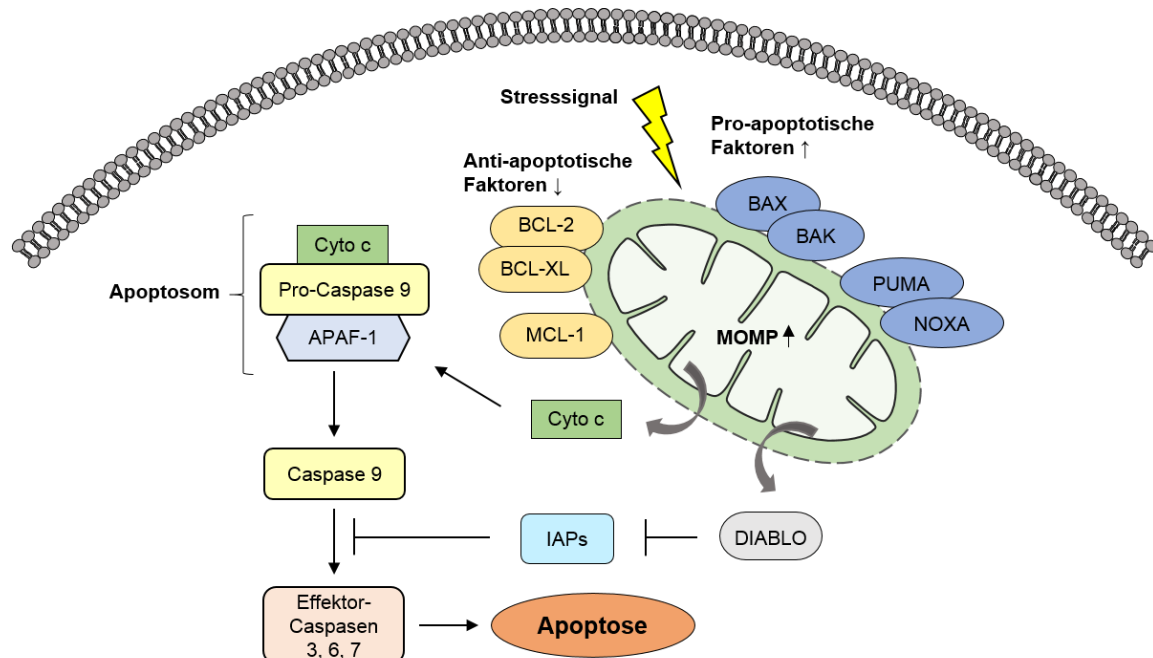


Abb. 1.9: Intrinsischer Apoptoseweg. Der intrinsische Weg wird durch Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c (Cyto c) initialisiert und über pro- und anti-apoptische Proteine reguliert. Das Apoptosom, ein Komplex aus Cyto c, Pro-Caspase 9 und APAF-1 löst eine Signalkaskade von Effektorcaspasen aus, die zur Spaltung und Degradation von Proteinen und der DNA führt.

Eine Fehlregulation von Apoptose kann durch Zusammenbruch des Gleichgewichts zwischen Proliferation, Überleben und Zelltod die Entwicklung von Tumoren und Leukämien fördern. Es gibt Studien, die zeigen, dass die Fähigkeit von Krebszellen Apoptose zu umgehen maßgeblich zu deren Wachstum beiträgt [69]. Tumoren, die Veränderungen in Apoptose regulierenden Proteinen aufweisen, sind oft resistent gegenüber Chemotherapeutika [264]. So führt ein *Knock-down* von MCL-1 in Zellen aus Multiplen Myelomen zu einer verminderten Überlebensrate [265]. In der AML Zelllinie HL-60 wird durch einen *Knock-down* von XIAP, einem endogenen Caspase-Inhibitor, der Ara-C (Cytarabin) induzierte Zelltod verstärkt. Ara-C ist ein Zytostatikum, das vor allem zur Behandlung von AML und ALL bei Kindern und Erwachsenen eingesetzt wird [266]. Mit diesen Daten übereinstimmend, verhindert eine Überexpression von XIAP in Jurkat Zellen (akute T-Zell Leukämie) eine Aktivierung der beiden Apoptosewege [267]. Zusätzlich gibt es Studien, die zeigen, dass eine starke Expression von Survivin und XIAP in pädiatrischen AML Patienten mit einer geringen Überlebensrate korreliert [268].

1.6 Nekrose

Die Nekrose stellt eine weitere Form des Zelltodes dar, die im Gegensatz zur Apoptose Caspase-unabhängig verläuft. Ursachen können mechanische Verletzungen oder schädigende Einflüsse, wie Nährstoffmangel, Sauerstoffmangel oder physikalische/chemische Noxen sein. Im Verlauf der Nekrose kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die Zellmembran permeabel wird. Anschwellen der Zellorganellen, Zerstörung der Plasmamembran und ein Abbau der DNA sind die Folgen. Durch das unkontrollierte Platzen der Zelle werden die intrazellulären Komponenten in die Umgebung der Zelle freigesetzt, was eine Entzündungsreaktion auslöst. Ein weiteres Charakteristikum der Nekrose stellt die Aktivierung der Proteasen Calpain und Cathepsin dar [269-271]. Bisher galt die Nekrose als nicht-regulierte pathologische Form des Zelltodes. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass dem Ablauf der Nekrose auch ein programmierter Vorgang zugrunde liegt [272].

1.7 Autophagie

Als Autophagie wird ein regulierter Lysosom-abhängiger Degradations- und Recyclingprozess der Zelle bezeichnet. Dabei werden geschädigte, fehlgefaltete oder nicht mehr benötigte Proteine und Zellkomponenten abgebaut und wiederverwertet [273]. Es wird zwischen drei Formen der Autophagie unterschieden, der Chaperon-vermittelten Autophagie (*chaperon-mediated autophagy*, CMA), der Mikroautophagie und der Makroautophagie [274]. Bei der CMA werden Substrate, die eine spezifische KFERQ-Sequenz aufweisen, von dem zytosolischen Chaperon HSC70 (*heat shock cognate 70*), selektiv erkannt und gebunden. Diese werden gezielt zu den Lysosomen überführt und an den lysosomalen Rezeptor LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*) gebunden. Anschließend werden die Substrate durch Entfaltung in das Lumen des Lysosoms transloziert, wo sie durch saure Hydrolasen verdaut werden [275]. Bei der Mikroautophagie wird nur ein kleiner Teil des Zytoplasmas durch lysosomale Membran umschlossen und abgebaut [273]. Die Makroautophagie stellt die Form der Autophagie dar, die dem allgemeinen Bild des Vorgangs entspricht (**Abb. 1.10**). Im Folgenden bezieht sich der Begriff Autophagie daher auf Makroautophagie.

Der Prozess der Autophagie ist in die Schritte Initiation, Elongation, Maturation, Fusion, sowie Degradation und Recycling aufgeteilt. Bei der Autophagie werden zytosolische Komponenten von einer Doppelmembran, der Isolationsmembran, auch Phagophore genannt, umgeben. Nach Abschluss dieser Membran spricht man auch von Autophagosomen. Diese fusionieren im Anschluss mit Lysosomen zu Autolysosomen. Darin wird der zelluläre Inhalt (Cargo) durch saure Hydrolasen abgebaut und die

chemischen Grundbausteine für eine Wiederverwertung und Biosynthese freigesetzt [273]. Auf diese Weise ist es möglich, die Nährstoff- und Energiehomöostase der Zellen aufrechtzuerhalten. Neben der Induktion von Autophagie durch Nährstoffmangel oder zellulären Stress, wie DNA-Schäden, findet in den Zellen auch ein basales Maß an Autophagie statt. Genetische Analysen in Säugetieren haben gezeigt, dass Autophagie in vielen verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Embryogenese, der intrazellulären Qualitätskontrolle oder der Tumorsuppression eine wichtige Rolle spielt [273, 276, 277].

Im Folgenden wird näher auf die einzelnen Schritte der Autophagie eingegangen (**Abb. 1.10**). Die Autophagie wird über das Enzym AMPK (Adenosin-Monophosphat aktivierte Proteinkinase) initialisiert. Dabei hemmt die Kinase den mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) Komplex [278]. Dadurch wird auch die Blockierung vom ULK1 (*unc-51-like-kinase1*) Komplex durch mTOR aufgehoben. AMPK aktiviert auf diese Weise nicht nur den ULK1 Komplex, sondern gleichzeitig auch eine Kaskade weiterer ATG-Proteine (*autophagy-related genes*) [279-281]. ATG-Proteine gehören zu einer hoch konservierten Proteinfamilie, die in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde [282].

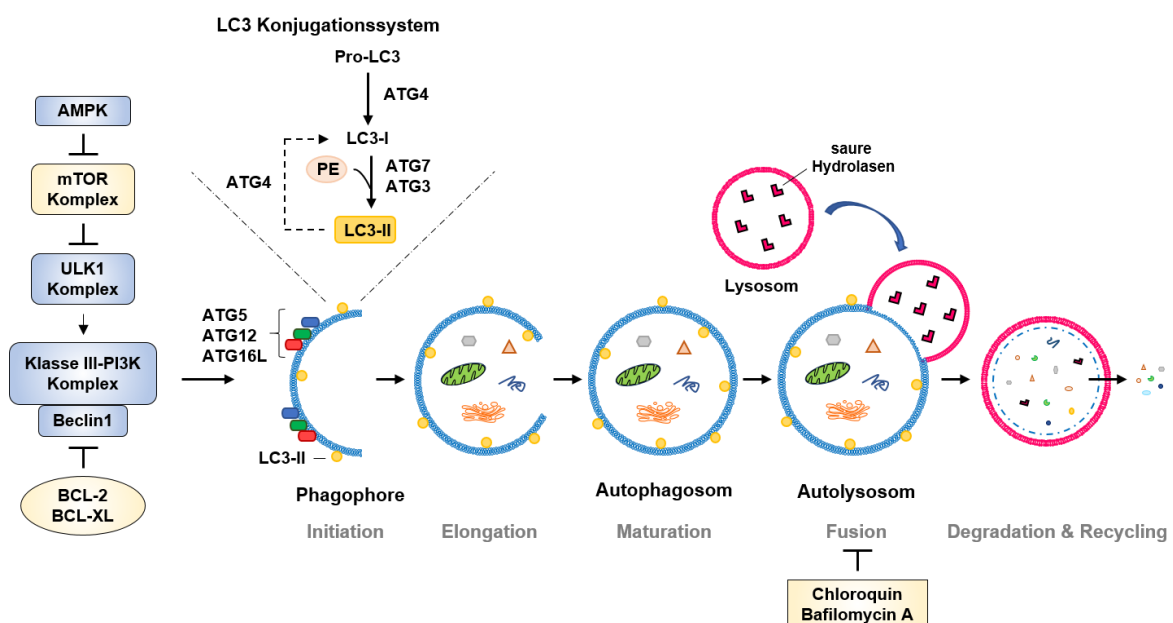


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Makroautophagie. Der Autophagieprozess ist in die Schritte Initiation, Elongation, Maturation, Degradation und Recycling untergliedert. Die Bildung der Isolationsmembran (Phagophore) wird durch Interaktion von mehreren Komplexen und Faktoren (ULK1, Klasse III-PI3K, Beclin1) initiiert. Die Isolationsmembran umschließt die zu abbauenden zytosolischen Zellkomponenten. Das Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zum Autolysosom. Die sauren Hydrolasen bauen den Zellinhalt ab, sodass die chemischen Grundbausteine recycelt werden. Die Fusion kann pharmakologisch durch Chloroquin oder Bafilomycin A gehemmt werden. In dem LC3 Konjugationssystem wird LC3 mithilfe von ATG-Proteinen und Phosphatidylethanolamin (PE) zu LC3-I/II konvertiert; modifiziert nach [283, 284]

Der ULK1 Komplex rekrutiert weitere Faktoren, wie den Klasse III-PI3K Komplex. Der Klasse III-PI3K Komplex besteht aus Beclin1, p150/Vps15 und Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) mit PI3K-Aktivität. Die Aktivität von Vps34 kann durch die Interaktion mit Beclin1 verstärkt werden. Beclin1 wiederum induziert Autophagie durch Interaktion mit den Proteinen ATG14, UVRAG, Ambra-1 und BIF-1. Eine Hemmung der Autophagie kann durch Bindung der anti-apoptischen Proteine BCL-2 und BCL-XL an Beclin1 erfolgen. Bei der Initialisierung von Autophagie kommt es schließlich zur Bildung der mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) angereicherten Isolationsmembran [285]. Potentielle Quellen für die Bildung der Isolationsmembran können Zellkomponenten wie der Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum, das Mitochondrium, Endosomen oder die Plasmamembran sein [286]. Zytosolische Substrate werden von dieser Isolationsmembran umgeben. Für die Elongation der Isolationsmembran werden weitere Faktoren rekrutiert. Dabei spielen die Konjugationssysteme von LC3 (*light-chain 3*) und ATG5-ATG12-ATG16 eine essentielle Rolle. Der ATG5-ATG12-ATG16 Komplex bindet zusammen mit LC3 an die Isolationsmembran und führt so zu einer Dehnung und dem Verschluss der Membran bis hin zur Bildung des Autophagosoms. Der ATG5-ATG12-ATG16 Komplex ist auch für die Umwandlung von zytosol-assoziiertem LC3-I in die membrangebundene (an Phosphatidylethanolamin, PE), lipidierte Form LC3-II verantwortlich. Im Gegensatz zum ATG5-ATG12-ATG16 Komplex bleibt LC3-II bis zur Verschmelzung mit dem Lysosom an dem Autophagosom gebunden [276]. Da LC3 mehrmals im Verlauf der Autophagie modifiziert wird, kann es als Marker für den Fortschritt der Autophagie verwendet werden [287]. Im letzten Schritt der Autophagie fusioniert das Autophagosom mithilfe von Rab-GTPasen mit Lysosomen zum Autolysosom. Die darin enthaltenen sauren Hydrolasen verdauen den Inhalt und die innere Membran des Autophagosoms. Daraufhin werden die chemischen Grundbausteine der Makromoleküle (Aminosäuren, Lipide, etc.) freigesetzt und recycelt [276, 288-290].

Im Folgenden wird das LC3 Konjugationssystem (**Abb. 1.10**) näher erläutert. Im ersten Schritt spaltet die Cystein-Protease ATG4 den C-Terminus von Pro-LC3 ab. Der exponierte Glycinrest (G116) wird durch das E1 Ubiquitin-Aktivierungsenzym ATG7 mittels ATP-Hydrolyse durch Adenylierung aktiviert. Danach wird LC3-I über eine Thioesterbrücke mit ATG7 konjugiert und über eine weitere Thioesterbrücke auf das E2 Ubiquitin-Konjugationssystem ATG3 übertragen. Das LC3-I wird über eine Amidbrücke an die Aminogruppe von PE gebunden. Anschließend bindet das LC3-II über den Lipidteil an die Autophagosomenmembran und vermittelt die Membranelongation. Nach der Fusion wird LC3-II durch ATG4 wieder dekonjugiert. Dieser ständig ablaufende Zyklus von Konjugation und Dekonjugation ist für die normale Progression der Autophagie wichtig [284].

Früher galt die Autophagie als ein unspezifischer Degradationsweg. Nun gibt es Hinweise darauf, dass die Einlagerung von zytosolischem Material und das Schließen der Isolationsmembran über membrangebundenes LC3-II sowie über p62 selektiv vermittelt werden [291, 292]. Pharmakologische Inhibitoren der Autophagie sind u.a. Chloroquin und Bafilomycin A. Diese verhindern eine Ansäuerung der Autolysosomen, was eine Akkumulation von Autophagosomen zur Folge hat [293]. Die Rolle von Autophagie in der Tumorigenese ist umstritten, da es sowohl Hinweise auf eine tumorsuppressive [294-296], als auch auf eine tumorfördernde Wirkung gibt [297-299]. Einige Studien zeigen, dass Autophagie unter Stresssituationen zur Genomintegrität und in Krebszellen zur Chemoresistenz beiträgt. In diesen Fällen fördert Autophagie die Tumorentstehung und -entwicklung [300, 301]. Andere Studien wiederum legen offen, dass Autophagie in Krebszellen unter ungünstigen Bedingungen, wie Hypoxie oder nach Behandlung mit Chemotherapeutika, Zelltod hervorruft und somit tumorsuppressiv wirkt [302-305]. Auch HDACi zeigen dabei vielversprechende Resultate. So wird z.B. in Imatinib-resistenten CML Zellen die tumorsuppressive Wirkung von SAHA durch den lysosomalen Inhibitor Chloroquin verstärkt [306]. In einer weiteren Studie wird in AML1-ETO-positiven Leukämiezellen Autophagie durch VPA induziert. Eine Kombinationsbehandlung mit VPA und Chloroquin hingegen verstärkt die Zelltodinduktion in diesen Zellen [307].

1.8 Zielsetzung

Neben genetischen Läsionen können auch epigenetische Aberrationen zum Entstehen und Fortschreiten von Tumorerkrankungen beitragen. Diese Beobachtung führte zur Entwicklung von pharmakologischen Inhibitoren gegen Histondeacetylasen, welche derzeit als vielversprechende Krebsmedikamente betrachtet werden. Zahlreiche HDACi befinden sich in klinischen Studien. Dabei wurden einige HDACi von der FDA bereits zur Therapie von hämatologischen Erkrankungen sowie von soliden Tumoren zugelassen [68, 81]. Chemotherapeutika werden in der Krebstherapie häufig in Kombinationsschemata eingesetzt. Auf diese Weise kann im Vergleich zu Monotherapien die Effizienz der Behandlung erhöht und das Risiko einer Resistenzentwicklung minimiert werden.

In vorherigen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Klasse I-spezifische HDACi VPA in Kombination mit Hydroxyurea effizient Melanomzellen sowie Tumorzellen aus der Kopf-Hals-Region abtöten kann [93, 308]. Andere Studien haben wiederum gezeigt, dass HDACi (VPA/SAHA/TSA) durch eine negative Regulation von Proteinen, die die Autophagie regulieren, Apoptose in Leukämiezellen induzieren [309]. Dies erscheint besonders interessant in dem Kontext der Autophagieinduktion in Tumorzellen unter Hydroxyurea induziertem Replikationsstress [310]. Eine weitere Studie legte offen, dass VPA Autophagie induziert und eine Kombinationstherapie mit dem lysosomalen Inhibitor Chloroquin Autophagie hemmt und Zelltod in AML Zellen auslöst [307]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass Krebszellen mittels HDACi gegenüber Chemotherapeutika sensitiviert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zytotoxische Wirkungen des Klasse I HDACi MS-275 und Hydroxyurea auf BCR/ABL-positive CML Zelllinien untersucht. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, wie die Hemmung von HDACs und replikativer Stress in Leukämiezellen zelluläre Prozesse wie Apoptose, Autophagie, Zellzyklusregulationsprozesse oder DNA-Schadensantworten regulieren. Deshalb war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit molekulare Mechanismen aufzudecken, die der durch HDACi veränderten Stressantwort in BCR/ABL-positiven CML Zellen zugrunde liegen. Dazu wurden die Zellen mit MS-275 und Hydroxyurea einzeln sowie in Kombination behandelt. Inhibitoren gegen ATR und CHK1 wurden ebenfalls verwendet. Anschließend wurden die Zellen mittels Western Blot, Durchflusszytometrie, qPCR, Immunfluoreszenz und *Comet* Assay untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse der Induktion von Apoptose, Autophagie sowie der DNA-Schadensantwort. *Knockdown*-Experimente sollten die erzielten Ergebnisse untermauern und mechanistische Erklärungen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Absaugpumpe <i>Vacusafe</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Amaxa® <i>Nucleofector</i> ® II	Lonza, Basel, Schweiz
Blottingapparatur Mini <i>Trans-Blot Cell</i> ⁺	Bio-Rad, München
Brutschrank <i>HeraCell</i> TM	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
CFX96 <i>Real-Time</i> PCR Detektion System	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer <i>FACSCanto</i> TM II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Feinwaage Basic	Sartorius Laboratory, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Instruments, Düsseldorf
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Konfokales Mikroskop LSM710	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
<i>Microplate Reader Sunrise</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Zeiss Primovert	Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge	Roth, Karlsruhe
<i>MyCycler</i> TM <i>Thermal Cycler</i>	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
<i>Odyssey</i> ⁺ - <i>Infrared Imaging-System</i>	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter <i>FiveEasy</i> TM FE20	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten, <i>Pipet-Lite</i> XLS	Mettler Toledo, Gießen
<i>Pipet-boy</i> , <i>Pipet-X</i>	Mettler Toledo, Gießen
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
<i>Sonifyer UP2200Ht ultrasonic processor</i>	Hielscher, Berlin
Spannungsquelle <i>PowerPac</i> TM HC	Bio-Rad, München
Sterilbank <i>Lamin Air</i> HB2472	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80°C)	Sanyo, München
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
UV-Vis Spektrophotometer <i>NanoDrop</i> [®] -ND-1000	Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Vakuumpumpe <i>Vacusafe</i>	IBS Integra, Fernwald
Vortex <i>Genie 2</i> TM	Scientific Industries, Braunschweig
Waage <i>Precisa Junior 500</i>	Precisa, Aldingen
Wasserbad <i>AQUAline</i> AL 5	Lauda, Lauda-Königshofen
Wippschüttler <i>Rocking platform</i>	VWR, Darmstadt
Zelltank (N ₂), MVE <i>CryoSystem 4000</i>	Cryo Shop, München
Zentrifuge Heraeus <i>Fresco 21</i>	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Heraeus <i>Megafuge 16</i>	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

2.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC6(3)]	Molecular Probes, Eugene
Aceton	Applichem, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese®Gel 40	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
AnnexinV-FITC	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt
Ethanol ≥99% p. a.	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin Pufferan® ≥99% p. a.	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Low melting point-Agarose (UltraPure)	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver <i>Blotting grade</i>	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Laurylsarcosinat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet®-P40	Sigma-Aldrich, Steinheim
NEWBlot™ Nitro Strippingbuffer	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Phosphataseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS Dulbecco	Merck Millipore, Darmstadt
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete™	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti-Load 1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Roth, Karlsruhe

Tetramethylethyldiamin ≥99% p. a.	Roth, Karlsruhe
TO-PRO3	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Tris Pufferan® ≥99,9% Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween®20	Roth, Karlsruhe
<i>Vectashield mounting medium</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
6/12/24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten (5/10/25 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Analyseröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott Duran, Mainz
Mikrotiterplatten	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran, Amersham™ Protan™ 0.2 NC	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße MSltiUltra Tubes	Roth, Karlsruhe
Petrischalen (6/10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Filterpapier	VWR, Darmstadt
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15/50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.4 Kits

Name	Hersteller
Amaxa® <i>Cell Line Nucleofector</i> ® Kit V	Lonza, Basel, Schweiz
Cyto-ID® Autophagie Detektionskit	Enzo Life Sciences, New-York, USA
Ingenio Kit Lösung	Mirus, VWR, Darmstadt
<i>NucleoSpin</i> ® RNA II Kit	Machery-Nagel, Düren
SensiMix™ <i>SYBR Green & Fluorescein</i> Kit	Bioline
Venor® GeM <i>classic</i> Mykoplasmen Detektionskit für konventionelle PCR	Minerva Biolabs
Verso™ cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

Die aufgelisteten Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.1.5 Medien und Medienzusätze

Name	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) - 1640 mit L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.6 Zelllinien

2.1.6.1 Adhärente Zelllinien

Zelllinie	Phänotyp	Referenz
MEF (<i>mouse embryonic fibroblast</i>) NOXA Wildtyp	Embryonale Mausfibroblasten mit Wildtyp NOXA	[311]
MEF NOXA -/-	Embryonale Mausfibroblasten mit defizientem NOXA	[312]

Immortalisierte MEFs mit intaktem bzw. defizientem NOXA wurden von zur Verfügung gestellt.

2.1.6.2 Suspensionszelllinien

Tab. 2.1: Herkunft, Phänotyp und p53 Status von humanen Leukämie Zelllinien.

Die K562 Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) käuflich erworben. Die anderen CML Zelllinien wurden von zur Verfügung gestellt. Alle aufgeführten Zelllinien tragen BCR/ABL t(9;22) Mutationen.

Zelllinie [Erste Referenz]	Herkunft/Phänotyp	Erste Referenz	P53 Status/Referenz
K562	- CML-Patientin (53 J.) - Blastenkrise - Erythroleukämische Zellen	[313]	<i>Frameshift Mutation/premature stop</i> [314]
LAMA-84	- CML-Patientin (29 J.) - akute Phase - 5 J. Busulfan Therapie - Blastenkrise	[315]	-
MEG-01	- CML-Patient (55 J.) - megakaryozytische Blastenkrise	[316]	Deletion [317]
KCL-22	- CML-Patientin (32 J.) - Blastenkrise	[318]	<i>Frameshift Mutation</i> [319]
KYO-01	- CML-Patient (22 J.) - Blastenkrise	[320]	Punktmutationen [319]

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
		Abcam, Cambridge, UK
p-ATM (S1981)	1:1000	ab81292
BAK	1:500	ab32371
BAX	1:500	ab32503
FoxO1	1:1000	ab39670
LAMP2A	1:1000	ab18528
α -Tubulin	1:1000	ab176560
		BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
BCL-XL	1:500	51-6646GR
gespaltenes PARP1 (D214)	1:1000	552596
PARP1	1:1000	556362
		Biozol, Eching, Deutschland
Vinculin	1:1000	BZL-03106
		Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Beclin1	1:1000	3495
p-CHK1 (S296)	1:1000	2349
p-CHK1 (S317)	1:1000	2344
CHK1	1:1000	2360
p-CHK2 (T68)	1:500	2661
CHK2	1:1000	2662
gespaltene Caspase 3 (D175)	1:500	9661
p-H2AX (S139)	1:1000 1:1000 in IF	9718
LC3B	1:500 1:300 in IF	3868
c-MYC	1:1000	5605
p73	1:500	14620
PUMA	1:1000	4976
		Calbiochem/Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
NOXA	1:500	OP180
		Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
HSP90	1:1000	ADI-SPA-830-F
		GeneTex Inc., Irvine, USA
p-ATR (T1989)	1:500	GTX128145
		Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
RPA	1:1000 in IF	NA19L
		Novus Biologicals, Abingdon, UK
ATG5	1:500	NB110-53818
PR130	1:500	NBP1-87233
Survivin	1:2000	NB500-201

		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
β -Aktin	1:1000	sc-47778
BCL-2	1:500	sc-492
EGR-1	1:500	sc-110
HSC70	1:2000	sc-7298
MCL-1	1:1000	sc-819
p-STAT5a/b (Y694)	1:500	sc-101806
STAT5	1:1000	sc-74442
Vinculin	1:1000	sc-736
		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BIM	1:1000	B7929
HDAC10	1:1000	H3413

Für Western Blot Analysen wurden alle Antikörper in 2% Milchpulver/TBS-T angesetzt. Nur p-ATR/ATR und p-CHK1/CHK1 wurden in 2% BSA/TBS-T verdünnt.

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Infrarot-Farbstoff-konjugierte Antikörper	Verdünnung in TBS-T	Hersteller
IgG Ziege-anti-Kaninchen IRDye 800CW	1:10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
IgG Ziege-anti-Maus IRDye 800CW	1:10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
IgG Ziege-anti-Kaninchen IRDye 680CW	1:10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
IgG Ziege-anti-Maus IRDye 680CW	1:10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Fluorophor-konjugierte Antikörper	Verdünnung	Hersteller
F(ab)2 <i>fragment</i> AlexaFluor 488 Ziege anti-Maus	1:300	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
F(ab)2 <i>fragment</i> AlexaFluor 488 Ziege anti-Kaninchen	1:400	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Cy3 Ziege anti-Kaninchen	1:300	Dianova/Jackson Immuno Research, West Grove, USA

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'→3'
ACTB- <i>real-up</i>	TGGCATCCACGAAACTACC
ACTB- <i>real-low</i>	GTGTTGGCGTACAGGTCTT
DDB2- <i>real-up</i>	TGTAGCCTGGATGTGTTCT
DDB2- <i>real-low</i>	GCATTCTGAGATTCCAAGC
BAX- <i>real-up</i>	ATCAGATGTGGTCTATAATG
BAX- <i>real-low</i>	CAGAAGGCACTAATCAAG
BCL2- <i>real-up</i>	CGACTCCTGATTCATTGG

BCL2- <i>real-low</i>	TCTACTTCCTCTGTGATGT
BCLXL- <i>real-up</i>	AAGCGTAGACAAGGAGAT
BCLXL- <i>real-low</i>	TAGGTGGTCATTCAGGTAA
FASR- <i>real-up</i>	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA
FASR- <i>real-low</i>	GGCTTCATTGACACCATT
FASL- <i>real-up</i>	CAATCTTACCAGTGCTGAT
FASL- <i>real-low</i>	AATCCCAAAGTGCTTCTC
GADD45A- <i>real-up</i>	ATCTCCCTGAACGGTGAT
GADD45A- <i>real-low</i>	TGTAATCCTTGCATCAGTGT
GADD45B- <i>real-up</i>	TTGGTTTCCGCAACTTCC
GADD45B- <i>real-low</i>	AAGCAGCGAAATCCTTCC
GADD45C- <i>real-up</i>	AGGAGCGTGAAGGACTTA
GADD45C- <i>real-low</i>	CTTCAACAGCAGCATCCT
GAPDH- <i>real-up</i>	CATGAGAAGTATGACAACAG
GAPDH- <i>real-low</i>	ATGAGTCCTTCCACGAT
MDM2- <i>real-up</i>	ATCTTGATGCTGGTGTA
MDM2- <i>real-low</i>	AGGCTATAATCTTCTGAGTC
NOXA- <i>real-up</i>	TCTTCGGTCACTACACAAC
NOXA- <i>real-low</i>	CCAACAGGAACACATTGAAT
P21- <i>real-up</i>	ACCATGTCAGAACCGGCTGGG
P21- <i>real-low</i>	TGGGCGGATTAGGGCTTC
PUMA- <i>real-up</i>	TAAGGATGGAAAGTGTA
PUMA- <i>real-low</i>	TTCAGTTTCTCATTGTTAC
Survivin- <i>real-up</i>	ATGACTTGTGTGTGATGA
Survivin- <i>real-low</i>	GTTTGTGCTATTCTGTGAA

Die Sequenzen der p73-Primer (up/low) können bei [www.ncbi.nlm.nih.gov](#) erfragt werden. Die verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon käuflich erworben.

2.1.9 Puffer und Lösungen

Western Blot	
0,5% NET-N Lysepuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 10% Glycerin 1 mM EDTA 0,5% NP-40 Zusätze: 1 Proteaseinhibitor-Cocktail Tablette/10 mL NET-N Lysepuffer Phosphataseinhibitor-Lösung (1:100) 1 mM DTT

Bradford-Reagenz	50 mg (0,01%) Coomassie Brilliant Blue G 50 mL Phosphorsäure 25 mL EtOH (99,9%) ad 500 mL H ₂ O _{bidest.} anschließend filtrieren und mit Alufolie bedeckt bei 4°C lagern.
1 M Tris/HCl, pH 6,8	60 g Tris ad 500 mL H ₂ O _{bidest.}
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	90,83 g Tris ad 500 mL H ₂ O _{bidest.}
10% SDS	10 g SDS ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}
10% APS	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 mL H ₂ O _{bidest.} Aliquots à 1 mL bei -20°C lagern.
5x Lämmli-Puffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
6x Probenpuffer nach Lämmli	375 mM Tris-HCl pH 6,8 12% SDS 30% Glycerin 500 mM DTT 0,01% Bromphenolblau (kleine Spatelspitze) Aliquots à 1 mL bei -20°C lagern.
SDS-Elektrophoresepuffer	200 mL 5 x Lämmli-Puffer 10 mL 10% SDS ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Blotpuffer	100 mL 5 x Lämmli-Puffer 200 mL EtOH ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
10 x TBS, pH 7,6	20 mM Tris 1,4 M NaCl ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
TBS-T (0,05%)	100 mL 10 x TBS 0,5 mL Tween [®] ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Blockierlösung	5% Milchpulver in TBS-T
Analysen am Durchflusszytometer	
PBS, pH 7,4	9,55 g/L in H ₂ O _{bidest.}
80% Ethanol	800 mL EtOH ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
RNase A	10 mg/mL
Propidiumiodid-Lösung (50 µg/mL)	2,5 mL PI-Stocklösung (1 mg/mL) + 47,5 mL PBS im Dunkeln bei 4°C lagern.
10x AnnexinV-Bindepuffer, pH 7,4	100 mM HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ 1% BSA ad 50 mL H ₂ O _{bidest.}
1x AnnexinV-Bindepuffer	5 mL 10x AnnexinV-Bindepuffer

	ad 50 mL H ₂ O _{bidest.}
Phenolrot-freies RPMI/5% FCS	2,5 mL FCS + 47,5 mL Phenolrot-freies RPMI Medium
Cyto-ID [□] -Lösung	1 µL Cyto-ID [□] Farbstoff 1 mL Phenolrot-freies RPMI Medium
Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay)	
Lysepuffer	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1% Natrium-Laurylsarcosinat Für alkalischen Lysepuffer: mit NaOH auf pH 10 einstellen. Zusätze: 1% Triton X-100 10% DMSO Für neutralen Lysepuffer: mit HCl auf pH 7,5 einstellen. Zusatz: 1% Triton X-100
Elektrophoresepuffer (alkalisch)	300 mM NaOH 1 mM EDTA pH>13 bei 4°C lagern.
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris, pH 7,5
Elektrophoresepuffer (neutral)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 7,5 bei 4°C lagern.
Immunfluoreszenz	
Blockierlösungen	5% BSA/0,3% Triton X-100/PBS. 10% Ziege Normal Serum/PBS.
70% Ethanol	350 mL EtOH ad 500 mL H ₂ O _{bidest.}
Inkubierlösungen für Antikörper	1% BSA/0,01% Triton X-100/PBS 1% BSA/0,3% Triton X-100/PBS 0,3% Triton X-100/PBS
Methanol:Aceton (7:3)	35 mL MeOH 15 mL Aceton bei -20°C lagern.
4% Paraformaldehyd	4 g PFA in 10 mL 1 x PBS + 50 mL H ₂ O _{bidest.} mit NaOH lösen. mit HCl auf pH 7,4 einstellen. ad 100 mL H ₂ O _{bidest.} bei -20°C lagern.
PBS <i>high salt</i>	1 x PBS 0,4 M NaCl bei 4°C lagern.
Salzsäure	1 M HCl

TO-PRO3	100 µM TO-PRO3 im Dunkeln bei -20°C lagern.
---------	--

2.1.10 Inhibitoren

Name	Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
Chloroquin	5 mM	10 µM	Enzo Life Sciences, Lörrach
ETP-46464	1 mM	3 µM	Cayman Chemical, USA; Biomol, Hamburg
Hydroxyurea 98%	100 mM	1 mM	Sigma-Aldrich, Karlsruhe
Imatinib-Mesylat	1 mM	1 µM	Enzo Life Sciences, Lörrach
KU-60019	1 mM	3 µM	Selleck Chemicals, München
MK-8776	1 mM	500 nM	Selleck Chemicals, München
MS-275	5 mM	1,5 und 5 µM	Selleck Chemicals, München
VE-821	1 mM	3 µM	Selleck Chemicals, München
z-VAD-FMK	20 mM	50 µM	Bachem, Heidelberg

2.1.11 Software

Name	Hersteller
CFX Manager™	Bio-Rad, München
<i>Comet IV</i>	Perceptive Imaging, Liverpool, UK
<i>Endnote X6</i>	Thomson Reuters, New York, USA
FACSDiva™ 7.0	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Flowing 2.0</i>	Flowing Software
<i>GraphPad Prism 6</i>	Graph Pad Software, La Jolla, USA
GIMP V. 2.8.22	Gimp
<i>ImageJ</i>	Wayne Rasband
<i>Image Studio Lite V. 5.2</i>	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Magellan 2.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
<i>Microsoft Office 2016</i>	Microsoft
Odyssey Software	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Zen 2009	Zeiss, Oberkochen
<i>NanoDrop</i>	Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1 Zellkryokonservierung

Zur Zellkryokonservierung wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet, die nach Ernten und Waschen mit PBS in warmem Medium aufgenommen und für 5 min bei 1300 U/min abzentrifugiert wurden. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox überführt, welche eine schrittweise Abkühlung auf -80°C gewährleistet. Nach 1-3 Tagen wurden diese zur Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt. Um die Zellen aufzutauen und wieder in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen kurz ins 37°C heiße Wasserbad gehalten. Die Zellen wurden direkt in warmem Medium aufgenommen und darin gewaschen (5 min, RT, 1000 U/min). Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das Zellsediment wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt.

2.2.1.2 Zelllinien und Erhaltungskultur

Die CML Zelllinie K562 wurde von DSMZ käuflich erworben. Die CML Zelllinien LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 wurden von

zur Verfügung gestellt. Details zur Herkunft, zum Phänotyp und p53 Status der einzelnen Zelllinien sind in **Tab. 2.1** aufgeführt. Die Leukämiezellen wurden in RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin, 10% FCS und 10 U/mL Penicillin sowie 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin kultiviert. Zusätzlich zu den Suspensionszellen wurden immortalisierte embryonale Fibroblasten mit intaktem (MEF NOXA wt) und defizientem NOXA (MEF NOXA -/-) verwendet. Die Herstellung der adhärenenten MEF NOXA -/- Zellen wurde in ([311, 312]) beschrieben. Diese wurden von Dr. A. Strasser (Walter and Eliza Hall Institute (WEHI), Melbourne, Australia) zur Verfügung gestellt. MEFs wurden in DMEM mit 10% FCS, 10 U/mL Penicillin und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin gehalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C , 5% CO_2 und wassergesättigter Atmosphäre.

Die Zellen müssen in einer bestimmten Dichte gehalten werden. Dazu wurden die Zellen zwei bis dreimal in der Woche gesplittet. K562, LAMA-84 und KCL-22 wurden in einem Verhältnis von 1:25 gesplittet, MEG-01 und KYO-01 hingegen wurden 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Suspensionszellen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1300 U/min abzentrifugiert. Die adhärenenten MEF Zellen wurden 1:20 gesplittet. Diese mussten vorher durch Trypsinieren von der Oberfläche gelöst werden. Der Überstand

wurde abgesaugt, das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelllinie in einer bestimmten Verdünnung in die Zellkulturflaschen überführt. Um zu gewährleisten, dass genug Zellen für die Aussaat vorhanden sind, wurden die Zellen über das Wochenende expandiert. Dazu wurden die Zellkulturflaschen der Suspensionszellen mit 20-30 mL Medium aufgefüllt. Die adhärennten Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/10 cm Petrischale in 10 mL Medium ausgesät.

Mithilfe eines PCR-basierten Mykoplasmen Detektionskits wurden alle Zellkulturen regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen hin getestet.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellaussaat

Die Zellen wurden in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1300 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment je nach Größe in 5-10 mL frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 μ L der Zellsuspension mit 10 μ L PBS auf einer Mikrotiterplatte gemischt. Davon wurden 10 μ L auf die Zählkammer aufgetragen und die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Neubauer Zählkammer setzt sich aus vier Quadraten mit jeweils 16 kleineren Quadraten zusammen. Anhand der folgenden Formel, die die Vorverdünnung und die Höhe der Kammer mitberücksichtigt, konnte die Zelldichte berechnet werden.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{\text{mL}}$$

Mithilfe der berechneten Zelldichte konnte anhand nachfolgender Formel ermittelt werden, wieviel Zellsuspension mit welchem Volumen (Vol) an frischem Medium verdünnt werden musste, um die gewünschte Zelldichte für die Aussaat zu erhalten.

$$\text{zur Verdünnung benötigtes Vol der Zellsuspension} = \frac{\text{gewünschte Dichte} \cdot \Sigma \text{ benötigtes Vol}}{\text{berechnete Zelldichte/mL}}$$

Für die Western Blot-Analysen wurden die Suspensionszellen in 6-Well Platten (5 mL/Well), für die FACS-Analysen in 12-Well Zellkulturplatten (2 mL/Well) ausgesät. Die adhärennten Zellen wurden in 6 cm Petrischalen ausgesät und die Zellen nach der Ernte für Western Blot- und FACS-Analysen aufgeteilt. Dazu wurden die Leukämiezellen in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL und die MEFs in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/6 cm Petrischale in 5 mL Medium oder in 6-Well Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well in 3 mL Medium ausgesät.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Die Leukämiezellen und die embryonalen Fibroblasten aus der Maus wurden wie bereits beschrieben in einer bestimmten Zelldichte in Zellkulturschalen und -platten ausgesät. Nach 24 h Ruhezeit wurden die Zellen mit einer bestimmten Konzentration von dem HDACi MS-275 und/oder dem Ribonukleotidreduktase-Inhibitor (RNRi) Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Der Autophagie Inhibitor Chloroquin wurde zusammen mit MS-275 und/oder Hydroxyurea zugegeben. Auch der TKi Imatinib wurde gemeinsam mit MS-275 und Hydroxyurea hinzugefügt. Bei den Versuchen mit dem pan-Caspase Inhibitor z-VAD-FMK, dem ATRi VE-821 bzw. ETP-46464, dem CHK1i MK-8776 oder dem ATMi KU-60019 hingegen, wurden die Zellen 1 h mit den Substanzen vorbehandelt. Hydroxyurea wurde als 100 mM Stocklösung vor jedem Versuch frisch in PBS angesetzt. Die anderen Inhibitoren wurden vorher in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der einzelnen Stocklösungen und die Endkonzentrationen der Inhibitoren im Medium sind unter dem Abschnitt **2.1.10** aufgeführt.

2.2.2 Untersuchung der Proteinexpression

2.2.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Ernte wurden die abtrypsinisierten MEFs mitsamt dem Mediumüberstand in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 U/min für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in PBS in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen. Die Proben wurden danach erneut pelletiert (1300 U/min, 5 min) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die eingefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut und je nach Größe des Zellpellets in 80-200 µL 0.5% NET-N Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer wurde zuvor neu angesetzt und mit DTT sowie Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis, wurden die Proben 20 min bei 4°C und 1300 U/min zentrifugiert. Die Überstände mit den Proteinen wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der photometrischen Methode von Bradford. Diese beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G. Im sauren Reagenz bildet dieser Farbstoff kovalente Komplexe mit kationischen und unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Dadurch wird die anionische, blaue Form des Farbstoffs stabilisiert. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 470 auf 595 nm. Dabei verhält sich die

Absorption bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration [321]. Zur Bestimmung des Proteingehalts der Gesamtzellextrakte wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt.

Tab. 2.2: Verdünnung der BSA Standards

1 mg/mL BSA [μL]	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ [μL]	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]
0	30	0
1,5	28,5	2,5
3	27	5
6	24	10
9	21	15
12	18	20
15	15	25

Zusätzlich wurde eine Reihe von BSA Standards (0-25 $\mu\text{g/mL}$) pipettiert (**Tab. 2.2**). Pro Well wurden 200 μL Bradford-Reagenz hinzugefügt und für 5 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte im Microplate Reader für 10 sec geschüttelt und die Absorption der Proben bei 595 nm mithilfe der Magellan 2.0 Software gemessen. Die Proteinmenge der einzelnen Proben wurden anschließend mit Microsoft Excel anhand der BSA-Eichkurve berechnet.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts mithilfe einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli aufgetrennt [322]. Dabei dient das anionische Tensid SDS zur Denaturierung der Proteine. Aufgrund der negativen Gesamtladung der Protein-SDS Komplexe, die sich linear zur molekularen Masse des Proteins verhält, wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode hin. Da es sich um eine diskontinuierliche SDS-PAGE handelt, haben die Sammel- und Trenngel unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte.

Das Gemisch für das entsprechende Trenngel (**Tab. 2.3**) wurde in die zuvor mit Glasplatten zusammengebaute Gelgieß-Einrichtung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol entfernt und das Gemisch für das Sammelgel (**Tab. 2.3**) pipettiert sowie ein Kamm mit entsprechender Anzahl der benötigten Taschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm entfernt und das Polyacrylamidgel in feuchtem Zellstoff bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Tab.2.3: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE
 Volumen für 2 Polyacrylamidgele; Gelplatten und Taschenbreite des Kamms: 1,0 mm

	Sammelgel	Trenngel				
		7,5%	10%	12,5%	15%	17%
H ₂ O _{bidest.}	4,4 mL	6,5 mL	5,6 mL	4,9 mL	4,2 mL	3,6 mL
1 M Tris pH 6,8	0,76 mL	-	-	-	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
40% Acrylamid	0,76 mL	2,3 mL	3,1 mL	3,8 mL	4,6 mL	5,2 mL
10% SDS	60 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL	120 µL
10% APS	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
TEMED	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL

Zur Herstellung der Proben wurde das Volumen der eingesetzten Lysate mit H₂O_{bidest.} auf das Gesamtvolumen angeglichen und diese im Verhältnis 1:6 mit 6x Probenpuffer versetzt. Danach wurden die Proben für 5 min bei 95°C und 800 U/min aufgekocht. Die Proben wurden bereits am Vortag angesetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Das Polyacrylamidgel wurde in die Gelkammer überführt und die Kammer mit SDS-Elektrophoresepuffer befüllt. Die Taschen wurden mit dem Molekulargewichtsmarker *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* und den Proben beladen. Von dem Größenmarker wurden 3,5 µL und von den Proben je nach Proteinmenge, die zwischen 30-60 µg lag, 24-30 µL aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Eintritt der Lauffront in das Trenngel bei einer konstanten Spannung von 95 V. Danach wurde die Spannung auf 125 V erhöht.

2.2.2.4 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde das Nassblotverfahren mit Transferpuffer angewendet. Dabei werden die aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Gel auf die Membran übertragen. Die Zusammensetzung der Tank-Blot-Apparatur erfolgte nach dem folgenden Schema: 1. Schwamm, 2. 2 Lagen Whatman-Filterpapier, 3. Gel, 4. Nitrozellulosemembran, 5. 2 Lagen Whatman-Filterpapier, 6. Schwamm. Dabei wurden alle verwendeten Materialien zuvor in Blotpuffer getränkt. Um Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden, wurde nach jeder Schicht das Ganze mit einem runden Glasstab glatt gerollt. Anschließend wurde die Kassette in die Blotkammer überführt, wobei darauf zu achten war,

dass die Membran zur Anoden-Seite der Kammer gerichtet war. Die Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt und der Proteintransfer bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA pro Gel für 2 h bei RT durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Membran entsprechend zugeschnitten, mit Bleistift beschriftet und mit TBS-T für 5 min auf dem Schüttler gewaschen.

2.2.2.5 Immundetektion mithilfe des Odyssey®-Infrared-Imaging-Systems

Anschließend wurde die Membran bei RT für 1 h in 5% Milchpulver/TBS-T unter Schütteln geblockt. Damit sollen unspezifische Antikörperbindungen verhindert werden. Nach dem Blocken wurde die Membran auf dem Schüttler 3x 5 min mit TBS-T gewaschen und in die Lösung mit dem entsprechenden Primärantikörper (in 2% Milchpulver/TBS-T oder 2% BSA/TBS-T) überführt. Die Inkubation erfolgte auf einem Rollenmischer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran auf dem Schüttler erneut 3x 5 min mit TBS-T gewaschen und danach auf dem Rollenmischer lichtgeschützt mit dem passenden Infrarot-Farbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (1:10.000 in TBS-T) für 2 h inkubiert. Die Membran wurde unter Lichtausschluss wieder 3x 5 min mit TBS-T gewaschen und danach wurden die Proteine direkt mithilfe des Odyssey®-Infrared-Imaging-Systems detektiert. Die Auswertung und densitometrische Analyse der Banden wurde mit der *Image Studio Lite 4.0* Software durchgeführt.

2.2.3 Durchflusszytometrische Messungen

Die Analysen zur Zellzyklusverteilung sowie zur Induktion von Zelltod oder Autophagie wurden am Durchflusszytometer FACS Canto II ausgeführt. Dabei passieren die Einzelzellen einer Zellsuspension mit hoher Geschwindigkeit einen oder mehrere Laser. Dadurch wird das Licht gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) liefert Informationen über die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) über die Granularität einer Zelle. Somit ist eine Auftrennung der Zellen in einzelne Populationen anhand diverser Eigenschaften möglich [323].

2.2.3.1 Zelltodmessung mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung

Apoptotische und nekrotische Zellen wurden durch die Färbung mit FITC-gekoppeltem AnnexinV sowie mit Propidiumiodid (PI) am Durchflusszytometer sichtbar gemacht. Der Fluoreszenzfarbstoff AnnexinV-FITC bindet an Phospholipid-Phosphatidyl-Serin-Reste, die während der frühen Apoptose von der Innenseite der Zellmembran an die Außenseite geschleust werden [324]. PI hingegen interkaliert in die DNA. Intakte Zellmembranen sind

nicht permeabel für PI, wodurch es möglich ist, zwischen lebenden und apoptotisch-nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Für die AnnexinV/PI-Färbung wurden die Zellen wie für die Zellzyklusanalysen ausgesät. Die Zellen wurden direkt in FACS-Röhrchen geerntet (5 min, 1300 U/min) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 μ L 1x-AnnexinV-Bindepuffer vorsichtig resuspendiert und die Proben wurden fortan auf Eis gehalten. 2,5 μ L AnnexinV wurden pro Probe hinzugefügt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Zur Färbung der DNA wurden pro Ansatz 430 μ L 1x AnnexinV-Bindepuffer und 10 μ L PI (SL: 50 μ g/ μ L) zugegeben. Direkt im Anschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung und Quantifizierung der Daten erfolgte mit der FACSDiva 7.0 Software. Dabei stellt die Zellpopulation, die sowohl PI-negativ als auch AnnexinV-negativ ist, die lebende Population dar. Die Zellen, die lediglich AnnexinV-positiv sind, sind früh apoptotisch. Doppelt positive Zellen hingegen repräsentieren die spät apoptotischen und nekrotischen Zellen.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzyklusverteilung mittels PI-Färbung

Die Zellen oder bestimmte Strukturen, wie die nukleäre DNA können durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie PI angefärbt werden. Durch Anregung des Farbstoffs mittels eines geeigneten Lasers, wird Fluoreszenz emittiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zum DNA-Gehalt einer Zelle. Dadurch ist es möglich, anhand des DNA-Gehalts den Zellzyklusstatus einer Zelle zu bestimmen. Die subG1-Population ist durch fragmentierte, apoptotische Zellen charakterisiert, die degradierte DNA aufweisen. Deshalb besitzen sie in der Messung die niedrigste Fluoreszenzintensität. Danach folgt die G1-Phase (2n), die S-Phase (Replikation der DNA), sowie die G2-Phase (4n).

Für die Messung wurden die Leukämiezellen in 12-Well Zellkulturplatten in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL und die MEFs in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/mL/Well ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren für 24-48 h behandelt. Danach wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei den MEFs mitgenommen. Diese wurden vorher durch Trypsinieren von der Plattenoberfläche gelöst. Es folgte ein Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Zellsedimente in 100 μ L kaltem PBS resuspendiert und die Zellen durch tropfenweise Zugabe von 1 mL 80% eiskaltem EtOH für mind. 1 h bei -20°C fixiert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 2000 U/min abzentrifugiert und in einem Gemisch von 333 μ L PBS und 1 μ L RNase (SL: 10 mg/mL) resuspendiert. Die Inkubation mit RNase erfolgte bei RT für 1 h. Die Proben wurden mit 164 μ L PI-Lösung (SL: 50 μ g/mL) versetzt und fortan lichtgeschützt auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben direkt am

Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FACSDiva 7.0 und der *Flowing 2* Software.

2.2.3.3 Messung der Autophagie mittels Cyto-ID®-Färbung

Die Induktion von Autophagie in lebenden Zellen resultiert in der Akkumulation von autophagischen Vesikeln. Diese können in den Zellen zusätzlich durch Cyto-ID®-Färbung am Durchflusszytometer detektiert werden. Der kationische, amphiphile Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID® *Green* gilt als ein selektiver Marker für Autolysosomen und Autophagosomen. Lysosomen werden nur sehr schwach angefärbt, was die Spezifität des Farbstoffs erhöht. Die Analyse erfolgte mithilfe des Cyto-ID® Autophagie Detektionskits [325, 326].

Zur Analyse der Autophagieinduktion in Leukämiezellen wurden niedrigere Zellzahlen als in anderen Versuchen ausgesät, um die basale Autophagierate möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden am Vortag der Behandlung in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ /mL in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Die Inkubation mit den Inhibitoren erfolgte für 24-48 h. Die Zellen wurden anschließend in FACS-Röhrchen überführt und bei $250 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit PBS (5 min, $250 \times g$). Inzwischen wurde der Cyto-ID®-Farbstoff 1:1000 in RPMI Medium ohne Phenolrot mit 5% FCS verdünnt. Die Zellpellets wurden in 250 μ L farblosem RPMI/5% FCS resuspendiert und danach 250 μ L der Cyto-ID® Verdünnung hinzugefügt. Die Ansätze wurden vorsichtig gevortext und für 30 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden 2 mL PBS zugegeben und die Proben bei $250 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Die Überstand wurde abgesaugt und die Proben erneut mit 1 mL PBS (5 min, $250 \times g$) gewaschen. Zur Messung wurden die Zellen in 500 μ L PBS aufgenommen und bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gehalten. Die Proben wurden direkt am Durchflusszytometer gemessen und die Daten mithilfe der FACSDiva 7.0 Software ausgewertet.

2.2.3.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels DiOC6-Färbung

In lebenden Zellen wird der Fluoreszenzfarbstoff *3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide* [DiOC6] zur Beobachtung des mitochondrialen Membranpotentials (ψm) verwendet. Dieser lipophile, kationische Farbstoff sammelt sich in der mitochondrialen Matrix an und kann so Änderungen im ψm detektieren.

Für das Experiment wurden K562 Zellen in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Inhibitoren für 24-48 h behandelt. 30 min vor der Ernte wurden die Zellen mit 50 nM DiOC6 Farbstoff lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach 30 min

wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen, um überschüssigen Farbstoff von der Zelloberfläche zu lösen. Nach der Zentrifugation (1300 U/min, 5 min) wurden die Zellen in 0,5 mL PBS aufgenommen und direkt am Durchflusszytometer mit dem FITC-Kanal gemessen. Die Daten wurden mithilfe der Software FACSDiva 7.0 sowie *Flowing 2* analysiert.

2.2.4 Immunfluoreszenz-Färbungen

2.2.4.1 RPA/ γ H2AX-Färbung

Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser (20x20 mm) wurden für 90 min in Diethylether gereinigt und anschließend mit 100% EtOH, 70% EtOH sowie mit H₂O_{bidest.} für jeweils 5 min gewaschen. Die Oberfläche der Deckgläser wurde für 20 min mit 1 M HCl behandelt und so aufgeraut, damit eine Anheftung der Zellen möglich ist. Danach wurden die Deckgläser in 70% EtOH bei -20°C gelagert.

Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Für die RPA/ γ H2AX Färbung wurden die Deckgläser in eine 6-Well Zellkulturplatte gelegt. Nach vollständigem Verdampfen des EtOHs wurden 3×10^5 Zellen für 5 min bei 1300 U/min abzentrifugiert und in 10 μ L PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Deckglas gebracht und mit der Pipettenspitze kreisförmig verteilt. Die Zelldichte wurde mit dem Lichtmikroskop überprüft und die Zellen wurden für 5 min antrocknen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 6 min in Methanol:Aceton (7:3) bei -20°C fixiert, einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 2,5% Paraformaldehyd bei RT erneut fixiert. Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang mit PBS.

Antikörper- und TO-PRO3-Färbung

Die Zellen wurden für 1 h mit 100 μ L 10% Ziege Normal Serum in PBS bei RT geblockt. Anschließend wurde die Blockierlösung abgenommen und die Zellen mit 100 μ L Primärantikörper-Lösung [RPA und γ H2AX] jeweils 1:1000 verdünnt in 1% BSA/0,01% Triton X-100/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf dem Deckglas 2x 5 min mit PBS, 1x 2 min mit PBS *high salt* (0,4 M NaCl) und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 100 μ L der Sekundärantikörper-Lösung [F(ab)₂ *fragment* AlexaFluor 488 Ziege anti-Maus und Cy3 Ziege anti-Kaninchen] jeweils 1:300 verdünnt in 1% BSA/0,01% Triton X-100/PBS für 1 h bei RT. Es erfolgte ein weiterer Waschschritt mit PBS und PBS *high salt* wie zuvor beschrieben. Der Zellkern wurde für 15 min mit

TO-PRO3 (100 μM) 1:100 verdünnt in PBS bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Deckgläser zum Waschen kurz in PBS eingetaucht.

Versiegelung der Proben und Auswertung

Die Deckgläser mit den fixierten Zellen wurden auf bereits mit 10 μL *Vectashield* versehene Objektträger gebracht und anschließend mit durchsichtigem Nagellack versiegelt und so vor dem Austrocknen und Ausbleichen geschützt. Bis zur Analyse am konfokalen Mikroskop LSM710 mit der Software Zen 2009 wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung der RPA Foci wurde mithilfe der *ImageJ* Software und eines geeigneten Makros (100 Zellen/Probe) durchgeführt. Die Quantifizierung der Mittleren Fluoreszenzintensität von dem γH2AX -Signal erfolgte ebenfalls mit *ImageJ*.

2.2.4.2 LC3B-Färbung

Während der Autophagie findet eine Akkumulation von LC3B statt. Dieses Protein ist ein essentieller Bestandteil der Membranen autophagischer Vesikel. Der Nachweis von LC3B kann neben der Detektion durch Western Blot, auch mittels Immunfluoreszenz erfolgen. Für das Experiment wurden K562 Zellen in 12-Well Zellkulturplatten bei einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 h mit den Inhibitoren für 48 h behandelt. Die zuvor vorbereiteten Deckgläser wurden in 6-Well Zellkulturplatten platziert. 3×10^5 Zellen pro Probe wurden für 5 min bei 1300 U/min abzentrifugiert und in 10 μL PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Pipettenspitze auf dem Deckglas verteilt und für 3-5 min bei RT antrocknen gelassen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min mit 2 mL eiskaltem Methanol bei -20°C. Anschließend wurden die Zellen mit PBS für 5 min gewaschen und in eine Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit überführt, um eine Austrocknung während den folgenden Inkubationsschritten zu verhindern. Die Zellen auf den Deckgläsern wurden mit 100 μL Blockierlösung aus 5% BSA/0,3% Triton X-100 in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Zellen mit 100 μL LC3B Primärantikörper-Lösung 1:200 verdünnt in 1% BSA/0,3% Triton X-100/PBS für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser 3x 5 min mit PBS unter Schütteln gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden mit 100 μL Sekundärantikörper-Lösung [F(ab)₂ fragment AlexaFluor 488 Ziege anti-Kaninchen] 1:400 verdünnt in 0,3% Triton X-100/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte für 15 min eine Zellkern Färbung mit 100 μL TO-PRO3-Lösung (SL: 100 μM) 1:100 verdünnt in PBS. Zum Entfernen von TO-PRO3 wurden die Deckgläser kurz in PBS eingetaucht und durch *Vectashield* auf Objektträger fixiert. Bis zur Analyse am LSM 710 wurden die Präparate bei 4°C gelagert. Die Auswertung der Mittleren Fluoreszenzintensität von dem LC3B-Signal erfolgte mithilfe der *ImageJ* Software (100 Zellen/Probe).

2.2.5 Transfektion von siRNA mittels Elektroporation

Die Transfektion von siRNA (*small interfering RNA*) ist ein wertvolles Werkzeug, um in Zellen Gene gezielt stumm zu schalten [327]. siRNAs sind kurze doppelsträngige RNA-Stücke, die in eukaryotischen Zellen natürlich vorkommen und für den Abbau von spezifischen mRNAs und somit für die Abnahme der entsprechenden Proteinexpression verantwortlich sind. Bei dem Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) gibt es einen Enzymkomplex, auch RISC (*RNA-induced silencing complex*) genannt, der u.a. aus dem komplementären Strang des Leitstrangs besteht. Der RISC Komplex bindet an die passende mRNA und spaltet diese an bestimmten Stellen. Der Abbau der spezifischen mRNA führt schließlich zur Reduktion der entsprechenden Proteinexpression (*Knock-down*) [328]. Die Methode der RNAi wird in der Forschung oft verwendet, um in Zellen die Expression von Proteinen und deren Funktion in den verschiedenen Signalwegen zu untersuchen [327].

Die Transfektion von Suspensionszellen mit siRNA erfolgte mithilfe der *Nucleofector*TM-Technologie, welche auf der Elektroporation basiert. Dabei werden die Zellen und die siRNA in einem speziellen Puffer aufgenommen und in einem Elektroporationsgerät in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Impulsen mit hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die DNA in die Zelle eingeschleust wird [329]. Die Effizienz der Transfektion wird anschließend mittels Western Blot überprüft.

Die Transfektion von Suspensionszellen mit siRNA wurde mithilfe des Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V (oder des Ingenio Kits, Mirus, 100 µL pro Probe) durchgeführt. Pro Probe wurden 1x10⁶ K562 Zellen verwendet. Die Elektroporation wurde gemäß des ATCC[®] Protokolls für K562 mit dem Amaxa[®] Nucleofector[®] II Gerät von Lonza ausgeführt. Dabei wurden entweder 100 pmol siRNA [Kontroll-siRNA B/sc-44230; siRNA gegen NOXA/sc-37305 (Santa Cruz); siRNA gegen BECN1/MQ-010552-01-0002, ATR/M-003202-05-0005 (siGENOME siRNA, GE Dharmacon); siRNA gegen TP73/LQ-003331-00-0002 (ON-TARGETplus siRNA, GE Dharmacon)] oder 5 µg pcDNA3.1 bzw. MYC-p73 (bereitgestellt von i)) eingesetzt. Mit dem T-016 Programm elektroporierte Zellen wurden direkt in 6-Well Zellkulturplatten überführt (1x10⁶ Zellen/Well) und für 24 h in 2 mL Medium/Well kultiviert. Danach wurden 2 mL Medium zu jedem Well hinzugefügt und die Zellen direkt in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 2 h Ruhezeit wurden diese Zellen mit Inhibitoren für 24-48 h behandelt.

2.2.6 Einzelzellgelelektrophorese (*Comet Assay*)

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch *Comet Assay* genannt, ist eine nützliche Methode, um DNA-Schäden in einzelnen Zellen nachzuweisen. Der Assay wurde erstmals von Östling und Johanson im Jahre 1984 zum Nachweis von DSBs entwickelt [330]. 1988 wurde die Methode von Singh weiterentwickelt. Durch die Verwendung von basischen Puffern können nun auch ESBs detektiert werden [331]. Das Prinzip des *Comet Assays* beruht auf der Mikroelektrophorese von fragmentierter DNA. Intakte DNA ist nicht in der Lage im elektrischen Feld zu wandern, deshalb bildet sie den „Kopf des Kometen“. Wohingegen geschädigte, fragmentierte DNA aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld wandern können und deshalb der Größe nach in der Agarose aufgetrennt werden. Es erscheint ein Schweif aus DNA-Bruchstücken, der wie ein Komet aussieht. Die Zellen werden vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und unter einem UV-Mikroskop ausgewertet. Es wird zwischen dem alkalischen und dem neutralen *Comet Assay* unterschieden. Der alkalische *Comet-Assay* ermöglicht die Detektion von ESBs und DSBs, während bei dem neutralen *Comet Assay* nur die DSBs nachgewiesen werden können [332, 333].

2.2.6.1 Alkalischer *Comet Assay*

Vorbereitung der Objektträger

1,5% Agarose wurde in PBS aufgeköcht. Spezielle Objektträger (*frosted end*) wurden darin eingetaucht, kurz abtropfen gelassen und die Unterseiten abgewischt. Die so beschichteten Objektträger wurden über Nacht getrocknet und bei RT gelagert.

Vorbereitung der LMP-Agarose

Low Melting Point-Agarose (0,5%, LMP) wurde mindestens 1 h vor dem Experiment in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgeköcht und in einem Wasserbad bis zur Verwendung auf 37°C temperiert.

Vorbereitung der Zellen

K562 Zellen wurden in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit Inhibitoren für 24-48 h behandelt. Die Zellen wurden geerntet, gezählt, auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt und auf Eis gehalten. 10 μL der Zellsuspension wurden in 120 μL 0,5% LMP-Agarose (37°C) aufgenommen, auf die beschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt. Anschließend wurden diese zur Abkühlung 4-5 min in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Die Deckgläser wurden seitlich abgezogen und die Objektträger für mindestens 1 h bei 4°C im vorgekühlten Lysepuffer inkubiert.

Elektrophorese

Die Präparate wurden in die Elektrophoresekammer gelegt, 2-3 mm mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer überschichtet und 20 min für die Alkalidenaturierung der DNA und Exposition verschiedener Klassen alkalilabiler Stellen bei 4°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 25 V und 300 mA bei 4°C für 15-30 min durchgeführt.

Fixierung und Färbung

Die Präparate wurden 3x 5 min vorsichtig mit Neutralisationspuffer überschichtet, kurz in H₂O_{bidest.} getaucht, für 5 min in 100% EtOH fixiert und für 2 h bei RT getrocknet. Die DNA wurde mit 50 µL PI-Lösung (SL: 50 µg/mL) angefärbt. Die Objektträger wurden direkt mit einem Deckglas eingedeckelt und sofort unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einer CCD Kamera analysiert. Dabei wurden pro Probe 50 Zellen gemessen. Die relative Kometenlänge (*Olive Tail Moment*, OTM) sowie die Schweifintensität (*Tail* Intensität) wurden mithilfe der *Comet IV* Software ausgewertet. In den Abbildungen ist der DNA-Schaden als *Tail* Intensität dargestellt. Dieser entspricht dem Signal des Schweifes und somit der Menge an fragmentierter DNA, die im elektrischen Feld gewandert ist.

Die Inkubationszeit der Zellen/Präparate im Lysepuffer/Elektrophoresepuffer sowie die Dauer der Elektrophorese ist abhängig vom Zelltyp. Diese Parameter sollten daher beim ersten Versuch definiert und dann beibehalten werden.

2.2.6.2 Neutraler *Comet Assay*

Die Durchführung des neutralen *Comet Assays* erfolgte im Grunde ähnlich dem alkalischen *Comet Assays*, nur mit folgenden Modifikationen: Der Lysepuffer und Elektrophoresepuffer variierten. Die Elektrophorese erfolgte bei 0,7 V/cm. Die Präparate wurden danach direkt in H₂O_{bidest.} getaucht und in 100% EtOH fixiert.

2.2.7 Untersuchung der mRNA Expression

2.2.7.1 RNA-Isolation

K562 Zellen wurden in 10 cm Schalen in einer Zelldichte von 2x10⁵ Zellen/mL ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen für 24 h behandelt. Die Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mithilfe des *NucleoSpin*[®] RNA II Kits (Machery-Nagel) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde die RNA in 30 µL RNase-freiem H₂O eluiert. Die RNA Konzentration im Eluat wurde spektroskopisch am *NanoDrop*[®]-ND-1000 bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gegen H₂O_{bidest.} als Referenz gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis der Extinktion von 260 nm und 280 nm ist

ein Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA. Sie beträgt bei reiner DNA 1,8 und bei RNA $\geq 2,0$. Eine Verunreinigung durch Proteine kann bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert werden.

2.2.7.2 Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase

Anschließend wurde die mRNA mittels der Reversen Transkriptase unter Verwendung eines Oligo dT Primers in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Die Synthese von cDNA aus der Gesamt-RNA erfolgte mithilfe des Verso™ cDNA Kits nach Angaben des Herstellers im MyCycler™ Thermal Cycler.

Programm:

60 min 42°C

2 min 95°C

∞ 4°C).

Für die Reaktion wurden 0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der Ansatz der synthetisierten cDNA wurde mit sterilem H₂O auf 50 µL eingestellt. Die Konzentration und Reinheit der cDNA wurde danach erneut am *NanoDrop*®-ND-1000 ermittelt.

2.2.7.3 Quantitative *Real-Time* PCR

Es folgte eine quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) mit der synthetisierten cDNA als Matrize. Für die qRT-PCR wurde das SensiMix™ SYBR *Green & Fluorescein* Kit verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR *Green* interkaliert in doppelsträngige DNA und der entstandene Komplex absorbiert bei 492 nm und zeigt eine Emission bei 524 nm [334]. Mit der Amplifikation der cDNA steigt die Menge der doppelsträngigen DNA und somit auch die Fluoreszenz. Die Amplifikation wird solange wiederholt, bis das Signal während der exponentiellen Phase der Amplifikation die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Zyklus wird als „Threshold Cycle“ (Ct) bezeichnet und bildet die Grundlage für die Quantifizierung [335]. Als relatives Maß der Expression diente dabei die Ct der *housekeeping* Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) und (*ACTB*). Die Ansätze für die qRT-PCR wurden auf spezielle 96-Well Platten pipettiert, welche während der Reaktion mit einer Klebefolie verschlossen wurden. Alle Ansätze wurden in technischen Triplikaten ausgeführt. Von jedem spezifischen Primer-Paar wurde zusätzlich eine Leerkontrolle ohne cDNA hergestellt. Die verwendeten Primer sind unter dem Abschnitt **2.1.8** aufgelistet.

PCR-Ansatz (Endvolumen: 20µL)

2 µL 1:10 Verdünnung der cDNA

0,5 µL 1:10 Verdünnung des *Forward*-Primers

0,5 µL 1:10 Verdünnung des *Reverse*-Primers

7 µL H₂O_{bidest.}

10 µL SYBR *Green*

Die qRT-PCR wurde im CFX96 *Real-Time* PCR Detektionssystem mit folgendem Programm durchgeführt:

2 min 50°C

10 min 95°C

10 sec 95°C

20 sec 55°C

20 sec 72°C

} 44 Zyklen

10 sec 95°C

5 sec 65°C-95°C in 0,5°C Schritten (Schmelzkurve)

∞ 4°C

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der CFX Manager™ Software. Die Expression der Gene wurde auf die der Referenzgene *GAPDH* und *ACTB* normalisiert. Dabei wurde die unbehandelte Kontrolle auf 1 gesetzt. Die Standardabweichung stellt die intra-experimentelle Variation dar.

2.2.8 Statistische Analysen

Die Versuche wurden auf statistische Signifikanz hin getestet. Dabei wurde je nach Versuchsaufbau *One-way* oder *Two-way* ANOVA mit dem Bonferroni's *multiple comparisons test* bei einem Vertrauensintervall von 95% angewendet. Alle statistischen Tests wurden mithilfe der Software *GraphPad Prism 6* durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Replikativer Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs induzieren apoptotische und nekrotische Prozesse in CML Zellen

Es wurde untersucht, ob eine Hemmung von Klasse I HDACs in Kombination mit replikativem Stress K562 Zellen (CML) abtöten. Der Einfluss der Behandlung auf den Zellzyklus wurde ebenfalls untersucht. Als HDACi wurde MS-275 und als RNRi wurde Hydroxyurea verwendet. Die Zellen wurden mit 1,5-5 μM MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Die Messungen wurden an einem Durchflusszytometer FACSCanto II nach AnnexinV/PI- oder PI-Färbung durchgeführt. Die Daten wurden anschließend mithilfe der FACSDiva 7.0 Software ausgewertet. Zudem erfolgte eine Analyse von apoptotischen Markerproteinen mittels Western Blot.

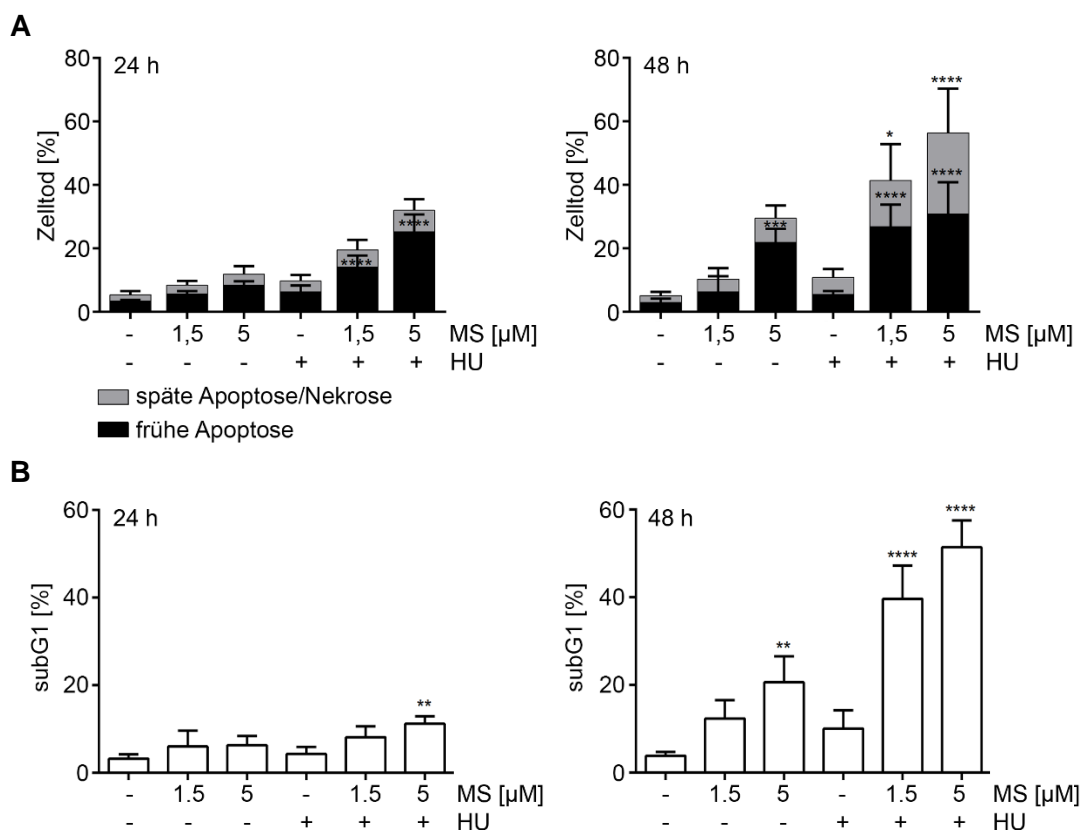


Abb. 3.1: Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 1,5-5 μM MS-275 (MS) und/oder 1 mM Hydroxyurea (HU) für 24-48 h behandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Zelltodmessung von AnnexinV/PI-gefärbten Zellen; $n=4\pm\text{SD}$; Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, * $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. **(B)** Durchflusszytometrische subG1-Messung von PI-gefärbten Zellen; $n=4\pm\text{SD}$; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

MS-275 bewirkt eine zeit- und dosis-abhängige Ansammlung von früh- und spät-apoptotischen K562 Zellen. Hydroxyurea löst keinen Zelltod aus. Die Kombination von MS-275 und Hydroxyurea induziert eine signifikante dosis-abhängige Zunahme der Apoptose nach 24 und 48 h (**Abb. 3.1A**).

Um die erzielten Daten zu untermauern, wurde eine Apoptosemessung mittels PI-Färbung von fixierten Zellen durchgeführt. Die Apoptose wird dabei anhand der subG1-Fraktion ermittelt, welche proportional zur DNA-Fragmentierung ist. MS-275 induziert in den K562 Zellen einen signifikanten und dosis-abhängigen Anstieg der subG1-Fraktion nach 48 h. Hydroxyurea hingegen induziert keine Zunahme der subG1-Fraktion. Bei der Behandlung der Zellen mit MS-275 und Hydroxyurea lässt sich jedoch eine signifikante Zunahme der subG1-Fraktion im Vergleich zu MS-275 beobachten (**Abb. 3.1B**).

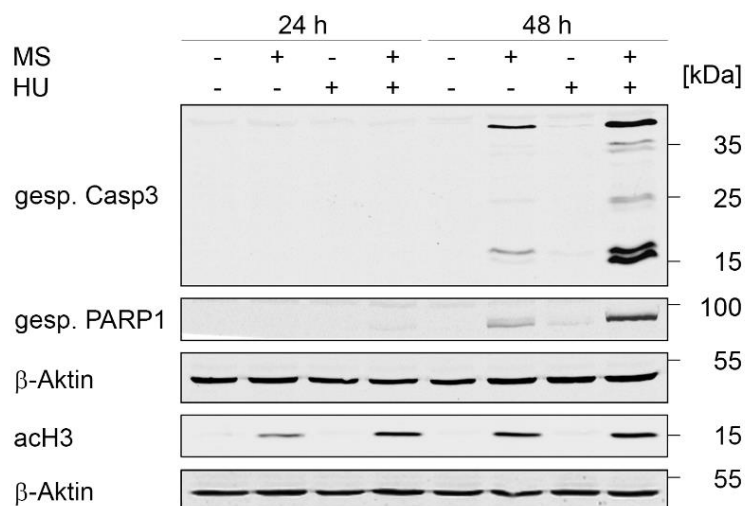


Abb. 3.2: Expression von Apoptosemarkern in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. Spaltung von Caspase 3 (gesp. Casp3) und PARP1 (gesp. PARP1) wurden mittels Western Blot detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle und acetyliertes Histon 3 (acH3) als Positivkontrolle für die Wirksamkeit von MS.

Der Prozess der Apoptose wird durch die Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen bestimmt. Diese wiederum sind an der Degradation von Zellbestandteilen und der Fragmentierung von DNA beteiligt [236, 240]. Deshalb wurden bestimmte apoptotische Markerproteine im Western Blot bestimmt. Übereinstimmend mit den Daten in **Abb. 3.1** und **Abb. 6.1A-B** zeigt **Abb. 3.2** eine starke Spaltung der Effektorcaspase 3 in MS-275 und MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen. Eine Aktivierung von Caspase 3 bewirkt eine Spaltung von PARP1, einem Substrat von Caspase 3 (**Abb. 3.2**). Die Acetylierung von Histon 3 nimmt bei Behandlung mit MS-275 zu, was die Wirksamkeit von dem HDACi bestätigt (**Abb. 3.2**).

Anschließend wurde getestet, ob andere CML Zelllinien ähnlich wie K562 Zellen gegenüber den verwendeten Substanzen reagieren. Dazu wurden LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen mit 5 μ M MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 48 h behandelt (**Abb. 6.2**). MS-275 induziert bei allen Zelllinien einen signifikanten Anstieg der subG1-Fraktion. Durch die Zugabe von Hydroxyurea nimmt die Zellzahl in der subG1-Fraktion weiter zu (**Abb. 6.2**). Betrachtet man sich die Zellzyklusverteilung von MS-275 behandelten K562 Zellen, so kann nach 24-48 h eine signifikante Arretierung der Zellen in der G1-Phase beobachtet werden

(**Abb. 3.3**). Hydroxyurea hingegen führt nach 24 h zum S-Phase Arrest der Zellen. Nach 48 h nimmt die Anzahl der Zellen in der S-Phase signifikant zu. Die Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea weist im Vergleich zur Kontrolle keine großen Unterschiede in der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen auf (**Abb. 3.3**).

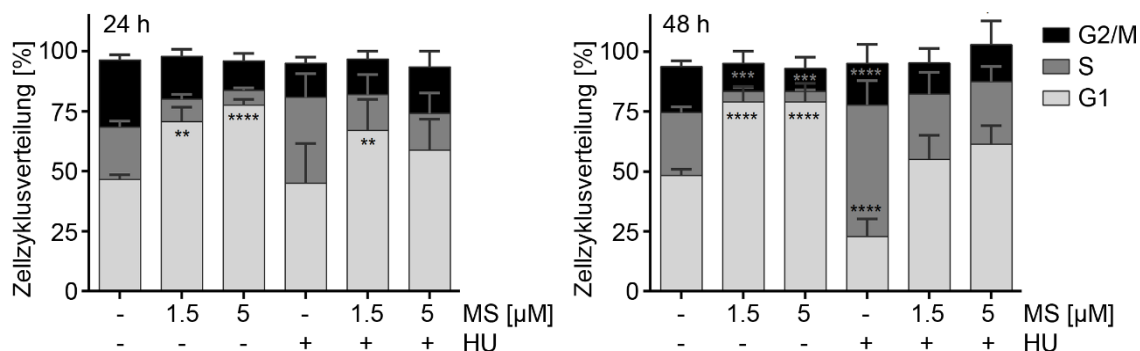


Abb. 3.3: Zellzyklusverteilung von K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 1,5-5 µM MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte am Durchflusszytometer mittels PI-Färbung; $n=4\pm SD$; Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass das Überleben von ruhenden und gestressten Leukämiezellen abhängig ist von der Aktivität von Klasse I HDACs. Eine Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea führt zudem zu einem signifikanten und synergistischen Anstieg der Apoptose in CML Zellen. Die Einzelbehandlung mit MS-275 arretiert die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Hydroxyurea hingegen führt zu einem S-Phase Arrest der Zellen.

3.2 Replikativer Stress induziert Autophagie in CML Zellen

Im nächsten Schritt wurde in den K562 Zellen der Einfluss von MS-275 und Hydroxyurea auf die Autophagie untersucht. Die Zellen wurden mit 5 µM MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Danach wurden sie mit Cyto-ID® angefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Bei Induktion von Autophagie erfolgt eine Akkumulation von Autophagosomen, welche durch den Farbstoff angefärbt werden. Gemessen wird eine Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal. Die Zellen wurden zusätzlich mit 10 µM Chloroquin behandelt. Chloroquin hemmt die Autophagie, indem es die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen verhindert. Dadurch steigt die Zahl der Autophagosomen in den Zellen bei Induktion zusätzlich an. Somit dient Chloroquin hier als Kontrolle für die Induktion von Autophagie. Des Weiteren wurden autophagische Regulatorproteine mittels Western Blot und Immunfluoreszenz nachgewiesen.

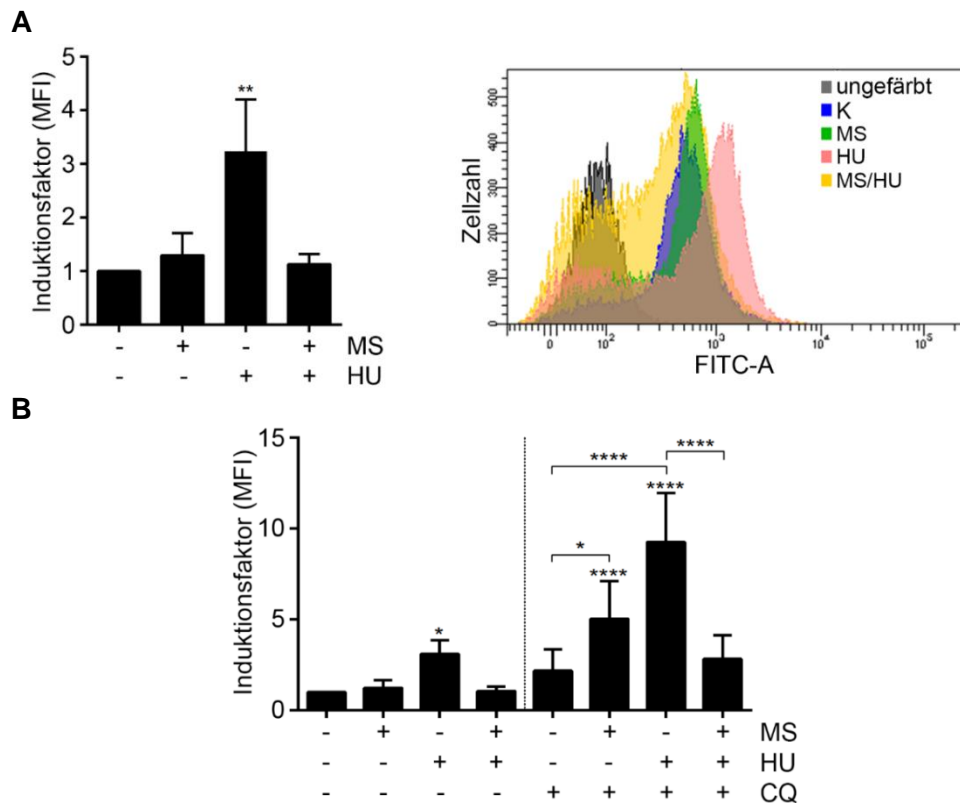


Abb. 3.4: Autophagieinduktion in K562 Zellen durch Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. **(A)** Die durchflusszytometrische Messung der Autophagieinduktion erfolgte mittels Cyto-ID®-Färbung. Repräsentative Histogramme sind in einem *Overlay* dargestellt. **(B)** Zellen wurden zusätzlich mit 10 μ M Chloroquin (CQ) behandelt; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Signals; $n=3\pm$ SD; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

Die Cyto-ID®-Färbung in **Abb. 3.4A** zeigt, dass MS-275 eine 1,5-fache und Hydroxyurea eine 4-fache Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität in K562 Zellen nach 48 h bewirkt. Dabei ist die Induktion von Autophagosomen nach Behandlung mit Hydroxyurea signifikant erhöht und die bei Kombinationsbehandlung MS-275/Hydroxyurea ähnlich wie in der Kontrolle. Repräsentative Histogramme einer Autophagiemessung sind in einem *Overlay* dargestellt (**Abb. 3.4A**). Die Akkumulation von Autophagosomen nach Zugabe von Hydroxyurea und die Unterdrückung von Hydroxyurea induzierter Autophagie durch MS-275 kann entweder an einer Zunahme des *Turnovers* von Autophagosomen oder aber an einer Hemmung des autophagischen Flusses liegen. Deshalb wurden die behandelten K562 Zellen zusätzlich mit CQ behandelt, welches die Ansäuerung der Autophagosomen verhindert [336]. Nach 48 h kann eine signifikante Zunahme des FITC-Signals mit MS-275/CQ und verstärkt mit Hydroxyurea/CQ in K562 Zellen beobachtet werden (**Abb. 3.4B**). Nach 24 h bewirkt ausschließlich Hydroxyurea/CQ einen signifikanten Anstieg (**Abb. 6.3A**). Die Kombination aus MS-275/Hydroxyurea und CQ hingegen weist im Vergleich zur Kontrolle nach beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede auf (**Abb. 3.4B, Abb. 6.3A**). CQ führte in den behandelten Zellen zu keiner zusätzlichen Zunahme der subG1-Fraktion nach 24 h (**Abb. 6.3B**). Andere CML Zelllinien wie LAMA-84,

MEG-01, KCL-22 und KYO-01 weisen nach Hydroxyurea Behandlung wie die K562 Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl an Autophagosomen auf (**Abb. 6.4A**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hydroxyurea und im geringeren Maße auch MS-275 Autophagie induziert, jedoch Hydroxyurea in Kombination mit MS-275 den autophagischen Fluss blockiert.

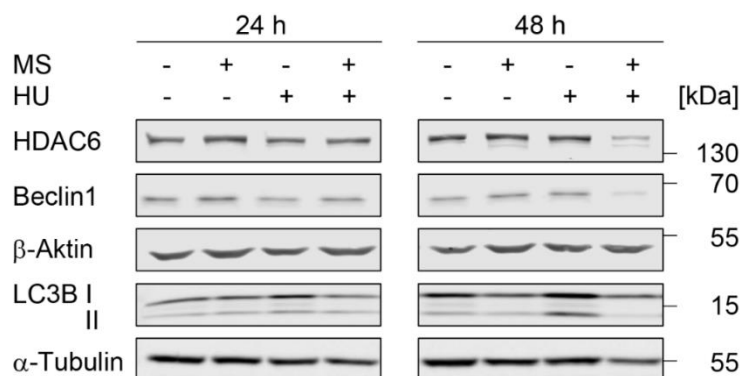


Abb. 3.5: Expression von Autophagieregulatoren in K562 Zellen nach Behandlung mit Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. Expression der autophagischen Faktoren HDAC6, Beclin1 und LC3B wurde mittels Western Blot detektiert. LC3B I (~16 kDa) wird im Verlauf der Autophagie zu LC3B II (~14 kDa) konvertiert. β -Aktin und α -Tubulin dienen als Ladekontrollen.

Deshalb kam die Frage auf, ob essentielle Autophagieregulatoren bei Behandlung mit MS-275/Hydroxyurea abgebaut werden. Western Blot-Analysen von HDAC6, Beclin1 und LC3B II zeigen, dass die Kombination nach 48 h zu einem Abbau dieser Proteine in unterschiedlichem Maße führt. Dabei wird Beclin1 am stärksten abgebaut. Einzelbehandlungen mit Hydroxyurea oder MS-275 haben keinen Einfluss auf die Expression von HDAC6 und Beclin1 (**Abb. 3.5**). Die Expression von LC3B I und LC3B II nimmt mit Hydroxyurea zeitabhängig zu. Während der Autophagie wird zytoplasmatisches LC3B I (16 kDa) zu LC3B II (14 kDa) konvertiert [284]. Mit MS-275 bleibt die LC3B Expression nach 24-48 h ungefähr vergleichbar mit der in den Kontrollzellen (**Abb. 3.5**). Die Beobachtungen bezüglich Beclin1 und LC3B Expression lassen sich auch auf die anderen CML Zelllinien übertragen (**Abb. 6.4B**).

Eine weitere Nachweismethode für die Expression von zytoplasmatischem LC3B ist die Analyse mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 48 h Hydroxyurea Behandlung. MS-275 einzeln und in Kombination mit Hydroxyurea weist dagegen keine LC3B Akkumulation auf (**Abb. 3.6A-B**).

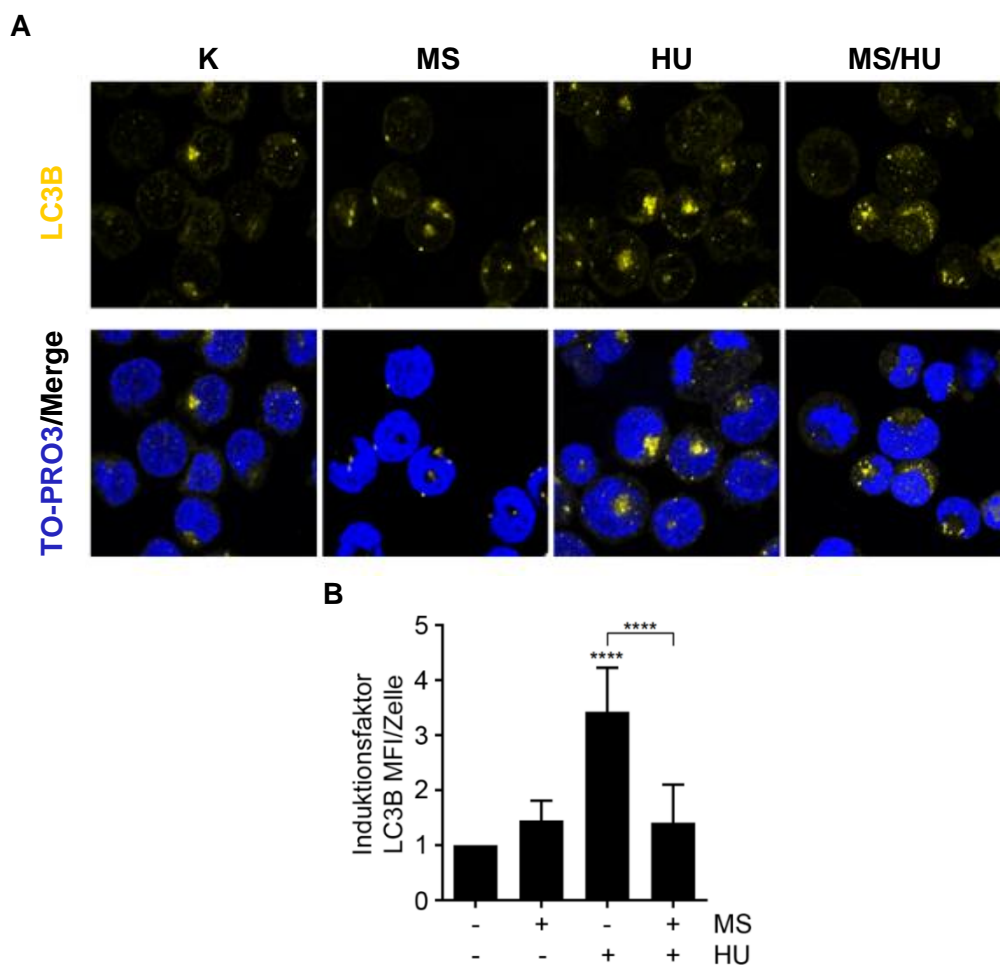


Abb. 3.6: Akkumulation von LC3B in K562 Zellen nach Behandlung mit Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. Akkumulation von LC3B (orange) wurde mittels Immunfluoreszenz ermittelt. Zellkerne wurden mit TO-PRO3 (blau) angefärbt. **(A)** Dargestellt sind repräsentative konfokale Mikroskopiebilder. **(B)** Die Quantifizierung erfolgte mit *ImageJ* (100 Zellen/Probe); MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität des LC3B-Signals; $n=3\pm$ SD; *One-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*; **** $p<0.0001$.

Zusammenfassend zeigen alle drei Nachweismethoden, dass Hydroxyurea Autophagie in den CML Zellen verstärkt induziert. In der Kombination verringert die Hemmung von HDACs durch MS-275 hingegen die Hydroxyurea induzierte Autophagie auf das Niveau der unbehandelten Leukämiezellen.

3.3 Replikativer Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs führen in CML Zellen zu einem Caspase-abhängigen Abbau von Autophagieregulatoren

Anschließend wurde mittels Western Blot untersucht, ob der Abbau von HDAC6, Beclin1, LC3B und weiteren Autophagieregulatoren, wie ATG5, LAMP2A oder HSC70, in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen durch die Hemmung von Caspasen verhindert werden kann. Dabei sind LAMP2A und HSC70 maßgeblich an der *Chaperon*-vermittelten Autophagie beteiligt [337, 338]. Als pan-Caspase Inhibitor wurde 50 μ M z-VAD-FMK eingesetzt. Des Weiteren wurde mittels RNAi überprüft, ob Beclin1, ein

essentieller Faktor in der Autophagieinitiation, eine wichtige Rolle in der Regulation der Autophagie bzw. Apoptose spielt. Dazu wurde in K562 Zellen ein *Knock-down* von Beclin1 mithilfe des Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hydroxyurea und der Kombination mit MS-275 für 24-48 h behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen mit Cyto-ID® oder PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

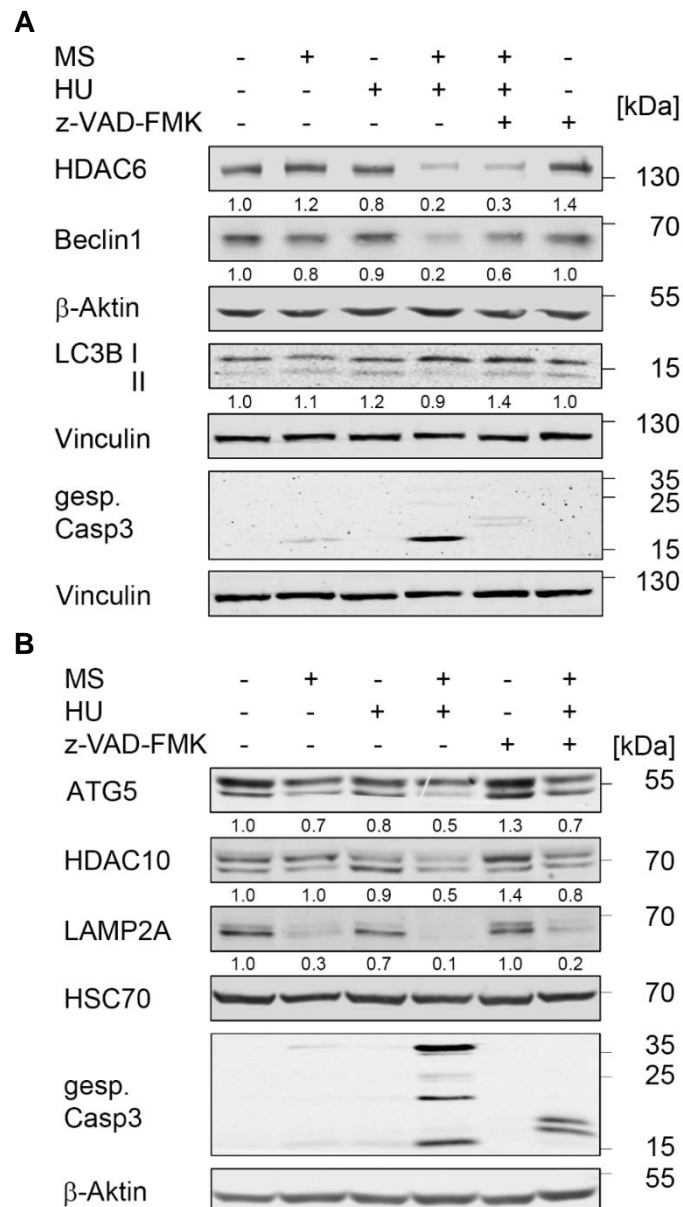


Abb. 3.7: Caspase-abhängiger Abbau von Autophagieregulatoren in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. (A) K562 Zellen wurden mit 5 µM MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. Zellen mit Kombinationsbehandlung wurden 1 h mit 50 µM z-VAD-FMK vorbehandelt. Mittels Western Blot wurde die Expression von HDAC6, Beclin1, LC3B, (B) ATG5, HDAC10, LAMP2A bestimmt. Verringerte Expression von gespaltenem Caspase 3 diente als Nachweis für die Wirksamkeit von z-VAD-FMK. HSC70, β-Aktin sowie Vinculin dienten als Ladekontrollen.

Die Einzelbehandlung mit MS-275 bewirkt in den K562 Zellen einen Abbau von weiteren autophagischen Proteinen wie ATG5, HDAC10 und verstärkt von LAMP2A (**Abb. 3.7B**).

Durch die Zugabe von z-VAD-FMK zu MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen wird der Abbau von HDAC6, Beclin1, LC3B, ATG5, HDAC10 und LAMP2A teilweise reduziert (**Abb. 3.7A-B**). Z-VAD-FMK hemmt die Aktivierung von Caspase 3 effektiv (**Abb. 3.7A-B**). Dies deutet darauf hin, dass die durch MS-275/Hydroxyurea induzierte Apoptose verantwortlich für die Spaltung der Autophagieregulatoren ist.

Der *Knock-down* von *Beclin1* (1 auf 0,2) in K562 Zellen, die mit Hydroxyurea oder MS-275/Hydroxyurea behandelt wurden, konnte mittels Western Blot verifiziert werden (**Abb. 3.8A**). Eine Cyto-ID[®]-Messung zeigt, dass durch die RNAi-vermittelte Reduktion von *Beclin1* die Hydroxyurea induzierte Autophagie signifikant reduziert wird (**Abb. 3.8B**). Die Abwesenheit von Beclin1 führt zur Zunahme der subG1-Fraktion nach Behandlung mit MS-275/Hydroxyurea. Somit fördert der *Knock-down* von *Beclin1* die durch die Kombination induzierte Apoptose in K562 Zellen (**Abb. 3.8C**). Die Behandlung der *Knock-down* Zellen mit Hydroxyurea zeigt im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede in der subG1-Fraktion (**Abb. 6.5A**). Die Zellen mit der Kombinationsbehandlung MS-275/Hydroxyurea weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen ebenfalls keine Änderungen bezüglich der Autophagieinduktion auf (**Abb. 6.5B**).

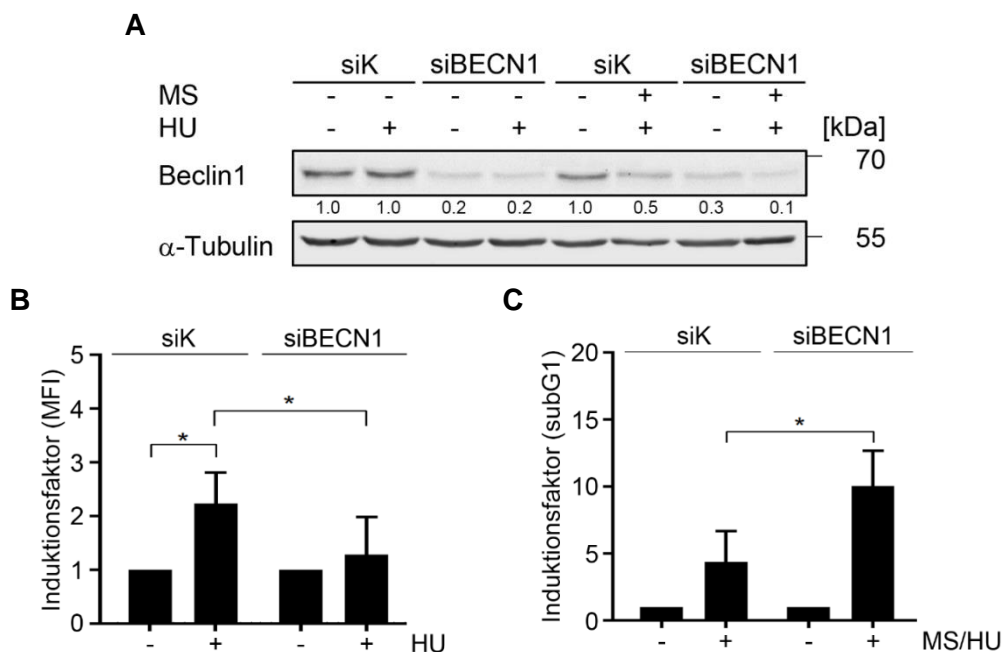


Abb. 3.8: Einfluss von Beclin1 *Knock-down* auf Autophagie- und Apoptoseinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. *Knock-down* von *Beclin1* in K562 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siK) und siRNA gegen Beclin1 (siBECN1) wurden die Zellen mit 1 mM HU und/oder 5 μ M MS für 24-48 h behandelt. **(A)** *Knock-down* wurde nach 24 h mittels Western Blot verifiziert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Cyto-ID[®]- und **(C)** PI-gefärbte Zellen wurden nach 48 h am Durchflusszytometer gemessen. Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle (=1) normiert; n=3 \pm SD; *Two-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*; *p<0.05.

Zusammengefasst betrachtet, verdeutlichen die Daten, dass in MS-275/Hydroxyurea behandelten Leukämiezellen die Apoptose *upstream* von Autophagie agiert.

3.4 Genexpression von pro- und anti-apoptotischen Faktoren in CML Zellen nach replikativem Stress und Hemmung von Klasse I HDACs

Zur Identifikation von Genen, die an der Regulation der Apoptoseinduktion durch MS-275/Hydroxyurea in K562 Zellen beteiligt sind, wurde ein mRNA-*Microarray* von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Zellzyklus- und DNA-Reparaturgene analysiert. Neben der qRT-PCR-Analyse wurde die Expression dieser und weiterer Faktoren auch auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden die K562 Zellen mit 5 μ M MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Des Weiteren wurde das mitochondriale Membranpotential der unbehandelten und behandelten Zellen durchflusszytometrisch nach DiOC6-Färbung bestimmt.

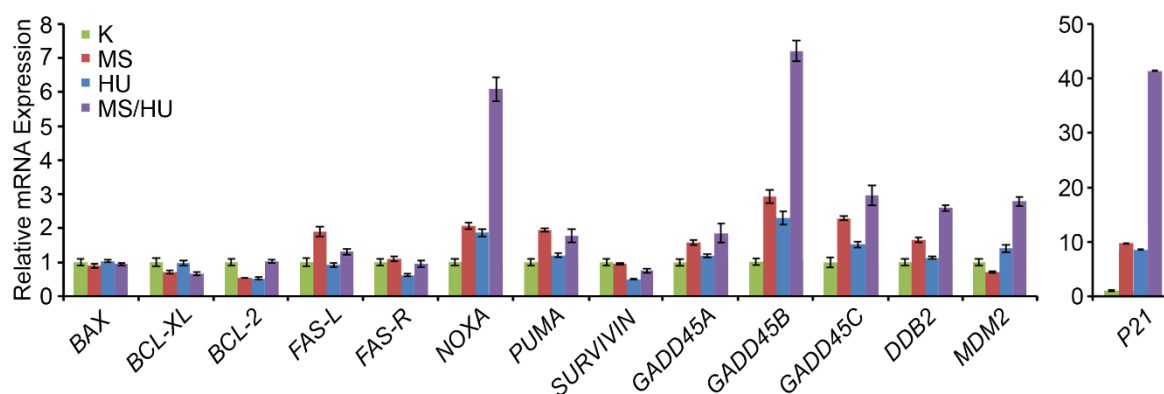


Abb. 3.9: mRNA-*Microarray* von pro- und anti-apoptotischen Regulatoren in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. Bestimmung der mRNA Expression von pro- und anti-apoptotischen Faktoren sowie von Zellzyklus-relevanten Faktoren erfolgte in Triplikaten mittels qRT-PCR. Daten wurden auf die Expression der Referenzgene GAPDH und ACTB normalisiert (K=1). SD entspricht der intra-experimentellen Variation. Der Versuch wurde von [Name] durchgeführt.

Die Expression der pro-apoptotischen Faktoren *BAX* und *PUMA* sowie der anti-apoptotischen Faktoren *BCL-XL*, *BCL-2* und *Survivin* weist auf mRNA-Ebene keine starken Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf. Dies trifft auch auf *DDB2*, *MDM2* und die zwei Faktoren *FAS-L* und *FAS-R* zu, welche in der Rezeptor-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen (**Abb. 3.9**). Eine deutliche Überexpression in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen kann bei *GADD45B* (7-fach) und bei *NOXA* (6-fach) beobachtet werden (**Abb. 3.9**). Im Vergleich zu *GADD45B* werden die anderen beiden Zellzyklus-relevanten Faktoren *GADD45A* und *GADD45C* kaum hochreguliert. *GADD45B* kann bei Stress und unter DNA-schädigenden Bedingungen einen Zellzyklusarrest auslösen [339]. Der CDKi p21 wird in MS-275 (10-fach) bzw. Hydroxyurea (9-fach) behandelten K562 Zellen auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert. Die Kombinationsbehandlung mit MS-275/Hydroxyurea (41-fach) führte dabei zu einer extrem hohen Induktion (**Abb. 3.9**).

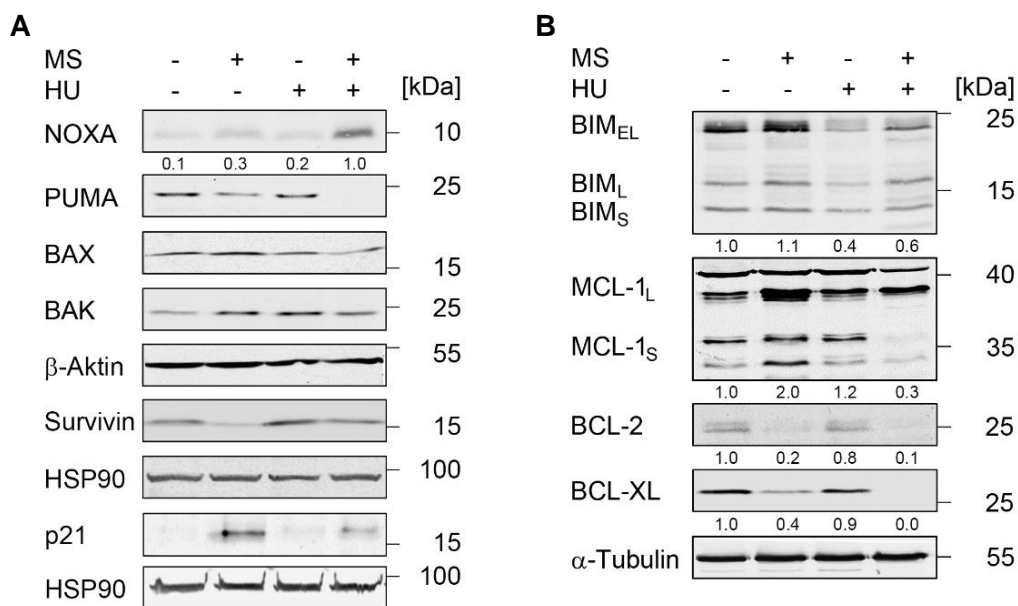


Abb. 3.10: Expression von pro- und anti-apoptischen Faktoren in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. **(A)** NOXA, PUMA, BAX, BAK, Survivin, p21, **(B)** BIM, MCL-1, BCL-2 und BCL-XL wurden mittels Western Blot analysiert; Isoformen: *Extra Large, EL; Large, L; Short, S*. β -Aktin, HSP90 und α -Tubulin dienen als Ladekontrollen.

Das BH3-*only* Protein NOXA wird nach 48 h MS-275 Behandlung leicht induziert. Nach der Kombinationsbehandlung mit MS-275/Hydroxyurea wird NOXA noch stärker exprimiert (**Abb. 3.10A**). Die Proteinexpression von BAX und BAK ändert sich nicht in den K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und/oder Hydroxyurea. PUMA dagegen wird deutlich reduziert (**Abb. 3.10A**). Das Survivin Protein wird ausschließlich mit MS-275 herunterreguliert (**Abb. 3.10A**). Survivin, als Mitglied der IAP-Proteinfamilie, hemmt Caspasen und somit die Apoptoseinduktion [254-256]. Das Protein p21 wird insbesondere durch MS-275 verstärkt exprimiert. Dagegen führte die Behandlung mit MS-275/Hydroxyurea in den K562 Zellen zu einer leichten Abnahme der p21 Expression (**Abb. 3.10A**). Betrachtet man sich **Abb. 3.10B**, so kann nach Kombinationsbehandlung ein Abbau von anti-apoptischen Faktoren wie MCL-1_S, BCL-2 und BCL-XL, sowie vom pro-apoptischen Protein BIM festgestellt werden (**Abb. 3.10B**). Dabei stellt MCL-1 den direkten Gegenspieler zu NOXA dar [262]. BCL-2 und BCL-XL werden durch MS-275 nahezu vollständig abgebaut, ähnlich wie in der Kombination. BIM_{EL} und MCL-1_{L/S} hingegen werden durch MS-275 leicht überexprimiert (**Abb. 3.10B**). Eine Einzelbehandlung mit Hydroxyurea führt zur deutlichen Reduktion der Expression von BIM_{EL/L/S} (**Abb. 3.10B**). Die Proteine BIM und MCL-1 weisen aufgrund von alternativem Splicing mehrere Isoformen (*Extra Large, EL; Large, L; Short, S*) auf. Diese können unterschiedliche Funktionen besitzen [340, 341]. Eine deutliche Induktion von NOXA durch MS-275/Hydroxyurea Behandlung lässt sich ebenfalls in LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen beobachten (**Abb. 6.6**).

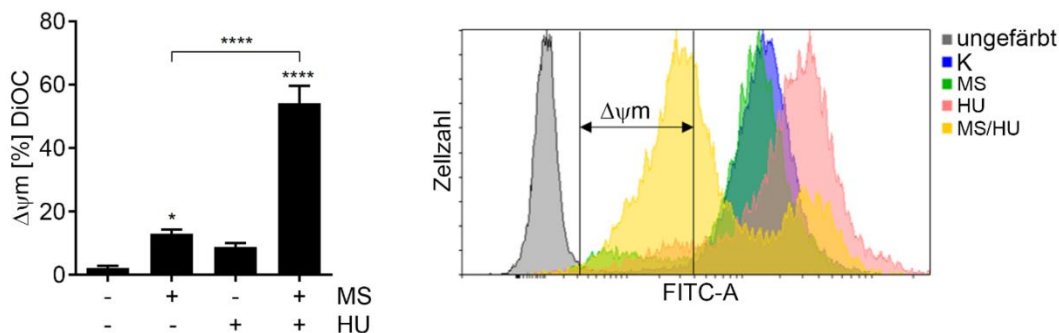


Abb. 3.11: Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurden mittels DiOC6-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative Histogramme sind in einem *Overlay* dargestellt; $n=3\pm$ SD; One-way ANOVA; Bonferroni's *multiple comparisons test*; * $p<0.05$, **** $p<0.0001$.

Eine Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in K562 Zellen zeigt, dass MS-275 allein bereits zu einem signifikanten Verlust der mitochondrialen Stabilität führt. Durch die Kombinationsbehandlung mit Hydroxyurea nimmt dieser Verlust weiterhin signifikant zu. Hydroxyurea hingegen führt zu keiner Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, was der Robustheit von K562 Zellen gegen Hydroxyurea entspricht [342]. Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme der DiOC6-Messung sind in **Abb. 3.11** dargestellt. Dabei lässt sich die Verschiebung der Zellpopulation auf der FITC-A-Achse nach replikativem Stress am wahrscheinlichsten dadurch erklären, dass DiOC6 unter den Bedingungen unspezifisch auch andere zytoplasmatische Zellkomponenten anfärbt.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die Expression des BH3-*only* Proteins NOXA durch die Kombinationsbehandlung MS-275/Hydroxyurea induziert wird. Dieses pro-apoptotische Protein scheint in diesem Kontext eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose zu spielen. Zusätzlich ist zu vermerken, dass insbesondere nach MS-275 Einzelbehandlung der CDKi p21 auf Proteinebene hochreguliert wird. Die *GADD45B* mRNA wird nach MS-275/Hydroxyurea Behandlung verstärkt exprimiert.

3.5 NOXA ist ein wichtiger Regulator in der Induktion von Apoptose durch replikativen Stress und Hemmung von Klasse I HDACs in CML Zellen

Um festzustellen, ob die Zunahme der Expression von NOXA auf mRNA- und Proteinebene relevant ist für die Induktion von Apoptose durch MS-275/Hydroxyurea, wurde NOXA in K562 Zellen mittels RNAi herunterreguliert. Nach der Transfektion mit siRNA gegen NOXA, wurden die Zellen mit 1,5-5 μ M MS-275 und 1 mM Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Der *Knock-down* von NOXA sowie die Expression von Apoptose- bzw. Autophagieregulatoren wurden mittels Western Blot überprüft. Zudem wurden die Zellen einer durchflusszytometrischen Apoptose- und Autophagiemessung unterzogen. Zusätzlich

wurden MEFs mit wildtypischem NOXA oder MEFs mit einer genetischen Deletion beider NOXA Allele verwendet. Diese wurden mit 0,5 mM Hydroxyurea und 5 μ M MS-275 für 48 h behandelt. Anschließend wurden die subG1-Fractionen der isogenen Zelllinien bestimmt. Des Weiteren wurde in den verschiedenen Zellsystemen die Induktion von DNA-Schaden mittels Western Blot untersucht.

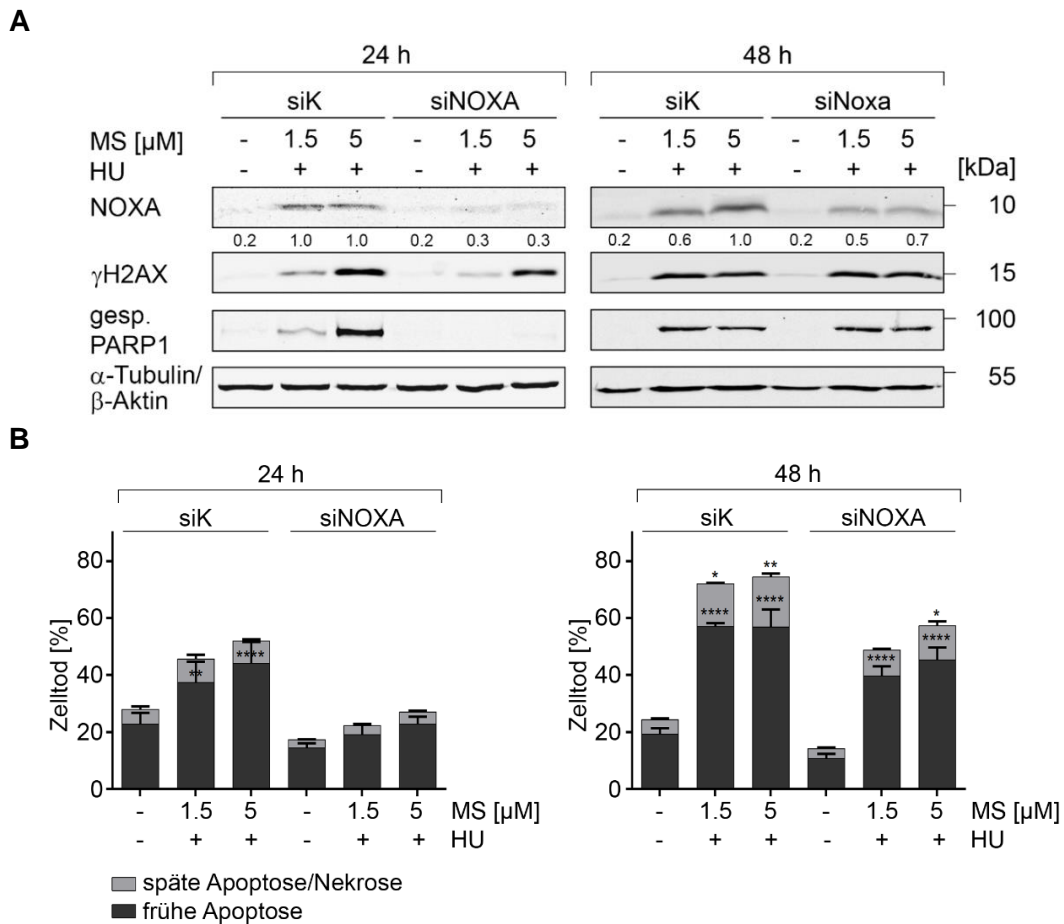


Abb. 3.12: Einfluss von NOXA Knock-down auf Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. Knock-down von NOXA in K562 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1,5-5 μ M MS und 1 mM HU für 24-48 h behandelt. (A) Knock-down von NOXA sowie Expression von γ H2AX und gespaltenem PARP1 wurden mittels Western Blot überprüft. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) AnnexinV/PI-gefärbte Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen; n=3 \pm SD; frühe Apoptose nach 24 h - siK vs. siNOXA: **** (1,5 μ M MS/HU und 5 μ M MS/HU); frühe Apoptose nach 48 h - siK vs. siNOXA: * (unbehandelt), **** (1,5 μ M MS/HU), *** (5 μ M MS/HU); Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001;

Die Transfektion mit NOXA siRNA verringerte die durch die Kombinationsbehandlung (1,5-5 μ M MS-275/Hydroxyurea) induzierte Expression von NOXA von 1 auf 0,3 nach 24 h, sowie von 1 auf 0,5-0,7 nach 48 h (Abb. 3.12A). Die Phosphorylierung von γ H2AX, welches ein Indiz für DNA-Schaden darstellt [343], nimmt in den Knock-down Zellen nach 24 h Behandlung leicht ab. Die Spaltung von PARP1, die infolge von Caspase-abhängiger Apoptose stattfindet, kann in den behandelten Kontrollzellen nach 24-48 h beobachtet werden. Dabei wird die Proteolyse von PARP1 nach 24 h Behandlung durch die Eliminierung von NOXA vollständig aufgehoben. Nach 48 h weist die Expression von

γ H2AX und gespaltenem PARP1 in den behandelten *Knock-down* Zellen hingegen keine Unterschiede im Vergleich zu den behandelten Kontrollzellen auf (**Abb. 3.12A**). Die durchflusszytometrischen Analysen der subG1-Fractionen bekräftigen die Western Blot Ergebnisse. Der *Knock-down* von *NOXA* hemmt die Induktion von Zelltod durch MS-275/Hydroxyurea nach 24-48 h signifikant. Dabei wird die Induktion nach 24 h von 45,6-52% auf 22,3-26,9% und nach 48 h von 72,5-74,4% auf 48,8-57,3% reduziert (**Abb. 3.12B**). Trotz Fehlen von *NOXA* kann in diesen Zellen eine erhöhte Zelltodrate nach 48 h beobachtet werden. Dies könnte an dem unvollständigen *Knock-down* von *NOXA* liegen, was möglicherweise durch den kompletten Verbrauch der eingesetzten Menge an *NOXA* siRNA zustande kommt (**Abb. 3.12A-B**).

Um die erzielten Daten in einem unabhängigen Model zu testen, wurden genetisch modifizierte MEFs mit wildtypischem oder negativem *NOXA* auf ihre Reaktion gegenüber replikativem Stress und der Hemmung von Klasse I HDACs hin getestet. Die *NOXA*-negativen MEFs verhindern nahezu vollständig die Apoptoseinduktion durch Hydroxyurea bzw. MS-275/Hydroxyurea, so wie sie in den *NOXA* Wildtyp MEFs nach 48 h beobachtet werden kann (**Abb. 3.13A**).

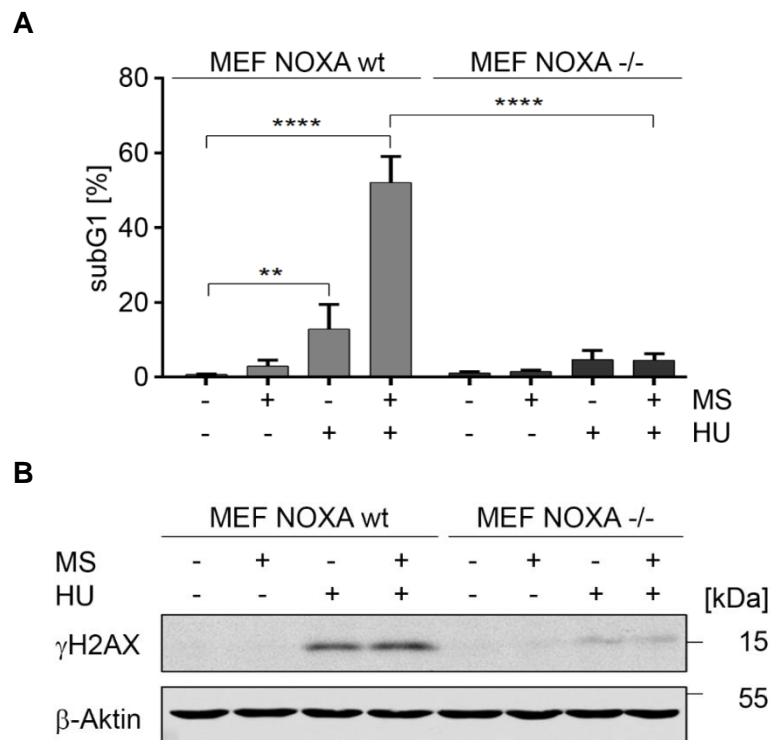


Abb. 3.13: Unterdrückung der Apoptoseinduktion in *NOXA*-negativen MEFs durch MS-275 und Hydroxyurea. *NOXA* Wildtyp (wt) und *NOXA*-negative (-/-) MEFs wurden mit 5 μ M MS und/oder 0,5 mM HU für 48 h behandelt. (A) Durchflusszytometrische Bestimmung der subG1-Fractionen mittels PI-Färbung; $n=3\pm$ SD; *Two-way* ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$. (B) Western Blot-Analyse von γ H2AX; β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend bestätigen die Analysen die Annahme, dass *NOXA* kritisch ist für die Induktion von Zelltod, die durch die Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea hervorgerufen wird.

3.6 Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs in CML Zellen

Nachdem *NOXA* als kritischer Faktor für die Induktion von Zelltod in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen identifiziert wurde, wurde nach der DNA-Schadensantwort geschaut. Dazu wurden K562 Zellen mit 5 μ M MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24-48 h behandelt. Der Nachweis der DNA-Schädigung erfolgte mittels Western Blot, *Comet Assay* und Immunfluoreszenz. Da Hydroxyurea eine komplexe replikative Stressantwort auslöst, in dem die *Checkpoint*-Kinasen ATM und ATR eine wichtige Rolle spielen [344], wurde die Aktivierung dieser Signalproteine durch MS-275 und Hydroxyurea ebenfalls untersucht. Des Weiteren wurden *downstream* Zielproteine von ATM und ATR nach ihrem Phosphorylierungsstatus überprüft.

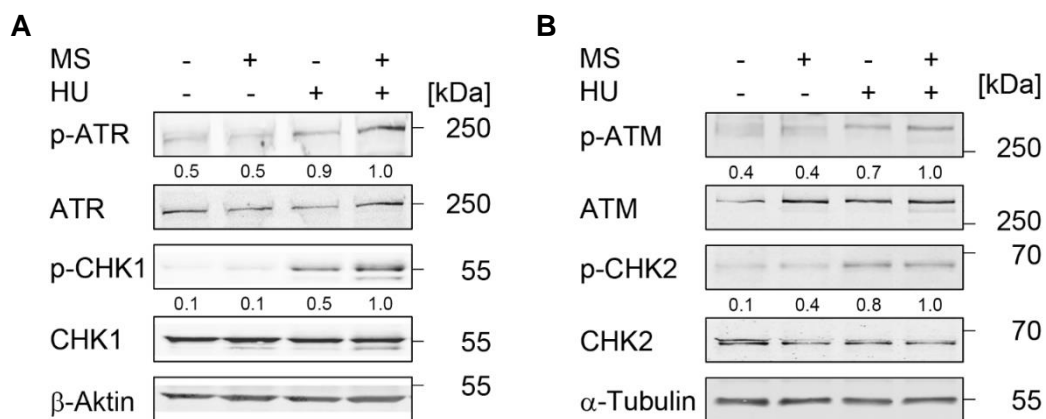


Abb. 3.14: DNA-Schadensantwort in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. **(A)** Expression von p-ATR (T1989), ATR, p-CHK1 (S317), CHK1, **(B)** p-ATM (S1981), ATM, p-CHK2 (T68) und CHK2 wurde mittels Western Blot bestimmt. β -Aktin und α -Tubulin dienten als Ladekontrollen.

Hydroxyurea führt nach 24 h zu einer starken Phosphorylierung von ATR (T1989) und ATM (S1981). Durch die Zugabe von MS-275 wird die Expression von p-ATR und p-ATM weiter verstärkt (**Abb. 3.14A-B**). Dies geht einher mit der Phosphorylierung von deren Zielproteinen CHK1 (S317) und CHK2 (T68). MS-275 allein aktiviert keinen dieser *Checkpoint*-Kinasen (**Abb. 3.14A-B**). Die gleichzeitige Expression von p-ATR und p-ATM korreliert mit der Beobachtung, dass unter replikativen Stress Situationen ATM selbst ein Zielgen von ATR darstellt [190].

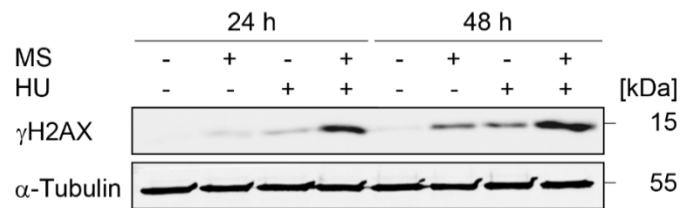


Abb. 3.15: Expression von γ H2AX in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. γ H2AX Expression wurde mittels Western Blot detektiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Entsprechend der Tatsache, dass *Checkpoint*-Kinasen Histon H2AX an S139 (γ H2AX) phosphorylieren können [240, 345], induziert die Kombinationsbehandlung aus MS-275 und Hydroxyurea in K562 Zellen eine viel stärkere Akkumulation von γ H2AX als die Einzelbehandlungen nach 24-48 h (**Abb. 3.15**). Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls auf die CML Zelllinien LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 übertragen (**Abb. 6.7**). Eine zusätzliche Hemmung von Caspasen durch z-VAD-FMK führt in K562 Zellen zu einer leichten Reduktion der MS-275/Hydroxyurea induzierten Expression von γ H2AX (**Abb. 6.8**).

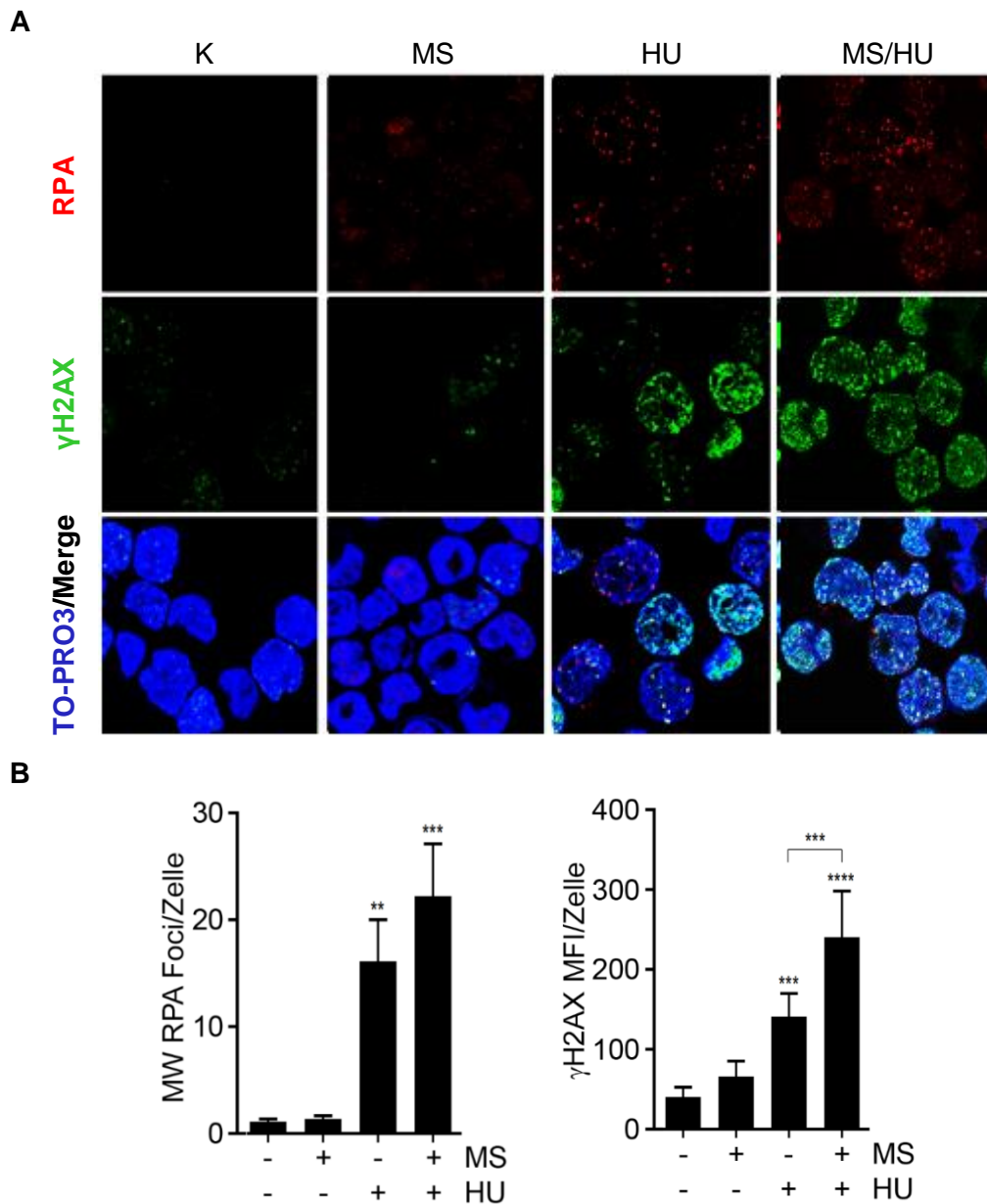


Abb. 3.16: Immunfluoreszenz-Färbung von γ H2AX und RPA in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. (A) Repräsentative konfokale Mikroskopiebilder von γ H2AX (grün) und RPA (rot). Zellkerne wurden mit TO-PRO3 (blau) angefärbt. (B) Die Quantifizierung wurde mithilfe von *ImageJ* (100 Zellen/Probe) durchgeführt; $n=3\pm$ SD; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Die Analyse von replikativem Stress und DNA-Schaden mittels Immunfluoreszenz zeigt, dass Hydroxyurea zu einem signifikanten Anstieg an RPA Foci sowie einer signifikanten Akkumulation von γ H2AX führt (Abb. 3.16A-B). Dies könnte daran liegen, dass γ H2AX auch einen Indikator für Replikationsstress darstellt [346]. Während die Einzelbehandlung von MS-275 keinen Effekt auf RPA und γ H2AX zeigt, lässt sich in Kombination mit Hydroxyurea eine leichte Zunahme an RPA Foci und eine signifikant stärkere Akkumulation von γ H2AX im Vergleich zu den Hydroxyurea behandelten Zellen beobachten (Abb. 3.16A-B).

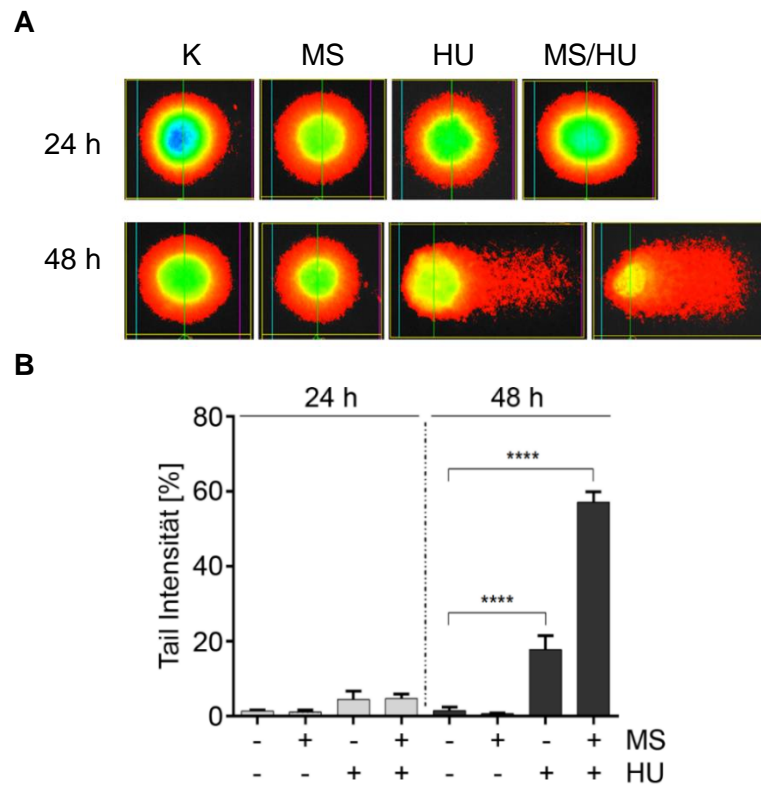


Abb. 3.17: Nachweis von ESBs und DSBs in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea mittels alkalischem Comet Assay. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. **(A)** Dargestellt sind repräsentative Mikroskopiebilder und **(B)** die Quantifizierungen des alkalischen Comet Assays; $n=3\pm$ SD; Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, **** $p<0.0001$.

Die Bestimmung von ESBs und DSBs in den K562 Zellen mittels alkalischem Comet Assay, bekräftigt die Beobachtung, dass eine Hydroxyurea Einzel- und Kombinationsbehandlung mit MS-275 DNA-Schäden nach 48 h hervorruft. Wohingegen MS-275 allein keine ESBs und DSBs verursacht (**Abb. 3.17A-B**).

Der neutrale Comet Assay zeigt im Grunde dieselben Ergebnisse wie der alkalische, nur dass mit dieser Methode ausschließlich DSBs detektiert werden können. Deshalb sind die durch Hydroxyurea induzierten ESBs hier nicht zu erkennen, sondern nur die DSBs in MS-275 und Hydroxyurea behandelten Zellen (**Abb. 3.18A-B**).

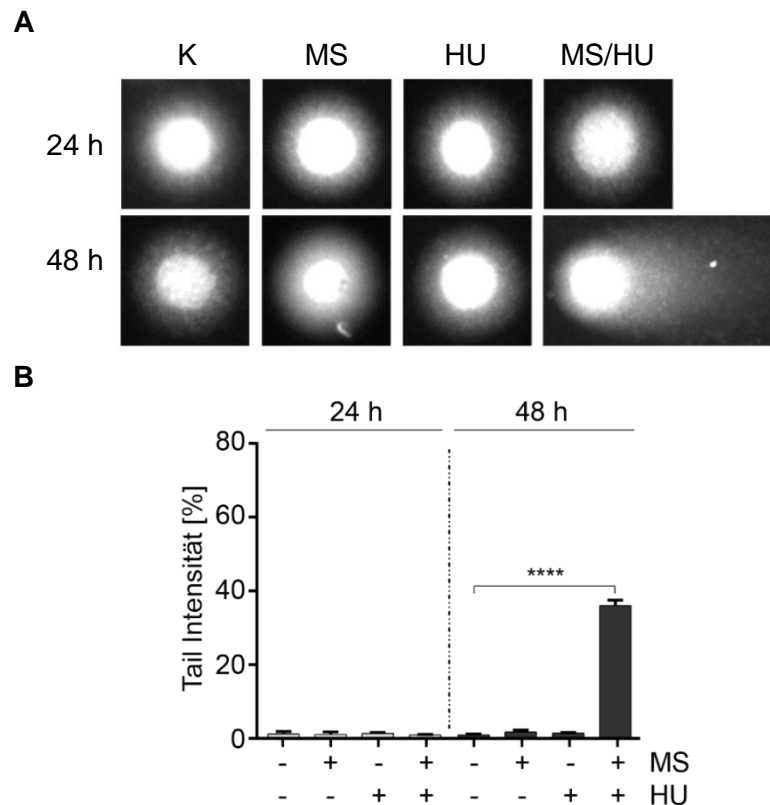


Abb. 3.18: Nachweis von DSBs in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea mittels neutralem Comet Assay. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. (A) Dargestellt sind repräsentative Mikroskopiebilder und (B) die Quantifizierungen des neutralen Comet Assays; $n=3\pm$ SD; Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, **** $p<0.0001$.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der DNA-Schädigung und der DNA-Schadensantwort, dass eine Hemmung von Klasse I HDACs mit MS-275 die Hydroxyurea induzierte Aktivierung von *Checkpoint*-Kinasen, sowie insbesondere die Menge an DNA-Strangbrüchen deutlich verstärkt.

3.7 Hemmung von ATR-CHK1 verringert in CML Zellen die Apoptoseinduktion durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs

Es ist bekannt, dass ATR und ATM das Überleben von Zellen nach replikativem Stress und DNA-Schaden negativ beeinflussen [130, 347]. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine pharmakologische Hemmung von ATR und ATM einen Einfluss auf die Induktion von Apoptose und Autophagie in CML Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea haben. Des Weiteren wurde getestet, ob die Expression von NOXA von der Aktivität der *Checkpoint*-Kinasen abhängig ist. ATR wurde zusätzlich mittels RNAi genetisch eliminiert. Als ATR-Inhibitor wurde VE-821 und als ATM-Inhibitor KU-60019 verwendet. CHK1 wurde ebenfalls mit MK-8776 gehemmt. K562 Zellen wurden jeweils 1 h vor der Behandlung mit 1 mM Hydroxyurea und 5 μ M MS-275, mit 3 μ M VE-821/KU-60019 und/oder 500 nM

MK-8776 inkubiert. Nach 24-48 h wurden durchflusszytometrische Messungen und Western Blot-Analysen durchgeführt.

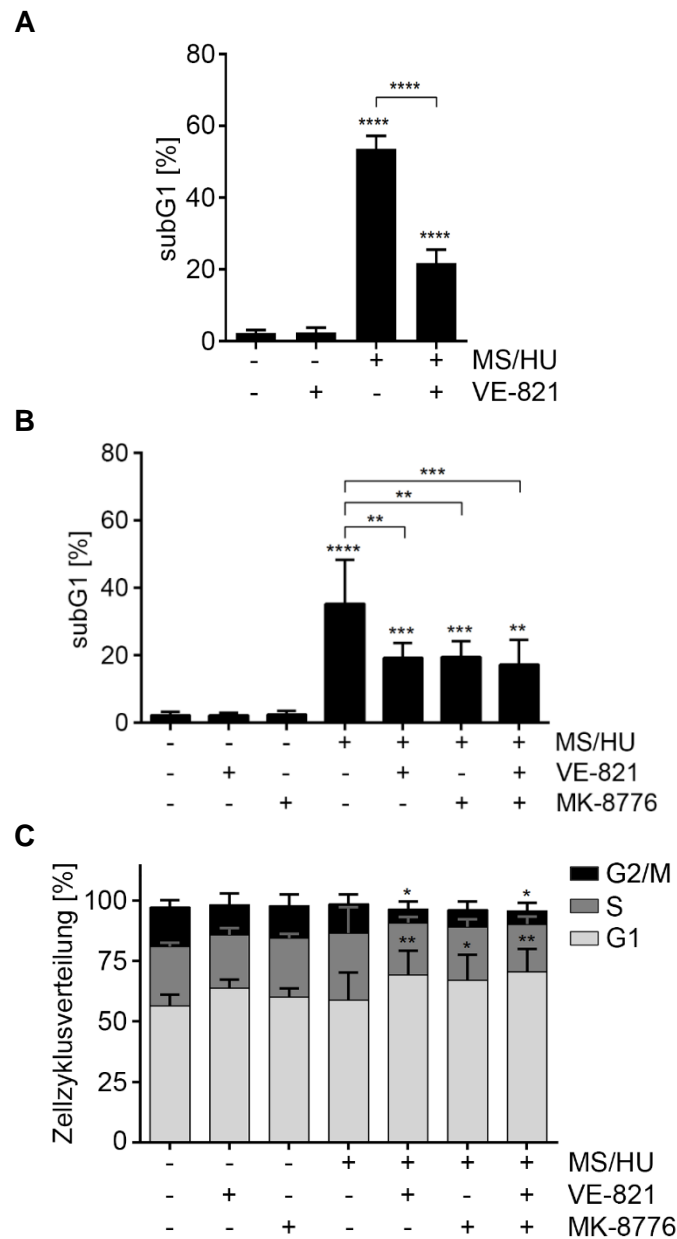


Abb. 3.19: Hemmung von ATR und CHK1 schützt K562 Zellen vor Apoptoseinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 und/oder 500 nM MK-8776 vorbehandelt. **(A-B)** SubG1-Fractionen von PI-gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer bestimmt; $n=3\pm$ SD (A); $n=6\pm$ SD (B-C); One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, $**p<0.01$, $****p<0.0001$. **(C)** Darstellung der Zellzyklusphasen; $n=6\pm$ SD; Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

Die Hemmung von ATR durch den spezifischen Inhibitor VE-821 zeigte, dass die durch MS-275/Hydroxyurea induzierte Fraktion an subG1 Zellen signifikant von 52,4% auf 23,1% reduziert wird (**Abb. 3.19A**). Die Abnahme der subG1-Fraktion nach MS-275/Hydroxyurea/VE-821 Behandlung lässt sich ebenfalls in den CML Zelllinien MEG-01, LAMA-84, KCL-22 und KYO-01 beobachten (**Abb. 6.10**). Um die Rolle des ATR-CHK1

Signalweges weiter zu untersuchen, wurde auch CHK1 in K562 Zellen pharmakologisch gehemmt. Ebenso wie VE-821, führt auch eine Inhibition von CHK1 durch MK-8776 zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Fragmentierung um 50% in MS-275/Hydroxyurea behandelten Zellen (**Abb. 3.19B**).

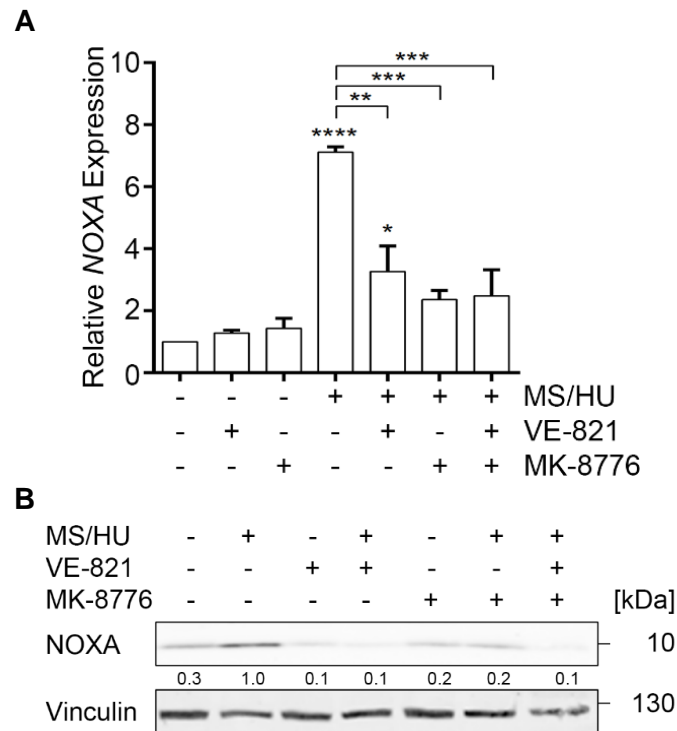


Abb. 3.20: Hemmung von ATR und CHK1 reduziert die NOXA Expression in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 24-48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 und/oder 500 nM MK-8776 vorbehandelt. **(A)** Expression von NOXA mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt (24 h). Werte wurden auf β -Aktin und GAPDH normalisiert; $n=3\pm$ SD; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. Das Experiment wurde von durchgeföhrt. **(B)** Expression von NOXA wurde mittels Western Blot bestimmt (48 h). Vinculin diente als Ladekontrolle.

Dementsprechend nimmt auch die Expression von NOXA nach Inaktivierung von ATR und CHK1 sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene in MS-275/Hydroxyurea behandelten Zellen ab (**Abb. 3.20A-B**). Eine gemeinsame Inhibition von ATR und CHK1 zeigt keine zusätzliche Wirkung bezüglich subG1-Fraktion, Zellzyklusverteilung oder NOXA Expression (**Abb. 3.19 und 3.20**). Die Reduktion von NOXA nach VE-821 Zugabe kann auch in den anderen MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zelllinien beobachtet werden (**Abb. 6.13**). Die Analyse der subG1-Fractionen nach Einzelbehandlung mit MS-275 oder Hydroxyurea weisen in Kombination mit VE-821, MK-8776 oder KU-60019 in K562 Zellen nach 48 h keine signifikanten Unterschiede untereinander auf (**Abb. 6.9A**). Betrachtet man sich die Zellzyklusverteilung dieser Zellen, so zeigen auch diese keine Abweichungen im Vergleich zur Kontrolle oder MS-275 Behandlung. Nur in Zellen, die mit Hydroxyurea und VE-821 oder MK-8776 behandelt wurden, kann eine Zunahme in der G1-Phase sowie eine

Abnahme in der S/G2/M-Phase im Vergleich zur Hydroxyurea Einzelbehandlung festgestellt werden (**Abb. 6.9B**).

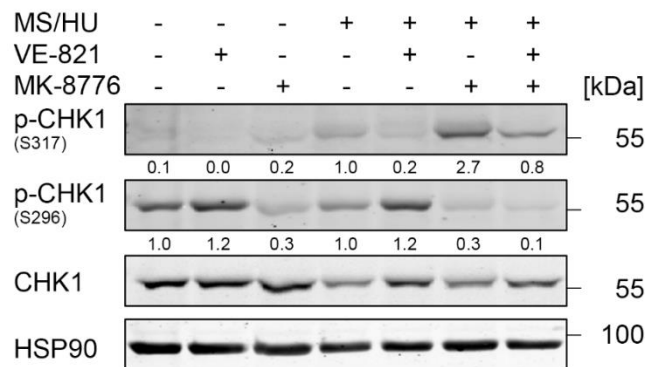


Abb. 3.21: Wirksamkeit von VE-821 und MK-8776. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 24 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 und/oder 500 nM MK-8776 vorbehandelt. Hemmung von ATR und CHK1 durch die Inhibitoren wurde mittels Western Blot von p-CHK1 (S317) und p-CHK1 (S296) überprüft. HSP90 diente als Ladekontrolle.

Um die Wirksamkeit von dem ATRi VE-821 und dem CHK1i MK-8776 zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen auf p-CHK1 durchgeführt. Die Phosphorylierung von CHK1 an S317 nimmt mit VE-821 ab, was der Literatur zur Phosphorylierung dieser Stelle durch ATR entspricht [153]. Die Autophosphorylierung von CHK1 an S296 [348] wird durch MS-275/Hydroxyurea und VE-821 kaum beeinflusst und nimmt mit MK-8776, wie erwartet, ab (**Abb. 3.21**). MK-8776 steigert demgegenüber die Menge an p-S317-CHK1 (von 1 auf 2,7). Dies könnte auf eine Rückkopplung (*feedback*) zwischen CHK1 Hemmung und ATR/ATM-Aktivierung hindeuten [348-351]. Die Hemmung von ATR durch einen weiteren eher unspezifischen Inhibitor (ETP-46464) bestätigt die mit VE-821 gewonnenen Ergebnisse. Die Zelltodinduktion wird in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen durch ETP-46464 reduziert (**Abb. 6.12A**). Entsprechend nimmt auch die Spaltung von PARP1 sowie die Expression von NOXA in diesen Zellen ab (**Abb. 6.12B**).

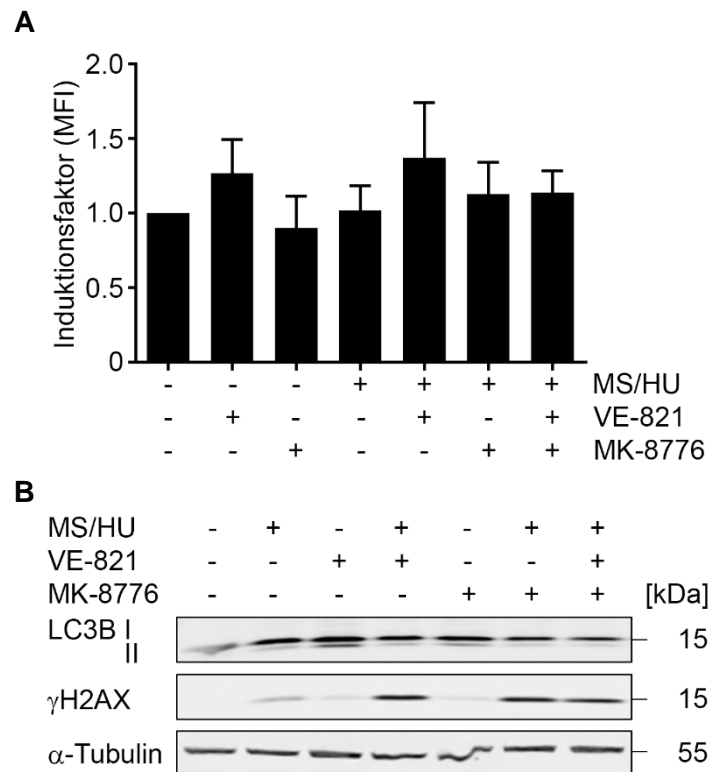


Abb. 3.22: Hemmung von ATR und CHK1 beeinflussen die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 24-48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 und/oder 500 nM MK-8776 vorbehandelt. **(A)** Cyto-ID[®]-gefärbte Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen (48 h); $n=3-5 \pm$ SD. **(B)** Expression von LC3B und γ H2AX wurde nach 24 h mittels Western Blot detektiert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die zusätzliche Hemmung von ATR und/oder CHK1 weist in Bezug auf die Autophagie keine signifikanten Unterschiede auf (**Abb. 3.22A**). Die Expression von LC3B I/II wird in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen nach Zugabe von VE-821 und/oder MK-8776 nicht induziert, wobei die Menge an γ H2AX verstärkt wird (**Abb. 3.22B**). Auch in den CML Zelllinien MEG-01, LAMA-84, KCL-22 und KYO-01 kann keine verstärkte Expression von LC3B I/II in MS-275/Hydroxyurea/VE-821 behandelten Zellen im Vergleich zur Kombinationsbehandlung detektiert werden (**Abb. 6.11**).

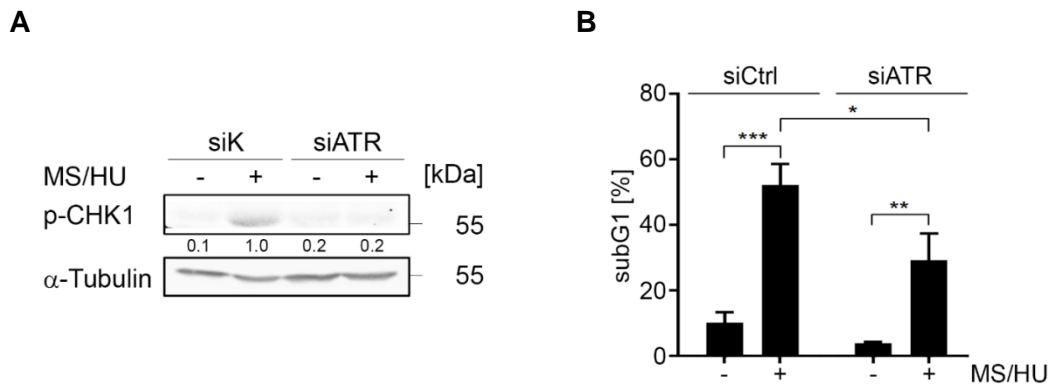


Abb. 3.23: Knock-down von ATR reduziert in K562 Zellen die Induktion von Apoptose durch MS-275 und Hydroxyurea. Knock-down von ATR erfolgte mittels RNAi. Nach 24 h Transfektion, wurden die Zellen für 24-48 h mit 5 μ M MS und 1 mM HU behandelt. **(A)** Knock-down wurde nach 24 h mittels Western Blot von p-CHK1 (S317) überprüft. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse von PI-gefärbten Zellen (48 h). $n=3\pm$ SD; Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Aufgrund der vorherigen Daten wurde ATR in K562 Zellen zusätzlich mittels RNAi genetisch eliminiert. Eine funktionale Analyse des ATR Knock-downs zeigte eine 5-fache Reduktion der Expression von p-CHK1 (S317) in behandelten Zellen nach 24 h (**Abb. 3.23A**). Die Behandlung mit MS-275/Hydroxyurea führt nach 48 h zu einer signifikanten Abnahme der subG1-Fraktion von 51,2% auf 29,2% in den ATR Knock-down Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (**Abb. 3.23B**).

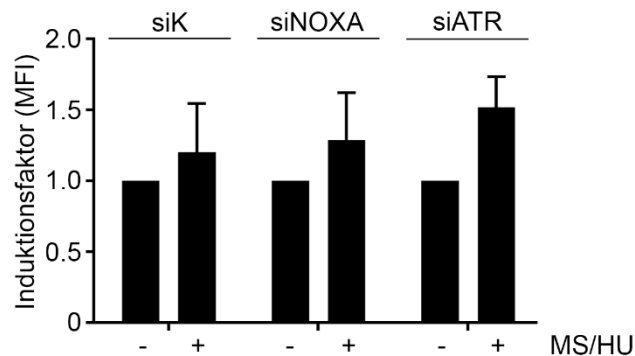


Abb. 3.24: Knock-down von NOXA und ATR beeinflussen die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen. Knock-down von NOXA bzw. ATR in K562 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 24 h behandelt. Cyto-ID[®]-gefärbte Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen; $n=3-6\pm$ SD.

In **Abb. 3.24** ist eine Cyto-ID[®]-Messung dargestellt, die zeigt, dass die Behandlung der NOXA bzw. ATR Knock-down Zellen mit MS-275 und Hydroxyurea nach 24 h zu keiner signifikanten Veränderung in der Anzahl an Autophagosomen im Vergleich zu den behandelten Kontrollzellen führt. Dieses Resultat stützt das Cyto-ID[®]-Experiment mit MS-275/ Hydroxyurea und VE-821 oder MK-8776 (**Abb. 3.22**).

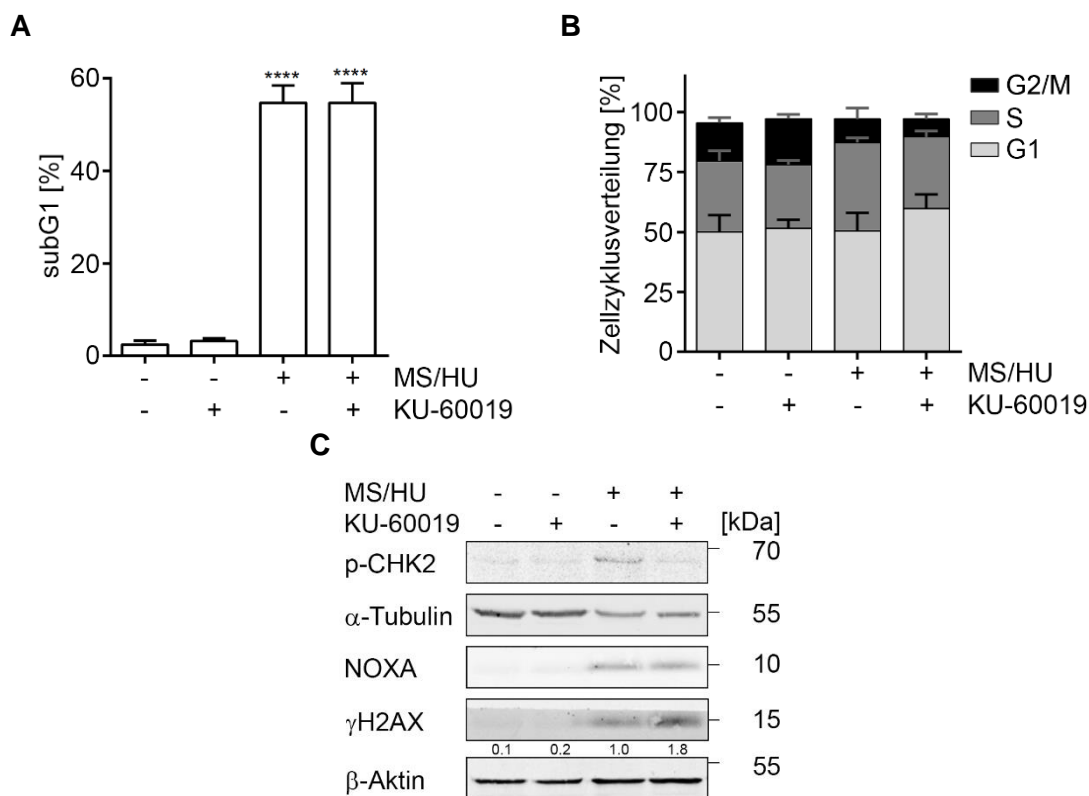


Abb. 3.25: Hemmung von ATM in K562 Zellen hat keinen Einfluss auf die Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M KU-60019 vorbehandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Messung der subG1-Fractionen und **(B)** der Zellzyklusphasen nach PI-Färbung der Zellen; $n=3\pm$ SD; *One-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*; **** $p<0.0001$. **(C)** Expression von p-CHK2 (T68), NOXA und γ H2AX wurde mittels Western Blot bestimmt. α -Tubulin und β -Aktin dienten als Ladekontrollen.

Eine pharmakologische Inaktivierung von ATM durch KU-60019 hingegen, welche durch die Abnahme der Phosphorylierung des ATM Zielproteins CHK2 (T68) [143] nachgewiesen wurde, weist in MS-275/Hydroxyurea behandelten Zellen keine Unterschiede bezüglich subG1-Fraktion, Zellzyklusverteilung sowie NOXA Expression im Vergleich zur Kombinationsbehandlung auf. Die Expression von γ H2AX hingegen nimmt zu, was vermutlich auf einen Defekt in der DDR zurückzuführen ist (**Abb. 3.25A-C**).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass der Signalweg von ATR und CHK1 pro-apoptotisch als Induktionsfaktor von NOXA in MS-275/Hydroxyurea behandelten Zellen wirkt und dass ATM in diesem Kontext nicht an der Induktion von Apoptose beteiligt ist.

3.8 ATR Inhibition verstärkt in CML Zellen die Induktion von DNA-Schäden durch replikativen Stress und die Hemmung von Klasse I HDACs

ATR wurde als pro-apoptotischer Faktor in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen identifiziert. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob eine Inaktivierung von ATR die Induktion von DNA-Schäden in diesen Zellen verhindert oder fördert. Wie im vorherigen Abschnitt wurden K562 Zellen mit 5 μ M MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24 h

behandelt. Die Bestimmung der DNA-Schädigung erfolgte mittels Western Blot und *Comet* Assay.

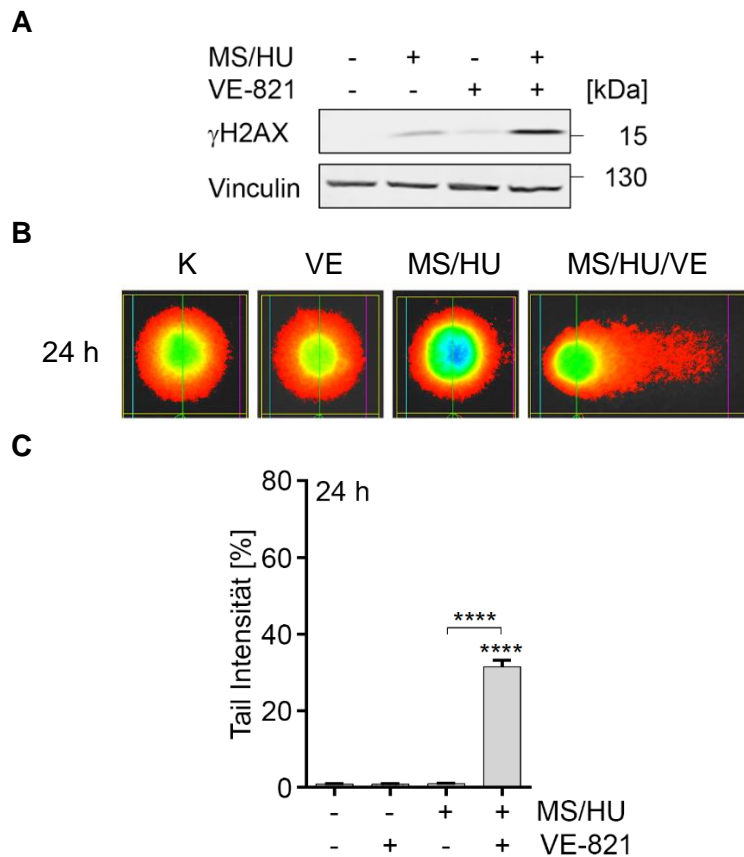


Abb. 3.26: Hemmung von ATR fördert in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen die Induktion von DNA-Strangbrüchen. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 vorbehandelt. **(A)** Expression von γ H2AX wurde mittels Western Blot bestimmt. Vinculin diente als Ladekontrolle. **(B)** Dargestellt sind repräsentative Mikroskopiebilder und **(C)** die Quantifizierungen des alkalischen Comet Assays; $n=3\pm$ SD; *Two-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*, **** $p<0.0001$.

Die Western Blot-Analyse in **Abb. 3.26A** zeigt, dass γ H2AX nach Zugabe von VE-821 in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen verstärkt exprimiert wird. Dasselbe trifft auf die CML Zelllinien MEG-01, LAMA-84, KCL-22 und KYO-01 zu (**Abb. 6.13**). Der alkalische *Comet Assay* bestätigt ebenfalls die Beobachtung, dass die Hemmung von ATR die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch MS-275/Hydroxyurea in K562 Zellen weiter fördert (**Abb. 3.26B-C**).

Zusammengefasst betrachtet, zeigen die Ergebnisse eine deutliche Zunahme an DNA-Schäden durch die Inaktivierung von ATR in MS-275 und Hydroxyurea behandelten K562 Zellen. Dies entspricht der Literatur zu soliden Tumorzellen, in denen Hydroxyurea und ETP-46464 gegeben wurden [128].

3.9 Replikationsstress und die Hemmung von Klasse I HDACs induzieren in CML Zellen Apoptose über die c-ABL-p73-NOXA Achse

Die Entdeckung, dass NOXA als pro-apoptotisches Protein zur Induktion von Apoptose in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen führt, lässt die Frage aufkommen, welche Faktoren in diesem Zellsystem als *upstream* Regulatoren von NOXA fungieren. Deshalb wurden im Folgenden potentielle Faktoren mittels Western Blot und qRT-PCR detektiert. Dazu wurden K562 Zellen mit 5 μ M MS-275 und/oder 1 mM Hydroxyurea für 24 h behandelt. Anschließend wurden aussichtsreiche Faktoren durchflusszytometrisch nach *Knock-down* oder Überexpression in K562 Zellen auf ihre Wichtigkeit hin untersucht.

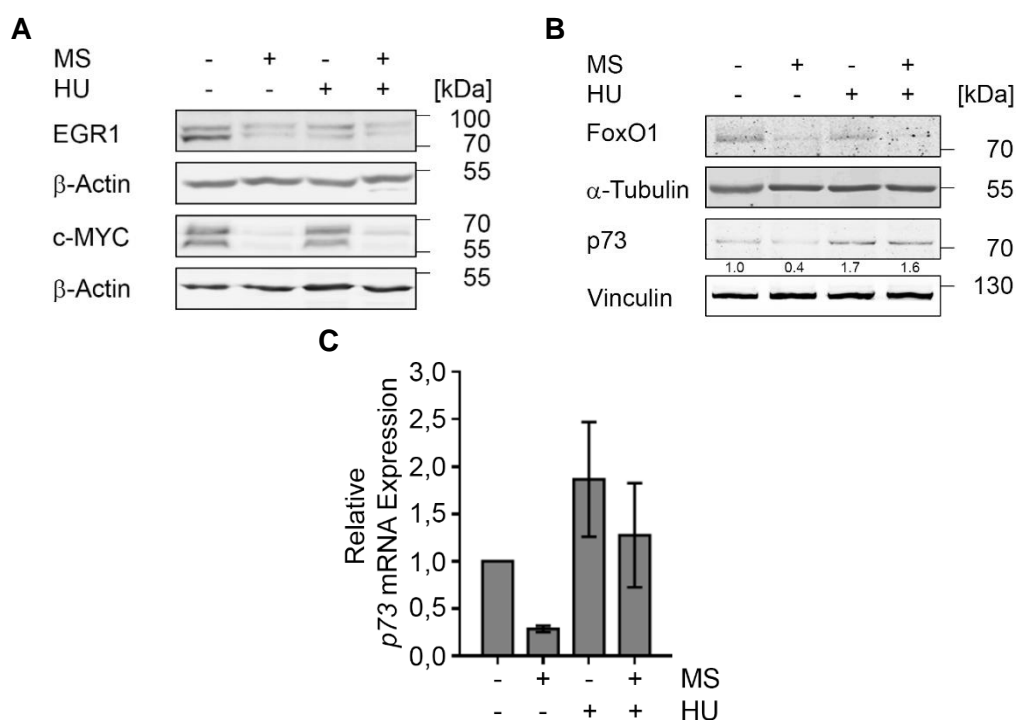


Abb. 3.27: Potentielle *upstream* Regulatoren von NOXA. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. **(A)** Expression von EGR1, c-MYC, **(B)** FoxO1 und p73 wurde mittels Western Blot bestimmt. β -Aktin, α -Tubulin und Vinculin dienen als Ladekontrollen. **(C)** Bestimmung der p73 mRNA Expression erfolgte in Triplikaten mittels qRT-PCR. Daten wurden auf die Expression der Referenzgene GAPDH und ACTB normalisiert (K=1). SD entspricht der intra-experimentellen Variation. Das Experiment wurde von durchgeführt.

Die Selektion der untersuchten Proteine erfolgte zunächst auf der Basis der bestehenden Datenlage. So hat z. B unser Kooperationspartner gemeinsam mit seinem Team herausgefunden, dass das Onkogen c-MYC nach Interaktion mit dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR1, an die Promotoren von *NOXA* und *BIM* bindet, um deren Transkription zu induzieren und letztendlich p53-unabhängig Zelltod nach Bortezomib (proteasomaler Inhibitor) Behandlung in Tumorzellen auszulösen [312]. In **Abb. 3.27A** zeigen Western Blots von Lysaten aus K562 Zellen eine deutliche Abnahme der Expression von EGR1 und c-MYC nach Behandlung mit MS-275 sowie mit

MS-275/Hydroxyurea. Desweiteren gibt es Studien, dass der Transkriptionsfaktor FoxO1 Apoptose in α -TOS (α -tocopheryl-succinate) behandelten Jurkat und NSCLC Zellen über NOXA induziert [352]. α -TOS ist ein Vitamin E Analogon, das effektiv die Proliferation von Krebszellen hemmt und diese in die Apoptose treibt [353]. FoxO1 wird in K562 Zellen nach MS-275 und MS-275/Hydroxyurea Behandlung jedoch nicht induziert (**Abb. 3.27B**). FoxO1, c-MYC und EGR1 werden alle durch Hemmung von HDAC1-3 und replikativen Stress abgebaut. Weitere Publikationen deckten auf, dass NOXA durch p73, einem Homolog des Tumorsuppressors p53, induziert wird. In den Versuchen wurden transformierte Zellen mit dem DNA-schädigenden Agens Etoposid (Topoisomerase II-Inhibitor), mit UV-Strahlung [354] sowie mit dem Zytostatikum Cisplatin (verursacht ICL, *interstrand crosslinks*) behandelt [355]. Die Western Blot-Analyse in **Abb. 3.27B** zeigt, dass Hydroxyurea allein und in Kombination mit MS-275 die Expression von p73 in K562 Zellen induziert. Dabei wird ein p73 reduzierender Effekt von MS-275 aufgehoben. Diese Verringerung von p73 durch MS-275 könnte auf die reduzierte p73 mRNA Expression zurückzuführen sein (von 1 auf 0,25) (**Abb. 3.27C**) und entspricht der Hemmung der p53 mRNA Expression [356]. Nach Hydroxyurea sowie MS-275/Hydroxyurea Behandlung kann auf mRNA-Ebene im Gegensatz zum Proteinspiegel keine Steigerung von p73 im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (**Abb. 3.27C**). Dies könnte an einer erhöhten Proteinstabilität von p73 liegen.

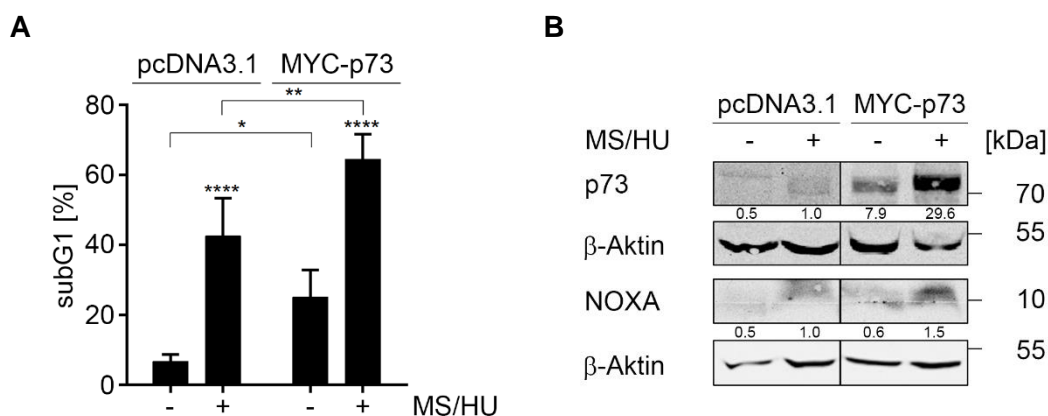


Abb. 3.28: Überexpression von p73 verstärkt in K562 Zellen die Apoptoseinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ g pcDNA3.1 oder MYC-p73 transfiziert und nach 24 h mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt. (A) Durchflusszytometrische Messung der subG1-Fractionen von PI-gefärbten Zellen; n=4 \pm SD; Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001. (B) Expression von p73 und NOXA wurde mittels Western Blot bestimmt; nd, nicht detektierbar (zu stark belichtet). β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Experimente in A und B wurden teilweise von [Name] und teilweise von mir durchgeführt.

Deshalb wurde weiter untersucht, ob eine Überexpression von p73 einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch MS-275/Hydroxyurea in K562 Zellen hat. Dazu wurden die Zellen mit dem Kontroll-Plasmid pcDNA3.1 sowie mit MYC-getagtem p73 Plasmid transfiziert und anschließend mit MS-275/Hydroxyurea behandelt. Die durchflusszytometrische Messung

der einzelnen subG1-Fractionen in **Abb. 3.28A** zeigt eine signifikante Zunahme der MS-275/Hydroxyurea induzierten Apoptoserate in p73 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen von 42,5% auf 64,4%. Bereits in den unbehandelten MYC-p73 Kontrollzellen lässt sich ein Anstieg der subG1-Fraktion von 6,7% auf 25% beobachten. Die Überexpression von p73 wurde mittels Western Blot überprüft (**Abb. 3.28B**). In den mit MS-275 und Hydroxyurea behandelten Kontrollzellen wird die Expression von p73 und NOXA induziert. Im Vergleich dazu, nimmt die Expression von p73 und die damit einhergehende Expression von NOXA in den behandelten p73 überexprimierten Zellen deutlich zu (von 1 auf 1,5) (**Abb. 3.28B**).

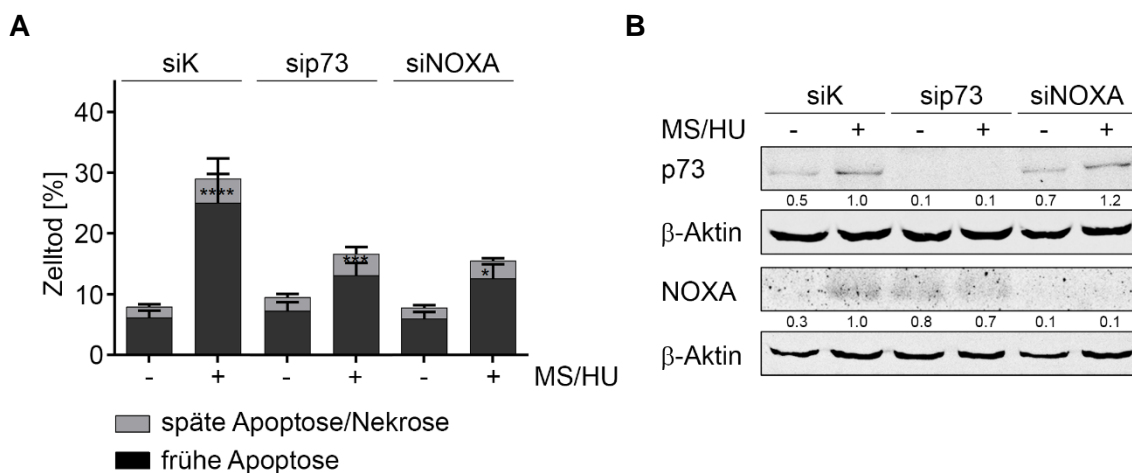


Abb. 3.29: Knock-down von p73 reduziert in K562 Zellen die Induktion von Apoptose durch MS-275 und Hydroxyurea. Knock-down von p73 und NOXA in K562 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Nach 24 h Transfektion wurden die Zellen mit 5 µM MS und 1 mM HU für 24 h behandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Zelltodanalyse von AnnexinV/PI-gefärbten Zellen; n=8±SD (siK/sip73); n=5±SD (siNOXA); frühe Apoptose - siK vs. sip73/siNOXA (MS/HU): ****. Two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test; *p<0.05; ***p<0.001, ****p<0.0001; **(B)** Knock-downs wurden mittels Western Blot überprüft. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Experimente in (A) wurden von und von mir und die in (B) nur von durchgeführt.

Zur Bestätigung der erzielten Daten, wurde eine genetische Elimination von p73 durchgeführt. Wie erwartet, führt der Knock-down von p73 in K562 Zellen zur Reduktion des durch MS-275/Hydroxyurea induzierten Zelltods (**Abb. 3.29A**). Zur Kontrolle wurden erneut Zellen mit transfizierter siNOXA analysiert. Sowohl in Zellen mit RNAi gegen p73 als auch in Zellen mit RNAi gegen NOXA kann nach Behandlung eine signifikante Abnahme der Apoptose von 32,9% auf 13% bzw. 12,5% und eine Reduktion der Nekrose von 3,9% auf 3,5% bzw. 2,9% im Vergleich zu den behandelten Kontrollzellen beobachtet werden (**Abb. 3.29A**). Der Knock-down von p73 und NOXA wurde mittels Western Blot verifiziert (jeweils K-MS/HU: von 1 auf 0,1). Auch die Induktion von NOXA in den MS-275/Hydroxyurea behandelten sip73 Zellen nimmt im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht ab (1 auf 0,7) (**Abb. 3.29B**).

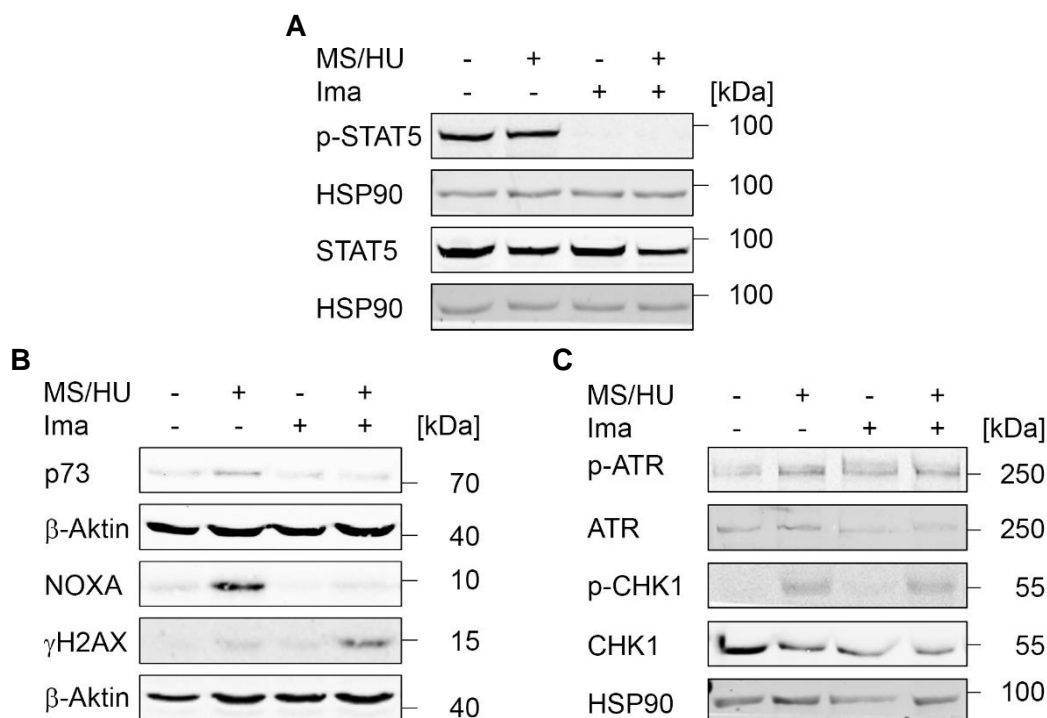


Abb. 3.30: Hemmung von c-ABL durch Imatinib reduziert die Expression von p73 und NOXA in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS, 1 mM HU und/oder 1 μ M Imatinib (Ima) für 24 h behandelt. **(A)** Expression von p-STAT5 (Y694), STAT5, **(B)** p73, NOXA, γ H2AX, **(C)** p-ATR (T1989), ATR, p-CHK1 (S317) und CHK1 wurde mittels Western Blot bestimmt. HSP90 und β -Aktin dienten als Ladekontrollen. Die Experimente wurden von [Name] durchgeführt.

K562 Zellen haben eine konstitutiv aktive BCR/ABL Tyrosinkinase und c-ABL ist in der apoptotischen Signalkaskade p73 und NOXA vorgeschaltet [187]. Deshalb wurden mit MS-275 und Hydroxyurea behandelte K562 Zellen zusätzlich mit dem gegen c-ABL und BCR/ABL wirksamen TKi Imatinib behandelt. Die Hemmung von c-ABL wurde durch Western Blot-Analyse von p-STAT5 verifiziert. Dieses stellt ein Zielgen von BCR/ABL dar. Die Phosphorylierung von STAT5 an Y694 wird nach Imatinib Einzelbehandlung sowie nach MS-275/Hydroxyurea/Imatinib Kombinationsbehandlung vollständig reduziert (**Abb. 3.30A**). Die Expression von p73 und NOXA nach MS-275/Hydroxyurea Behandlung wird durch Zugabe von Imatinib unterdrückt, γ H2AX hingegen wird stärker exprimiert (**Abb. 3.30B**). Die durch MS-275/Hydroxyurea induzierte Phosphorylierung von ATR (T1989) und CHK1 (S317) bleibt nach Imatinib Behandlung erhalten (**Abb. 3.30C**). Dies spricht für eine Kaskade von der ABL Aktivität zu p73, aber für keine Rückkopplung zu *Checkpoint*-Kinasen. Die Einordnung dieser Befunde in die Literatur erfolgt in der Diskussion.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der *upstream* Regulatoren von NOXA, dass in CML Zellen die Induktion der NOXA Expression und somit die Einleitung der Apoptose nach Hemmung von Klasse I HDACs mit MS-275 und replikativen Stress über den Transkriptionsfaktor p73 und die ABL Kinaseaktivität erfolgt.

4 Diskussion

Die CML ist eine Unterkategorie der Bluterkrankungen. Im Vergleich zu anderen Leukämieformen tritt sie sehr selten auf. So sind 2019 insgesamt etwa 21500 AML, 21000 CLL und nur knapp 9000 CML und 6000 ALL Neuerkrankungen in den USA aufgetreten [357]. Die Progression der CML lässt sich auf die konstitutiv aktive Tyrosinkinase BCR/ABL zurückführen [358, 359]. Deshalb stellt das BCR/ABL Fusionsprotein ein vielversprechendes Zielgen der Krebstherapie dar. Derzeit besteht für CML Patienten die Therapieoption aus verschiedenen TKi. Diese zielgerichtete Therapie zeigte bisher viele Erfolge, jedoch entwickelten viele Patienten auch Resistenzen dagegen, die oft auf Mutationen innerhalb der Kinase zurückzuführen waren. Außerdem ist es zumindest mit den derzeit verfügbaren TKi nicht möglich, CML Stammzellen vollständig zu eliminieren [360]. Eine mögliche Eliminierung von solchen Zellen mit Inhibitoren von c-MYC und Aktivatoren von p53 muss noch erprobt werden und ist bei p53-negativen Zellen unwirksam [361]. Daher sollten weitere Strategien zur Behandlung der CML identifiziert werden.

Die Erkenntnis, dass neben Genmutationen auch epigenetische Veränderungen zum Entstehen und Fortschreiten von Krebserkrankungen beitragen, führte zur Entwicklung von pharmakologischen Inhibitoren gegen HDACs. Diese Enzyme sind in Krebszellen oftmals fehlreguliert, weshalb sie aussichtsreiche Zielgene für die Krebstherapie darstellen. Als neuartige Therapieoptionen sind HDACi in der Lage das Wachstum und das Überleben von Krebszellen zu reduzieren. Dies spricht dafür, dass entartete Zellen von dem gestörten Gleichgewicht zwischen HATs und HDACs abhängig sind. Deshalb werden HDACi gegenwärtig als vielversprechende Krebsmedikamente zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen sowie soliden Tumoren eingesetzt. Einige dieser epigenetischen Medikamente (SAHA, FK-228, Belinostat, LBH589) wurden von der FDA bereits zur Therapie von CTCL, PTCL und Multiplem Myelom zugelassen [66, 68, 80-83]. Zahlreiche andere HDACi werden noch klinisch erprobt und entwickelt. HDACi können entartete Zellen gezielt abtöten, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. Diese Therapieoption würde somit eine Erhaltung der Lebensqualität der Krebspatienten ermöglichen. Zudem sind HDACs für das Ansprechen von Krebszellen auf Chemotherapie von essentieller Bedeutung, denn in Kombination mit konventioneller Chemotherapie erweisen sich HDACi als sehr effizient. In dieser Arbeit wurde Hydroxyurea zur gezielten Induktion von replikativen Stress verwendet. Hydroxyurea wird derzeit in der Klinik für die Behandlung von Sichelzellanämie, chronischen Myeloproliferativen Erkrankungen sowie Glioblastomen eingesetzt [362-365]. BCR/ABL-positive CML Zelllinien wurden mit dem Klasse I HDACi MS-275 und Hydroxyurea behandelt und hinsichtlich der zellulären

Stressantwort untersucht. Dabei wurden molekulare Mechanismen bezüglich der Apoptose, Autophagie und der DDR aufgedeckt.

4.1 Möglicher Mechanismus für den durch HDACi bewirkten G1 Arrest

Die Behandlung mit MS-275 löst in K562 Zellen einen G1 Arrest aus (**Abb. 3.3**). Dieser Effekt von MS-275 wurde u.a. auch in Versuchen mit Ovarial- und Darmkarzinomzellen beobachtet [132, 366]. Auch zahlreiche andere HDACi induzieren einen Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase; siehe z.B. [367-372]. Oft wird dies mit der p53-unabhängigen Induktion von p21^{WAF1/CIP1} assoziiert. p21 hemmt über eine Inaktivierung von CDKs die Hyperphosphorylierung von pRb [373, 374]. Dieses gehört zu den Tumorsuppressoren, die die Progression von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindern und auf diese Weise die Proliferation hemmen. Dabei bindet und unterdrückt pRb hauptsächlich Zielgene von E2F [375-377]. Beispiele für E2F Zielgene, deren Expression durch pRb reprimiert werden, sind Cyclin E und Cyclin A. Beide Cycline können an CDK2 binden und die G1/S Transition fördern. Diese Komplexe phosphorylieren pRb, wodurch es inaktiviert und abgebaut wird [374]. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) hat als eine Untereinheit der DNA-Polymerase eine Schlüsselfunktion in der DNA-Replikationsmaschinerie. Auch dieses Protein kann von p21 gebunden und gehemmt werden [378]. Die Analyse von p21 mit MS-275 behandelten K562 Zellen ergab, dass p21 sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene signifikant induziert wird (**Abb. 3.9, 3.10**). Die Hemmung von Klasse I HDACs durch MS-275 induziert in CML Zellen p21 und führt auf diese Weise wahrscheinlich einen G1 Arrest hervor. Auch ist bekannt, dass HDAC1, HDAC2 und HDAC3 die Expression von p21 unterdrücken [379-384]. Diese HDACs werden zu der Promotorregion von p21 rekrutiert. Dort deacetylieren sie Histone und hemmen die Transkription von p21 [379-384].

4.2 Mechanismus zur Aktivierung der DDR und Induktion von DSBs durch Replikationsstress und HDACi

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass K562 Zellen nach Hydroxyurea Behandlung in der S-Phase arretieren (**Abb. 3.3**). Replikativer Stress, der durch den RNRi Hydroxyurea induziert wird, aktiviert in den K562 Zellen die DNA-Schadensantwort. Die *Checkpoint*-Kinasen ATM, ATR, CHK2 und CHK1 werden phosphoryliert (**Abb. 3.14**). Diese Effekte waren zu erwarten, weil in proliferierenden Zellen Hydroxyurea eine Abnahme des dNTP Pools bewirkt, wodurch das Fortschreiten der DNA-Polymerase an Replikationsgabeln verlangsamt und ein S-Phase Arrest eingeleitet wird. Gleichzeitig entstehen durch fortwährend aktive DNA-Helikasen ssDNA Bereiche, die RPA binden und ATR aktivieren [128]. Verlangsamte oder blockierte Replikationsgabeln aktivieren einen Replikations-

Checkpoint, der für die Erhaltung der Genomstabilität unter replikativen Stress essentiell ist [385, 386]. Dieser Intra-S-Phase *Checkpoint* stimuliert die RNR-Aktivität, verzögert die Mitose, unterdrückt die Aktivierung von späten DNA-Replikationsursprüngen und schützt die blockierten Replikationsgabeln vor einem Kollaps, sodass die DNA-Synthese nach Abklingen der Wirkungen von Hydroxyurea wieder fortgesetzt werden kann [387-389]. Ohne diesen *Checkpoint* sind die Replikationsgabeln von Hydroxyurea behandelten Zellen labil und kollabieren, was zur Entstehung von DSBs und zu oxidativen Stress führt [390, 391]. Der so erzeugte DNA-Schaden wird als direkte Ursache für die Induktion von Zelltod gesehen. Behandelte Zellen mit defektem *Checkpoint* können über die mitotische Katastrophe absterben [344, 392, 393]. Deshalb sind Zellen mit mutiertem *Checkpoint* sehr sensitiv und Zellen mit intakter DDR relativ resistent gegenüber Hydroxyurea. Der S-Phase Arrest ist in Wildtyp Zellen oft reversibel [387, 394]. Da K562 Zellen nach replikativem Stress eine effiziente DDR aufweisen, sind sie resistent gegenüber Hydroxyurea in der verwendeten Dosis und Inkubationsdauer (**Abb. 3.1, 3.2, 3.14**). Hydroxyurea induziert in K562 Zellen ESBs (nach 48 h). Dies konnte mithilfe des alkalischen *Comets* detektiert werden (**Abb. 3.17**). Es ist bekannt, dass CHK1 und CHK2 DNA-Reparaturproteine aktivieren können. Die Aktivierung des DNA-Reparatursystems stellt einen wichtigen Endpunkt der DDR dar. Wahrscheinlich werden in K562 Zellen nach Hydroxyurea Behandlung auch bestimmte Reparaturproteine zu den blockierten Replikationsgabeln rekrutiert, sodass eine effiziente Reparatur stattfindet. Einige Proteine der homologen Rekombination wurden von _____ mittels Western Blot analysiert (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Dabei konnte eine Induktion der Expression von RAD51, BRCA1 und FANCD2 nach Hydroxyurea Behandlung beobachtet werden. Neben der Rolle in der DSB-Reparatur, sind die HR-Proteine auch für die Stabilisierung und den Neustart von blockierten Replikationsgabeln verantwortlich [391]. Somit passen die Resultate zu der vorhandenen Datenlage. In **Abb. 4.1** sind die Daten in einem Modell zusammengefasst.

ATM und ATR können neben spezifischen Zielgenen auch überlappende Zielgene haben. Die Prozessierung von DSBs und der Zusammenbruch der blockierten Replikationsgabeln können die Aktivierung der jeweils anderen Kinase auslösen. ATR ist die primär aktivierte *Checkpoint*-Kinase bei Replikationsstress [395]. ATM kann nach replikativem Stress direkt von ATR phosphoryliert werden [190, 191]. Die Hemmung von Klasse I HDACs durch MS-275 hebt die Stabilisierung der blockierten Replikationsgabeln, die durch Hydroxyurea induziert wurden, in K562 Zellen auf, sodass sie kollabieren und DSBs erzeugen. Die so erfolgte Aktivierung der DDR führt zur Phosphorylierung von H2AX an S139 (**Abb. 3.14, 3.15**) [116, 117, 139]. MS-275 verstärkt die von Hydroxyurea induzierte Aktivierung von ATR, ATM, CHK1 und CHK2, sowie insbesondere die Mengen an ESBs

und DSBs in CML Zellen. Die Untersuchungen der DNA-Schädigung wurden mittels Western Blot, *Comet Assays* und Immunfluoreszenz durchgeführt (**Abb. 3.14-3.18, 6.7**).

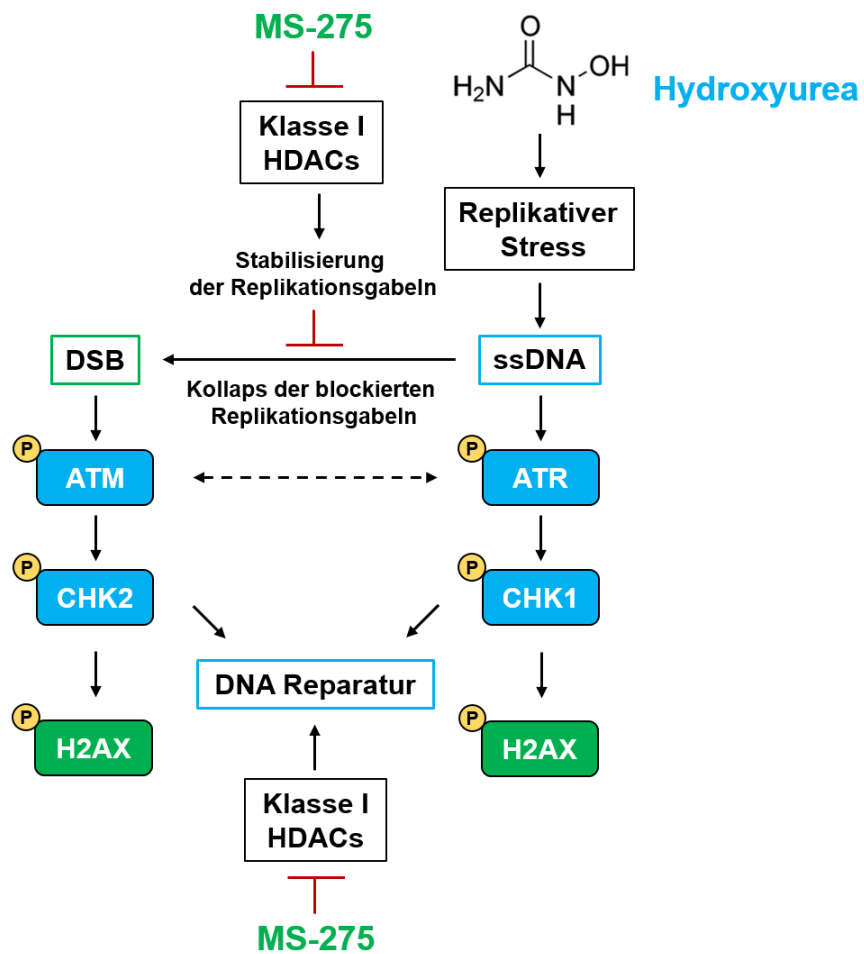


Abb. 4.1: Induktion von DSBs in Leukämiezellen durch MS-275 und Hydroxyurea. Replikativer Stress erzeugt ssDNA. Die Stränge von ssDNA und die blockierten Replikationsgabeln werden mithilfe von Klasse I HDACs stabilisiert. MS-275 hemmt diese HDACs, sodass die Replikationsgabeln kollabieren und DSBs entstehen. ATM und weitere DDR Proteine werden zum DSB rekrutiert. ATM phosphoryliert CHK2. Die ATR-CHK1 Achse wird durch ssDNA aktiviert. Die durch CHK2 und CHK1 induzierte DNA-Reparatur wird durch MS-275 unterdrückt, deshalb kommt es zur Phosphorylierung von H2AX durch CHK2 und CHK1.

Epigenetische Regulatoren, wie HATs und HDACs, spielen eine wichtige Rolle in der DDR und der DNA-Reparatur. Diese Enzyme sind oft in DNA-Schadensregionen vorzufinden [197]. Es ist bekannt, dass unter den HDACs insbesondere HDAC1 und HDAC2 eine zentrale Rolle in der DDR einnehmen. Beide HDACs werden sofort zum DSB rekrutiert, wo sie die Reparatur mittels NHEJ durch Deacetylierung von Histonen (H3K56 und H4K16) fördern. Eine Eliminierung von HDAC1 und HDAC2 führte zu einer defekten DSB-Reparatur, zu anhaltendem DNA-Schaden sowie zur Sensitivierung der Zellen gegenüber IR [199]. In K562 Zellen wird die Expression von HR-Reparaturproteinen (RAD51, BRCA1, FANCD2) in Hydroxyurea behandelten Zellen durch MS-275 unterdrückt (Daten von [199], in dieser Arbeit nicht gezeigt). Weitere Folgen sind eine Akkumulation von DNA-Läsionen und eine Induktion von Apoptose (**Abb. 3.1, 3.15-3.18**).

Andere Studien haben ebenfalls gezeigt, dass HDACi in soliden Tumorzellen und Leukämiezellen die Reparaturkapazität hemmen können. Dabei wurden eine reduzierte Expression und/oder veränderte posttranslationale Modifikationen von essentiellen Reparaturproteinen, wie KU70/80 (NHEJ) oder RAD50/RAD51 (HR) festgestellt [200-204]. Meine Arbeitsgruppe hat zusätzlich herausgefunden, dass HDAC1 und HDAC2 in p53-positiven Darmkrebszellen eine essentielle Rolle in der replikativen Stressantwort spielen. Beide HDACs inhibieren die Expression von PR130, einer regulatorischen Untereinheit der PP2A Phosphatase, die ATM, CHK2 und CHK1 dephosphoryliert. Die Zugabe von MS-275 führt in mit Hydroxyurea behandelten Darmkrebszellen aufgrund der Dephosphorylierung von *Checkpoint*-Kinasen zur Aufhebung des S-Phase *Checkpoints*, zur Zunahme an γ H2AX sowie zur Reduktion von RAD51. Dadurch wird die Induktion von Apoptose über die mitotische Katastrophe gefördert [132].

4.3 Signalkaskade zur Induktion von Apoptose durch Replikationsstress und HDACi

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Klasse I HDACi MS-275 in K562 Zellen nur minimal eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellzahl bewirkt. In Kombination mit dem RNRi Hydroxyurea jedoch, steigt die Anzahl an nekrotischen und apoptotischen Zellen signifikant an (**Abb. 3.1**). Einhergehend damit konnte ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden (**Abb. 3.11**). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die in **Abb. 3.7** gezeigte Aktivierung der Caspase 3 auf mitochondriale Prozesse zurück geht. Damit wird ein von Mitochondrien unabhängiger Weg der Apoptoseinduktion durch Hydroxyurea und MS-275 über Caspase 2 unwahrscheinlich [349, 350]. Als kritischen Faktor für die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs wurde das BH3-*only* Protein NOXA ermittelt. Dabei wird NOXA nach der Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich induziert (**Abb. 3.9, 3.10**). Eine genetische Elimination von NOXA führt zu einer signifikanten Reduktion des MS-275/Hydroxyurea induzierten Zelltods (**Abb. 3.12**). Dies wurde durch Experimente in NOXA-negativen MEF Zellen zusätzlich bestätigt (**Abb. 3.13**). Weitere Untersuchungen zeigten, dass in CML Zellen p73 sowie c-ABL als *upstream* Regulatoren von NOXA nach MS-275/Hydroxyurea Behandlung agieren (**Abb. 3.28, 3.29, 3.30**).

Die Fähigkeit von HDACi Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu sensitivieren, was bevorzugt über den intrinsischen Apoptoseweg erfolgt, konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [396]. So ist der Klasse I-spezifische HDACi VPA in der Lage in Kombination mit Hydroxyurea effizient Tumorzellen aus der Kopf-Hals-Region

(HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) abzutöten [93]. Als Mechanismus hierfür konnte eine Caspase-abhängige Induktion von Apoptose durch die gesteigerte Expression des mitochondrialen pro-apoptotischen Faktors BIM sowie ein Zusammenbrechen der onkogenen Signalleitung durch den mutierten epidermalen Wachstumsfaktor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) als zugrunde liegende Mechanismen bestimmt werden [93]. In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die kombinierte Gabe von VPA und Hydroxyurea in Melanomzellen ebenfalls zur Caspase-abhängigen Induktion von Apoptose führt. Dabei spielte der Hydroxyurea-vermittelte Abbau von p21 und p27 eine wichtige Rolle. Beide CDKi interagieren mit Caspase 3 und konkurrieren so mit anderen Caspase 3 Substraten. Auf diese Weise können p21 und p27 Resistenzen gegenüber VPA und Hydroxyurea vermitteln [308]. In AML und CML Zelllinien konnte der CDKi Roscovitin die letale Wirkung des HDACi LAQ824 verstärken, indem die Expression von p21, MCL-1 und XIAP herunterreguliert wurde [397]. Damit scheint die Kombination aus HDACi und CDKi auch sehr vielversprechend in der Therapie gegen Leukämiezellen zu sein.

In dieser Arbeit wurde für die Induktion von Apoptose durch MS-275 und Hydroxyurea als Mechanismus die Aktivierung der c-ABL-p73-NOXA Achse aufgedeckt. Die Apoptosesensitivität wird dabei u.a. durch das relative Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie bestimmt. So wird das anti-apoptotische Protein MCL-1_s, ein essentieller Gegenspieler von NOXA, in Gegenwart von MS-275 und replikativen Stress signifikant reduziert (**Abb. 3.10**). Nach MS-275 Einzelbehandlung mit geringer Apoptoserate wird MCL-1 hingegen induziert (**Abb. 3.1, 3.10**). Dadurch wird möglicherweise die Toxizität von MS-275 ausgeglichen. So wurde in einer Studie bereits gezeigt, dass HDACi die Expression von MCL-1 auf mRNA- und Proteinebene steigern, wodurch die Effizienz von HDACi induzierter Apoptose limitiert wird. Dieser Zustand konnte durch Kombination mit anderen MCL-1 reduzierenden Agenzien aufgehoben werden [243]. In dieser Arbeit führt erst die Kombination mit Hydroxyurea zu einem Abbau von MCL-1, sowie zu einem signifikanten und synergistischen Anstieg der apoptotischen Zellpopulation (**Abb. 3.1, 3.10**). Eine weitere Studie legte offen, dass der NOXA-abhängige Abbau von MCL-1 die BIM-vermittelte Zelltodinduktion ermöglicht [398]. NOXA hat unter den BH3-*only* Proteinen das meiste Potential, MCL-1 zu neutralisieren und ist deshalb kritisch für die Induktion von Zelltod [263, 399, 400]. In vielen Krebsarten konnte eine Überexpression von MCL-1 beobachtet werden. Deshalb spielt das Verhältnis von NOXA zu MCL-1 bei der Apoptosesensitivität eine wichtige Rolle. NOXA bindet an MCL-1 und führt dieses dem Ubiquitin-System zu. MCL-1 wird durch die E3-Ligase MULE (*MCL-1 ubiquitin ligase E3*) polyubiquityliert und proteasomal abgebaut [401, 402]. Dadurch verringert sich die Kapazität der Zelle weitere BH3-*only* Proteine, wie BIM oder PUMA, durch MCL-1 zu

neutralisieren. So wird beim Überwiegen von pro-apoptotischen im Vergleich zu anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen die Apoptoseinduktion begünstigt, während umgekehrt eine relative Dominanz anti-apoptotischer BCL-2 Proteine die Apoptose hemmt [403].

In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass die Expression von anti-apoptotischen Faktoren, wie BCL-2 und BCL-XL, in K562 Zellen nach MS-275/Hydroxyurea signifikant reduziert wird (**Abb. 3.10**). In vielen Studien wurden belegt, dass die Expression von BCL-2 oder BCL-XL gegenüber Chemotherapeutika Resistenzen in soliden Tumoren und Bluterkrankungen vermitteln. Dies konnte auch von uns in der AML Zelllinie NB4 in einer anderen Publikation nachgewiesen werden [342]. Dabei wurde gezeigt, dass die Hydroxyurea-sensitiven NB4 Zellen nach Überexpression mit BCL-2 bzw. BCL-XL robuster waren [342]. Dementsprechend würde in BCL-2 überexprimierten Leukämien, wie CLL, eine Behandlung mit BCL-2-Inhibitoren zum Zelltod führen. So erwies sich ABT-199 (Venetoclax), ein Inhibitor gegen BCL-2 Proteine, in CLL-Patienten als sehr effizient mit minimalen Nebenwirkungen. Deshalb hat die FDA ABT-199 für die Therapie von refraktärer CLL mit 17p Deletion im Jahr 2016 zugelassen [404, 405].

Die Funktion und Stabilität von NOXA wird neben transkriptioneller Regulation auch durch posttranslationale Mechanismen kontrolliert. Der *Turnover* von NOXA wird durch Ubiquitylierung reguliert [406, 407]. Insbesondere die erhöhte Ubiquitylierung und der daraus resultierende verstärkte proteasomale Abbau von NOXA wurde als einer der Hauptmechanismen zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber genotoxischen Stress in einer Vielzahl von Tumorzellen aufgedeckt [407, 408]. Dabei wurde UCH-L1 (*ubiquitin C-terminal hydrolase L1*) als für NOXA spezifisches Deubiquitylierungsenzym identifiziert. UCH-L1 interagiert direkt mit NOXA und stabilisiert das Protein durch Entfernen der Polyubiquitinketten, welche NOXA für den proteasomalen Abbau markieren. Eine epigenetische Stilllegung von UCH-L1 verringerte die Proteinexpression von NOXA [407].

Das BH3-*only* Protein NOXA wurde initial als p53 Zielgen identifiziert, das nach genotoxischem Stress transkriptionell reguliert wurde [409]. Komplementäre Analysen haben gezeigt, dass NOXA in unterschiedlichen Tumor- und Leukämiezellen auch p53-unabhängig durch mit HIF-1 α , E2F1, p73, c-MYC, FOXO3 und PI3K/AKT assoziierten Signalkaskaden induziert werden kann [410-416]. Der NOXA Promotor enthält ein p53-Bindungsmotiv, welches für die Aktivität des Promotors und die Transkription des Gens von Bedeutung ist. Neben p53 kann auch p73, ein Mitglied der p53-Familie, an diese Konsensus-Stelle binden und die Transaktivierung hervorrufen [355]. Es gibt zahlreiche Studien, die die p53-unabhängige Induktion von NOXA nach genotoxischem Stress zeigen. So wird NOXA z.B. nach Cisplatin Behandlung durch ERK- oder p38-vermittelte Signalwege exprimiert [417, 418].

Die Untersuchung von *upstream* Regulatoren von NOXA ergab, dass in K562 Zellen p73 in der durch MS-275 und Hydroxyurea aktivierten Apoptosekaskade involviert ist. p73 wird in der Kombinationsbehandlung induziert und eine RNAi-vermittelte Reduktion von p73 hemmt die Zelltodinduktion (**Abb. 3.28, 3.29**). Dennoch sollte eine ChIP-Analyse durchgeführt werden, um die Bindung von p73 am NOXA Promotor zu bestätigen. In diesem Kontext sollte auch eine erwartete Hyperacetylierung der Histone an diesem Promotor durch MS-275 geprüft werden. Der Transkriptionsfaktor p73 ist in der Lage durch alternatives Splicing sowie durch Verwendung von alternativen Promotoren viele verschiedene Isoformen mit pro- und anti-apoptotischen Eigenschaften zu exprimieren. Die transkriptionell aktive (TA, *transcriptionally active*) und die N-Terminal-gekürzte dominant negative (Δ N) Isoform werden durch Verwendung von alternativen Promotoren erzeugt. Die p73 Isoformen mit der Transaktivierungsdomäne (TAp73) können Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren. Die p73 Isoformen ohne diese TA Domäne inhibieren die Tumorsuppressor-Aktivität von p53 und TAp73. Somit ist für die Stressantwort das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen p73 Isoformen von essentieller Bedeutung [419-422]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete p73 Antikörper erkennt laut Datenblatt das Total-Protein sowie alle p73 Isoformen. Um genauere Informationen über die in diesem Kontext relevanten Isoformen zu erhalten, sollte die Expression von TAp73 bzw. Δ Np73 in CML Zellen nach MS-275 und/oder Hydroxyurea Behandlung mittels Western Blot und weiteren Isoform-spezifischen Antikörpern überprüft werden.

Zur Tumorbekämpfung trägt TAp73 durch verschiedene Mechanismen, wie durch Hemmung des Zellzyklus, Erhaltung der Genomstabilität und Förderung der Apoptose bei. TAp73 vermittelt die Zytotoxizität von DNA-schädigenden Krebsmedikamenten. Die genannten zellulären Effekte werden durch Aktivierung von p53-abhängigen sowie p53-unabhängigen Signalwegen erreicht. Dabei arretiert TAp73 die Zellen in der G1- und G2/M-Phase durch die transkriptionelle Aktivierung der p53 Zielgene p21 und GADD45 [423]. TAp73 ist ebenfalls wichtig für die Reparatur von DSBs. In Mausversuchen wurde gezeigt, dass TAp73 für die Induktion der Expression von MRE11, RAD51 und BRCA2 notwendig ist [424]. Die Phosphorylierung und Akkumulation von p73 nach DNA-Schädigung wird im Gegensatz zu p53, das primär durch ATM und CHK2 aktiviert wird, in erster Linie über die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-ABL vermittelt [425-427], obwohl p73 auch ein Zielgen von CHK1 darstellt [428-430]. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Hemmung von c-ABL durch Imatinib zu einer reduzierten Expression von p73 und NOXA in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen führt (**Abb. 3.30**). Demnach erfolgt in diesem Kontext die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosekaskade über c-ABL und p73. Nach Cisplatin Behandlung interagiert p73 mit c-ABL über sein PxxP Motiv an der C-terminalen Homo-Oligomerisationsdomäne. Dabei wird p73 hauptsächlich

an Tyrosin 99 (Y99), aber auch an Y121 und Y240 phosphoryliert [431]. Die durch Cisplatin hervorgerufene Aktivierung von p73 durch c-ABL ist abhängig von einem intakten *Mismatch*-Reparaturmechanismus [425]. Bei Hydroxyurea sollte dies jedoch keine Rolle spielen, da es keine direkte DNA-Schädigung durch die Bildung von Addukten oder direkte DNA-Modifikationen auslöst.

Ein weiterer wichtige Aspekt ist, dass die Phosphorylierung von p73 durch c-ABL nach Doxorubicin Behandlung eine Voraussetzung für die Acetylierung von p73 (K321, K327, K331) durch die HAT p300 darstellt [432]. Dabei begünstigt die c-ABL-vermittelte Phosphorylierung von p73 die Interaktion mit PIN (*prolyl-isomerase*). PIN ändert die p73 Konformation und ermöglicht so die p300-vermittelte Acetylierung [433]. Die Acetylierung von TAp73 durch p300 bestimmt die selektive Aktivierung von pro-apoptotischen Genen. In der Arbeit von Costanzo et al. 2002 wurde gezeigt, dass eine nicht-acetylierbare p73-Mutante nicht mehr in der Lage ist, das apoptotische Gen p53AIP1 zu aktivieren, aber noch den Zellzyklus-Inhibitor p21 induzieren kann. Eine pharmakologische Hemmung von p300 führte dabei zu einer Reduktion der Doxorubicin-induzierten Apoptose in p53-negativen Fibroblasten. Dies lässt darauf schließen, dass die Acetylierung nach DNA-Schädigung die pro-apoptotische Funktion von p73 begünstigt [432]. Deshalb liegt es nahe, dass auch in K562 Zellen eine erhöhte intrazelluläre Acetylierung durch MS-275 der Apoptoseinduktion nach Replikationsstress zugrunde liegt. Doch diese Vermutung müsste durch weitere Untersuchungen mittels p73 Immunpräzipitationen und Western Blots von p-p73 (Y99) und ac-p73 (K321/K327) verifiziert werden.

Neben c-ABL kann p73 auch durch alternative Mechanismen über p38 [434] oder PKC δ [435] phosphoryliert werden. Dabei ist die Threonin-Phosphorylierung von p73 durch p38 abhängig von der vorherigen Aktivierung des JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)/p38 MAPK Signalwegs durch c-ABL [436]. Eine Aktivierung von p38 durch Hydroxyurea wurde in K562 Zellen bereits beobachtet [437]. PKC δ wird durch Caspase 3-abhängige Spaltung konstitutiv aktiviert. Das entstandene Fragment interagiert anschließend mit p73 und phosphoryliert dieses an S289 [438]. Interessanterweise wird PKC δ selbst auch durch c-ABL stressbedingt aktiviert [435]. Beim Fehlen von genotoxischem Stress wird TAp73 an T68 phosphoryliert. Dafür sind die Komplexe Cyclin A-CDK1/2, Cyclin B-CDK1/2 und Cyclin E-CDK2 während des Zellzyklus, insbesondere in der S- und G2/M-Phase, verantwortlich. Hierdurch wird die transkriptionelle Aktivität von TAp73 gehemmt. Außerdem unterdrückt p-T68-p73 die Expression von p21 [439]. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass p73 auch nach Hydroxyurea Einzelbehandlung in K562 Zellen akkumuliert (**Abb. 3.27**). Zudem wurden diese Zellen in der S-Phase arretiert und auch der CDKi p21 wurde nicht induziert (**Abb. 3.10**). Somit passen diese Beobachtungen zu den Ergebnissen der Studie. Aber es

sollte noch untersucht werden, ob mit Hydroxyurea behandelte CML Zellen p73 an T68 phosphorylieren oder nicht. Dies könnte mittels Western Blot und einem geeigneten Antikörper getestet werden.

Da MS-275 p73 reduziert und Hydroxyurea dies aufhebt, ohne die p73 mRNA Mengen zu steigern (**Abb. 3.27C**), liegt eine Erhöhung der p73 Spiegel durch veränderte Proteinstabilität nahe. Die Proteinstabilität von p73 wird durch das Ubiquitin-Proteasom System reguliert [440, 441]. Als erstes p73 ubiquitinylierendes Enzym wurde die HECT-Typ E3 Ubiquitin Ligase ITCH identifiziert [442]. Der ITCH-vermittelte Abbau von p73 (TAp73 α/β und Δ Np73 α/β) wird einerseits über N4BP1 (*Nedd4-binding protein 1*), welches direkt mit ITCH interagiert, und andererseits über YAP (*Yes-associated protein*), welches kompetitiv an das PPXY Motiv von p73 bindet, reguliert [443, 444]. Der Abbau von Δ Np73 Isoformen wird selektiv über Zielgene von TAp73 vermittelt. So ist z.B. PIR (*p73-induced ring finger protein 2*) für die Ubiquitinylierung von Δ Np73 Isoformen verantwortlich [445, 446]. YAP gilt als essentieller Co-Aktivator der von TAp73 abhängigen Transkription pro-apoptotischer Gene in Gegenwart von Chemotherapeutika, weil es, wie bereits erwähnt, die Proteinstabilität von TAp73 erhöht [444]. Es kommt zur Komplexbildung von TAp73 und YAP sowie deren Phosphorylierung durch c-ABL. Der Komplex TAp73-YAP wird zu PML (*promyelocytic leukemia*) nuklearen Körperchen rekrutiert. Daraufhin wird YAP von PML sumoyliert und stabilisiert, sodass die TAp73-abhängige Transkription verstärkt wird [427, 447-450]. Eine Studie zeigte bereits, dass TAp73 den transkriptionellen Co-Repressor PML induzieren kann. PML bindet an den Promotor der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR und hemmt diesen, was schließlich zur Apoptoseinduktion in EGFR-abhängigen HNSCC Zellen führt [451]. Ob in CML Zellen YAP und PML nukleare Körperchen an der Induktion von Apoptose durch MS-275/Hydroxyurea beteiligt sind, sollte durch Immunpräzipitation, Western Blot und Immunfluoreszenz untersucht werden. Die Vermutung liegt zumindest nahe, dass beide Proteine in K562 Zellen durch MS-275/Hydroxyurea induziert werden und die Aktivierung der Transkription von NOXA durch p73 begünstigen.

Nach zellulärer Schädigung wird YAP1 von AKT, einer Serin/Threonin-Proteinkinase phosphoryliert, an 14-3-3 Proteine gebunden und ins Zytosol überführt, wodurch die TAp73-abhängige Expression von pro-apoptotischen Genen unterdrückt wird [452]. Dies ist eventuell auch der Fall, bei der Behandlung von K562 Zellen mit Hydroxyurea, wo keine Induktion von NOXA stattgefunden hat (**Abb. 3.10**). Die Expression und Phosphorylierung von AKT sollte daher in den CML Zellen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Alternativ könnte eine Hyperacetylierung des NOXA Gens durch HDACs die Expression von NOXA verhindern. Diese hypothetische *Gatekeeper* Funktion von HDACs wäre durch ChIP-Analysen nachzuweisen. Eine Hyperacetylierung dieses Promotors in mit MS-275

behandelten Zellen bei gleichzeitig verstärkter Bindung von p73 wären gute Evidenzen dafür, dass beide Bedingungen hinreichend erfüllt sein müssen, um NOXA bei Replikationsstress zu exprimieren. Eine mögliche Hyperacetylierung des NOXA Promotors könnte mit der bei Hydroxyurea Gabe reduzierten Histonacetylierung assoziiert sein [308].

4.4 Mögliche Ursachen für die Induktion von Zellzyklus relevanten Genen nach Replikationsstress und HDACi

Die Analyse von Zellzyklus-relevanten Genen mittels qPCR zeigte, dass in den p53-negativen K562 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea die Expression von *p21* (41-fach) und *GADD45B* (7-fach) auf mRNA-Ebene signifikant induziert wird (**Abb. 3.9**). Dabei wurde p21 auf Proteinebene etwas weniger als in MS-275 behandelten Zellen exprimiert (**Abb. 3.10**). Die Proteinexpression von GADD45B müsste noch mittels Western Blot überprüft werden. Die GADD45-Familienmitglieder GADD45A, GADD45B und GADD45C gelten als Stresssensoren, die nach Zytokinen und DNA-schädigenden Einwirkungen induziert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der angeborenen Immunität [453, 454]. Unter diesen Proteinen wurde nur GADD45A als Zielgen von p53 identifiziert [454-456]. GADD45B ist in der Regulation des Zellzyklus involviert [339]. GADD45B bindet und inhibiert den CDC2/CyclinB1 Komplex, was zu einem Arrest in der G2/M-Phase führt [457-460]. Alle drei GADD45 Proteine sind in der Lage mit dem universellen CDKi p21 [455, 461-463] und dem Kernprotein PCNA zu interagieren [464]. Es ist auch bekannt, dass p21 an CDKs und PCNA bindet und so die DNA-Replikation hemmt und einen G1-S Zellzyklusblock aktiviert, um der Zelle ausreichend Zeit zu geben die DNA-Läsion zu reparieren, bevor sie in die S-Phase übergeht. [378, 465]. Dabei kann p21 bzw. der G1-S *Checkpoint* entweder über p53 oder p53-unabhängig über ATR aktiviertes CHK1 induziert werden. CHK1 phosphoryliert CDC25A, welches anschließend ubiquitinyliert und abgebaut wird. Dadurch kann CDC25A den CDK2-Cyclin E Komplex nicht mehr über eine Dephosphorylierung aktivieren [466]. Des Weiteren wird Survivin in mit MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen exprimiert. Survivin ist ein Mitglied der IAP Familie, das in den meisten Krebsarten überexprimiert und mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert wird. Das Protein wird in normalem Gewebe nur minimal exprimiert, deshalb wird es oft sowohl als prognostischer Faktor als auch als Zielgen für Krebstherapien verwendet. Survivin wird vor allem in der G2/M-Phase stark exprimiert, in der G1-Phase des Zellzyklus nimmt die Expression rapide ab [467, 468]. Dies konnte in K562 Zellen nach MS-275 Einzelbehandlung beobachtet werden, unter der die Zellen in der G1-Phase arretiert wurden (**Abb. 3.10**). Entsprechend der Daten, sterben die CML Zellen höchstwahrscheinlich aus der G2/M-Phase heraus. Um diese Vermutung zu bestätigen,

sollten Western Blot-Analysen von G2/M-Markern, wie z.B. von Cyclin B1, durchgeführt werden. Wie bereits erwähnt, kann die Expression der beiden p53 Zielgene p21 und GADD45 auch durch TAp73 aktiviert werden [423]. In MS-275/Hydroxyurea behandelten Leukämiezellen könnte dies der Fall sein. Denn p73 akkumuliert nach der Kombinationsbehandlung in den untersuchten Zellsystemen stärker als in den Einzelbehandlungen (**Abb. 3.27**). Die Induktion von p21 in MS-275 behandelten K562 Zellen könnte, wie bei p53-negativen Darmkrebszellen beobachtet [469], nicht von p53 und eher von SP1 (*specificity protein 1*) abhängig sein [384]. Die mangelnde Translation erhöhter *p21* mRNA in p21 Proteinspiegel könnte auf eine Hyperaktivierung von CHK1 und eine dadurch verursachte Hemmung der *p21* mRNA Translation zurückzuführen sein [470, 471]. Dies könnte auch erklären, warum trotz deutlich erhöhter *p21* mRNA weniger p21 in MS-275/Hydroxyurea als in MS-275 behandelten K562 Zellen vorhanden ist (**Abb. 3.9, 3.10**). Dennoch akkumuliert unter diesen Bedingungen mehr p21, was die Verschiebungen des S-Phase Arrests durch Hydroxyurea in die G1- und G2/M-Phase bei kombinierter Applikation von Hydroxyurea und MS-275 erklären könnte.

4.5 Potentielle Mechanismen für die durch Replikationsstress induzierte Autophagie

Autophagie ist ein stressbedingter intrazellulärer Recyclingprozess, bei dem zytosolische Komponenten und insbesondere beschädigte oder nicht mehr benötigte Proteine und Organellen mithilfe von Lysosomen abgebaut werden. Die Hauptfunktion der Autophagie besteht in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Deshalb findet dieser Vorgang in allen Zelltypen auf basalem Niveau kontinuierlich statt [290]. Eine Fehregulation der Autophagie kann zur Entstehung von Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen führen [284, 472-474].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Einzelbehandlung mit Hydroxyurea Autophagie in CML Zellen induziert. Dies wurde mittels Western Blot, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz verifiziert. In mit Hydroxyurea behandelten CML Zellen wird LC3B I/II verstärkt exprimiert (**Abb. 3.5, 3.6, 6.4**). LC3B ist ein essentieller Bestandteil der Isolationsmembran. Da das Protein im Verlauf der Autophagie mehrfach modifiziert wird (siehe **Abb. 1.10**, LC3 Konjugationssystem), wird es oft als Marker für die Autophagie verwendet. Dabei gilt vor allem die Zunahme der Menge an LC3B II als Indiz für die Progression der Autophagie [287]. In der Cyto-ID[®]-Messung kann ebenfalls eine Akkumulation von Autophagosomen nach Hydroxyurea Behandlung detektiert werden (**Abb. 3.4**). Der Mechanismus, der der Hydroxyurea induzierten Autophagie in Leukämiezellen zugrunde liegt, ist bisher wenig erforscht. Um vollständig zu klären, wie

Hydroxyurea durch Replikationsstress den Autophagieprozess in Leukämiezellen in Gang setzt, sind viele weitere Untersuchungen notwendig. Es gibt bisher jedoch eine Studie, in der die Rolle der Autophagie in der Regulation des dNTP Pools untersucht wurde [310]. Dabei wurde gezeigt, dass in Huh-7 Leberkarzinomzellen durch die Behandlung mit Rapamycin neben der Induktion von Autophagie auch eine Reduktion der RNR Aktivität sowie des dNTP Pools zu beobachten war. Die Hemmung der RNR und die Depletion des dNTP Pools mit Hydroxyurea löste in diesen Zellen Autophagie aus. Ein *Knock-down* von RRM2, einer wichtigen Untereinheit der RNR, bestätigte die Induktion von Autophagie durch reduzierte RNR Aktivität bzw. verminderten Pool an dNTPs. Der *Knock-down* Versuch wurde nicht nur in Leberkarzinomzellen, sondern auch in HNSCC, Lungenkrebs- sowie in Mund- und Rachenkarzinomzellen durchgeführt. Umgekehrt, führte ein Überschuss an dNTPs dazu, dass die Krebszellen weniger ansprechbar auf die Autophagieinduktion durch Rapamycin waren. Bei all diesen Experimenten wurde die Induktion von Autophagie ausschließlich anhand der verstärkten Expression von LC3 II sowie der verringerten Expression von p62 bestimmt [310]. p62 wird während der Autophagie zur Rekrutierung verschiedener Proteine an die Autophagosomen benötigt. Das Protein wird in den späteren Phasen der Autophagie abgebaut [292]. Diese Daten legen nahe, dass auch in mit Hydroxyurea behandelten CML Zellen die Autophagie und die RNR Aktivität bzw. der dNTP Spiegel durch eine negative Rückkopplung reguliert werden.

Im Folgenden werden einige andere Mechanismen der Autophagieinduktion näher betrachtet. Es gibt zunehmend Anhaltspunkte, die auf eine mögliche Aktivierung der Autophagie durch die DDR hindeuten [475-477]. So induziert z.B. ATM nach oxidativem Stress Autophagie durch Aktivierung von AMPK. Dieses Protein fungiert als Energiesensor und reguliert den zellulären Metabolismus, um die Energiehomöostase aufrechtzuerhalten. AMPK phosphoryliert TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) und hebt den hemmenden Effekt von TORC1 (*target of rapamycin complex 1*) auf den ULK1 Komplex auf [478, 479]. AMPK kann aber auch direkt den ULK1 Komplex, der für die Initiation und Bildung der Isolationsmembran notwendig ist, durch Phosphorylierung aktivieren [480]. Ebenso wurde gezeigt, dass ATR/CHK1 nach DNA-Schädigung durch UV-Strahlung oder MMS (*Methyl methanesulfonate*) über sumoylierte RhoB-vermittelte lysosomale Rekrutierung von TSC2 sowie nachfolgender Hemmung von mTORC1 Autophagie initiieren kann [481]. Bei Hydroxyurea kommt dieser ATR/CHK1-vermittelte Signalweg für die Induktion von Autophagie jedoch nicht in Frage, weil es nicht wie UV oder MMS eine direkte DNA-Schädigung auslöst. Um diesen Signalweg auszuschließen, könnte man dennoch Western Blot-Analysen von sumoyliertem RhoB und TSC2 aus Lysaten von mit Hydroxyurea behandelten CML Zellen durchführen.

Weiterhin gibt es Studien, die zeigen, dass Autophagie für die fehlerfreie Ausführung der HR unabdingbar ist. So wird z.B. der Zugang von RAD51 zu DSBs durch die RAD6-abhängige Ubiquitinylierung und den durch Autophagie-vermittelten Abbau von HP1 α (*heterochromatin protein 1a*) ermöglicht [482]. Die Expression von HR-Proteinen wurde in K562 Zellen durch Hydroxyurea ebenfalls induziert (Western Blots von , Daten hier nicht gezeigt). Dabei konnte eine Induktion der Expression von RAD51, BRCA1 und FANCD2 nach Hydroxyurea Behandlung beobachtet werden. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die Regulation von DNA-Reparaturmechanismen durch die DDR von der Autophagie zusätzlich beeinflusst wird. In der Krebstherapie werden die Reparaturmechanismen oft als Hauptauslöser für die Vermittlung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika gesehen. So wurde in Brustkrebsstammzellen bereits gezeigt, dass die Behandlung mit Chloroquin, einem Inhibitor der Autophagie, die Reparatur von DNA-Schäden verhindert und die zytotoxische Wirkung von Carboplatin erhöht [483]. Deshalb wird angenommen, dass Tumorzellen Autophagie dazu nutzen, um den von IR oder Chemotherapie induzierten Zelltodmechanismen zu widerstehen. So bewirkt eine genetische Eliminierung oder pharmakologische Hemmung von Autophagieregulatoren eine Sensitivierung von Tumor- und Leukämiezellen gegenüber zytotoxischen Therapeutika *in vitro* sowie in experimentellen Mausmodellen [483-487].

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von dem Proto-Onkogen MYC Apoptose in den meisten Zellen hervorruft und als Tumorsuppressor agiert [488]. Aber MYC ist auch in der Lage durch Aktivierung der UPR (*unfolded protein response*) zytoprotektive Autophagie zu induzieren und Tumorwachstum zu fördern. Dies wird von der ER Stresskinase PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) vermittelt [489]. Der Transkriptionsfaktor c-MYC wird in K562 Zellen nach Hydroxyurea Behandlung exprimiert. Dabei ist der Proteinspiegel ähnlich dem in den Kontrollzellen (**Abb. 3.27A**). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Induktion der Autophagie in diesen Zellen über c-MYC erfolgt.

Des Weiteren gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen p73 und Autophagie aufzeigen. Zum einen wird berichtet, dass ASPP2, ein p73 Interaktionspartner, sowohl den p73-DRAM (*damage regulated autophagy modulator*) Signalweg als auch den Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) aktiviert. CHOP ist verantwortlich für die Freisetzung von Beclin1 von BCL-2. Gemeinsam mit CHOP induziert p73-DRAM autophagischen Zelltod in Hepatomzellen [490]. Eine andere Studie von Crighton et al. hingegen beschreibt, dass p73 DRAM-unabhängig Autophagie induziert und dass dieser Vorgang nicht kritisch für die Induktion von Zelltod ist [491]. Im Gegensatz zu TAp73 stellt Δ Np73 einen negativen Regulator der p73 induzierten Autophagie dar [491]. Somit modulieren verschiedene p73 Isoformen in unterschiedlichem Maße zelluläre Prozesse wie

Apoptose und Autophagie. Eine weitere Studie legt offen, dass TAp73 α durch eine direkte Transaktivierung des *ATG5* Promotors Autophagie reguliert. ATG5 ist ein wichtiger Bestandteil des ATG5-ATG12-ATG16 Konjugationssystems, welches unabdingbar für die Bildung von Autophagosomen ist. Außerdem wurde gezeigt, dass Mäuse, die in allen p73 Isoformen funktionell defizient sind im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine Reduktion der ATG5 Expression und Autophagieinduktion aufweisen [492]. Die Arbeit von Rosenbluth et al. 2008 hat zusätzlich gezeigt, dass mTOR, ein Autophagie-Inhibitor und eine Energiesensor-Kinase, die Expression von TAp73 unterdrückt. Eine Hemmung von mTOR mit Rapamycin führte in Brustkrebs- und Rhabdomyosarkomzellen zur Transkription von TAp73-abhängigen autophagischen Genen. Weiterhin wurde berichtet, dass durch Rapamycin Behandlung ausschließlich die TAp73 β Isoform induziert wird und ein *Knock-down* von TAp73 β zu einer Aufhebung der basalen Autophagie führt, was anhand der deutlich verminderten Expression von LC3 II ermittelt wurde [493].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in K562 Zellen p73 nach Hydroxyurea Behandlung induziert wird (**Abb. 3.27**). Daher ist es möglich, dass die Autophagie in CML Zellen nach replikativen Stress p73-abhängig induziert wird. Diese Hypothese müsste jedoch durch zahlreiche weitere Experimente belegt werden. Dabei sollte zum einen die Lokalisation, die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von verschiedenen p73 Isoformen und zum anderen die Expression von autophagischen p73 Zielgenen näher untersucht werden. Die Identifizierung von p73 als wichtigen Regulator der Autophagie legt nahe, dass dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Abwehr oder Verzögerung von Erkrankungen und Alterungsprozessen durch Aufrechterhaltung der Homöostase spielt. Zudem könnte es sein, dass p73-vermittelte Autophagie die Abwesenheit von p53 (in K562 Zellen) kompensiert. Denn auch p53 besitzt in der Autophagie eine duale Rolle. Einerseits aktiviert nukleäres p53 Autophagie durch Induktion von DRAM, andererseits kann zytosolisches p53 Autophagie durch Aktivierung des mTOR Signalwegs hemmen [494-496]. Somit scheint p73 in p53-negativen Krebszellen therapeutisch ein vielversprechendes Zielgen zu sein.

4.6 Crosstalk zwischen Autophagie und Apoptose

Anti-apoptotische Faktoren, wie BCL-2, BCL-XL und MCL-1, sind wichtige negative Regulatoren der Autophagie. Dabei hemmen diese Proteine Beclin1, einen essentiellen Regulator in der Initiationsphase des Autophagievorgangs, indem sie über ihre BH3-Bindungsfuge mit der BH3-Domäne von Beclin1 interagieren [497, 498]. Es gibt verschiedene Wege, um Beclin1 aus der Bindung mit anti-apoptotischen Proteinen freizusetzen. Zum einen können pro-apoptotische BH3-*only* Proteine, wie z.B. BAD, NOXA, PUMA und BIM_{EL}, die anti-apoptotischen Proteine abfangen [497]. Zum anderen kann die

BH3-Domäne von Beclin1 durch DAPK (*death-associated protein kinase*) sowie BCL-2 durch JNK1 oder ERK phosphoryliert werden [499-502]. Folglich sind sowohl BH3-*only* Proteine als auch Kinasen zur Dissoziation von Beclin1/BCL-2 notwendig, um Autophagie als zelluläre Antwort auf bestimmte Stressstimuli zu induzieren [503]. In K562 Zellen werden die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XL und MCL-1 nach Hydroxyurea Behandlung exprimiert. Aber auch das pro-apoptotische BH3-*only* Protein PUMA wird exprimiert, sodass sie vermutlich interagieren und sich gegenseitig neutralisieren (**Abb. 3.10**). Als Folge wird Beclin1 freigesetzt und Autophagie induziert.

Weiterhin belegen Studien, dass die Induktion von Apoptose durch die Spaltung von autophagischen Regulatoren erfolgt. So führt z.B. die BAX-vermittelte Apoptose zu einer verstärkten Caspase-abhängigen Spaltung von Beclin1 an Aspartat 149 (D149) und dadurch zu einer Abnahme der Autophagie. Ein „nicht-spaltbares“ Beclin1 sowie BCL-XL stellen die Autophagie wieder her [504]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass der Todesrezeptor TRAIL die Caspase-abhängige Spaltung von Beclin1 induziert, aber auch aktives Caspase 8 durch Autophagie wieder abgebaut wird [505]. Interessanterweise fördert die Caspase-abhängige Spaltung von Beclin1 den *Crosstalk* zwischen Autophagie und Apoptose [506]. Caspasen können als Cystein Aspartat Proteasen Beclin1 während der apoptotischen Signalkaskade in N- und C-terminale Fragmente spalten, wodurch das Protein seine pro-autophagische Aktivität verliert [504, 507]. Die C-terminalen Fragmente werden zu den Mitochondrien transloziert, wo sie die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren auslösen und die Zellen gegenüber apoptotischen Signalen sensitivieren [507]. Auch die Calpain-abhängige Spaltung von ATG5 führt zur weiteren Stimulation der Apoptose. Dabei bewirken N-terminale ATG5 Fragmente die Freisetzung von pro-apoptotischen Komponenten aus den Mitochondrien [508].

Des Weiteren wird berichtet, dass HDACi durch negative Regulation von autophagischen Proteinen zur Unterdrückung der Autophagie und gleichzeitig zur Induktion von Apoptose in Leukämiezellen führen [309]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MS-275 in K562 Zellen die Hydroxyurea induzierte Autophagie auf das Niveau der Kontrollzellen (**Abb. 3.4, 3.6**) reduziert und gleichzeitig Apoptose induziert. Beclin1, LC3B und ATG5 werden ebenfalls abgebaut (**Abb. 3.5**). Eine Hemmung von Caspasen und Calpainen durch zVAD-FMK [509] führt in MS-275/Hydroxyurea behandelten Zellen zu einem verringerten Abbau von Beclin1, ATG5 und anderen autophagischen Proteinen (**Abb. 3.7**). Ein zusätzlicher *Knock-down* von Beclin1 in K562 Zellen zeigte sowohl eine Abnahme der durch Hydroxyurea induzierten Autophagie als auch eine Zunahme der durch MS-275/Hydroxyurea induzierten Apoptose (**Abb. 3.8**). Meine Resultate bestätigen somit die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen bezüglich des *feedback* Mechanismus

zwischen Autophagie und Apoptose. Abschließend kann man sagen, dass die Wahl zwischen adaptiven Mechanismen (z.B. Autophagie) und Zelltodprogrammen durch die Art, die Intensität und die Dauer des Stresssignals bestimmt wird [510].

4.7 ATR und CHK1 agieren als pro-apoptotische Faktoren durch die Regulation von NOXA

Die *Checkpoint*-Kinasen ATR und CHK1 dienen bei DNA-Schädigung dazu, als essentielle DDR-Proteine durch Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose die DNA-Integrität aufrechtzuerhalten und so die Entstehung von Krebs zu verhindern [215]. Es ist bekannt, dass in Tumor- und Leukämiezellen aktivierte Onkogene, wie MYC oder BCR/ABL, die genannten *Checkpoint*-Kinasen induzieren und aktivieren, um dem erhöhten Replikationsstress gerecht zu werden [179]. Beispiele sind MYC-abhängige B-Zell-Lymphomzellen [216-218] oder BCR/ABL-positive Leukämiezellen. Oftmals schützt die veränderte Expression von DDR-Proteinen die Krebszellen vor der Zytotoxizität von Chemotherapeutika (z.B. Mitomycin) [179, 219]. Deshalb wurden verschiedene Zellzyklus-*Checkpoint*-Inhibitoren entwickelt, um spezifisch die Mechanismen zu hemmen, die von Tumorzellen als Antwort auf DNA-schädigende Substanzen aktiviert werden [220].

In dieser Arbeit wurde aufgedeckt, dass die Kombinationsbehandlung mit MS-275 und Hydroxyurea die Induktion von γ H2AX und Apoptose begünstigt (**Abb. 3.1, 3.15**). Anschließend wurde untersucht, ob eine zusätzliche Behandlung mit dem ATRi VE-821 und/oder dem CHK1i MK-8776 die CML Zellen weiter gegenüber MS-275/Hydroxyurea sensitiviert. In Darmkrebszellen (p53 Wildtyp), die mit MS-275/Hydroxyurea behandelt wurden, hatte meine Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die Hemmung von ATR bzw. CHK1 eine erhöhte Apoptoserate sowie mehr γ H2AX zur Folge hat [132]. Auch zahlreiche andere Studien in diversen Tumorarten (Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Osteosarkom, CLL, etc.) bestätigten die Zunahme der Anti-Tumoraktivität von VE-821 und weiteren ATRi in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika (Gemcitabin, Ibrutinib, Hydroxyurea etc.) *in vitro* und *in vivo* [128, 179, 225-227, 511]. ATRi werden auch in klinischen Studien als Monotherapie oder Kombinationstherapie mit anderen Krebsmedikamenten u.a. in CLL Patienten untersucht [512]. Oftmals war die Sensitivierung durch ATRi auf die Akkumulation von nicht repariertem DNA-Schaden und defekten *Checkpoints* zurückzuführen. Dadurch treten diese Zellen in die Mitose ein, in der sie über die mitotische Katastrophe absterben [132, 511]. Die Applikation von MK-8776 und anderen CHK1i zeigte ebenfalls eine Chemosensitivierung in verschiedenen Tumor- und Leukämiezellen [228-231, 513]. Zudem wurden CHK1i in klinischen Studien erfolgreich in Kombination mit Chemotherapeutika in AML Patienten mit gestörter DDR Aktivierung

eingesetzt [514]. Erstaunlicherweise, führt in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen eine Zugabe von VE-821 bzw. MK-8776 zu einer Reduktion der apoptotischen Zellpopulation (**Abb. 3.19**). Die Menge an DSBs bzw. γ H2AX nimmt in diesen Zellen dennoch zu (**Abb. 3.22, 3.26**). Die Beobachtung, dass durch Hemmung von DDR-Proteinen mehr DNA-Strangbrüche in den bereits geschädigten Zellen entstehen, wird durch viele Studien (siehe oben) bestätigt. Diese zeigten aber gleichzeitig auch eine Sensitivierung gegenüber den genotoxischen Substanzen. Weiterhin sind Mäuse mit einer verringerten ATR-Aktivität eher weniger tumoranfällig als Wildtyp Mäuse [179, 515].

Eine Hemmung von ATM durch KU-60019 führt in K562 Zellen ebenfalls zu einer Zunahme von γ H2AX (**Abb. 3.25**). Aber KU-60019 hat keine Auswirkungen auf den durch MS-275/Hydroxyurea induzierten Zelltod (**Abb. 3.25**). Somit spielen hauptsächlich die *Checkpoint*-Kinasen ATR und CHK1 eine kritische Rolle in diesem Kontext. Zur vollständigen Klärung, ob ATR und CHK1 *upstream* von c-ABL und p73 in der Signalkaskade agieren, sollte die Expression von c-ABL bzw. p-Y694-STAT5 und p73 in MS-275/Hydroxyurea/VE-821 sowie MS-275/Hydroxyurea/MK-8776 behandelten CML Zellen mittels Western Blot untersucht werden. Es wird erwartet, dass die Expression von p-Y694-STAT5 und p73 in diesen Zellen abnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine DNA-protective Rolle von ATR-CHK1 dargelegt. Allerdings wurde auch nachgewiesen, dass die ATR-CHK1 Achse durch Regulation von NOXA in der Apoptosekaskade involviert ist (**Abb. 3.19, 3.22, 3.23, 3.26**). Trotz Reduktion der Apoptose durch VE-821 bzw. MK-8776 in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen, werden die restlichen überlebenden Zellen aufgrund des enormen DNA-Schadens nach einer gewissen Behandlungsdauer höchstwahrscheinlich ebenfalls den Zelltod einleiten, da keine Re-Aktivierung der Autophagie als Überlebensmechanismus in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen durch VE-821 bzw. MK-8776 Behandlung oder durch eine genetische Eliminierung von ATR beobachtet werden konnte (**Abb. 3.22, 3.24**).

Bisher wurde in CML Zellen die c-ABL-p73-NOXA Achse als kritische Signalkaskade für die Induktion von Apoptose nach MS-275/Hydroxyurea Behandlung aufgeklärt. Da die Hemmung von c-ABL durch Imatinib nicht direkt die MS-275/Hydroxyurea induzierte Phosphorylierung von ATR (T1989) und CHK1 (S317) beeinflusst (**Abb. 3.30**), aktiviert wahrscheinlich ATR bzw. CHK1 als vorgeschalteter Regulator die TK c-ABL. Aber es ist auch möglich, dass c-ABL ATR vorher zusätzlich Tyrosin-phosphoryliert. Denn Wang et al. haben gezeigt, dass c-ABL notwendig ist, um ATM/ATR durch Phosphorylierung vollständig zu aktivieren. Die Autophosphorylierung von ATM/ATR sowie die Phosphorylierung von CHK1 (S345), CHK2 (T68) und p53 (S18) waren nach Behandlung mit Doxorubicin in c-ABL-negativen MEFs deutlich reduziert. Auch die Untersuchung der durch Hydroxyurea

induzierten ssDNA-Zellantwort ergab, dass c-ABL-negative MEFs p-p53 (S18) vermindert exprimieren. Somit führt c-ABL in beiden Signalwegen (ssDNA-ATR und DSB-ATM) eine pro-apoptische Rolle aus [430]. In K562 Zellen sollte die Phosphorylierung von ATR an Y291 und Y310 nach Behandlung mit Imatinib und/oder MS-275/Hydroxyurea mittels *in vitro* Kinase Assay noch nachgewiesen werden. Die Hemmung von c-ABL durch Imatinib führte in MS-275/Hydroxyurea behandelten K562 Zellen nicht nur zur Abnahme der p73 und NOXA Expression, sondern auch gleichzeitig zur Zunahme von γ H2AX (**Abb. 3.30**). Dies könnte an der Reduktion der DSB-Reparatur liegen, da c-ABL auch an der Aktivierung von NHEJ und HR Proteinen (DNA-PKcs, RAD51, etc.) beteiligt ist [185, 516].

4.8 Möglicher Signalweg zur Apoptoseinduktion und Autophagiehemmung durch Zusammenwirken von Replikationsstress und HDACi

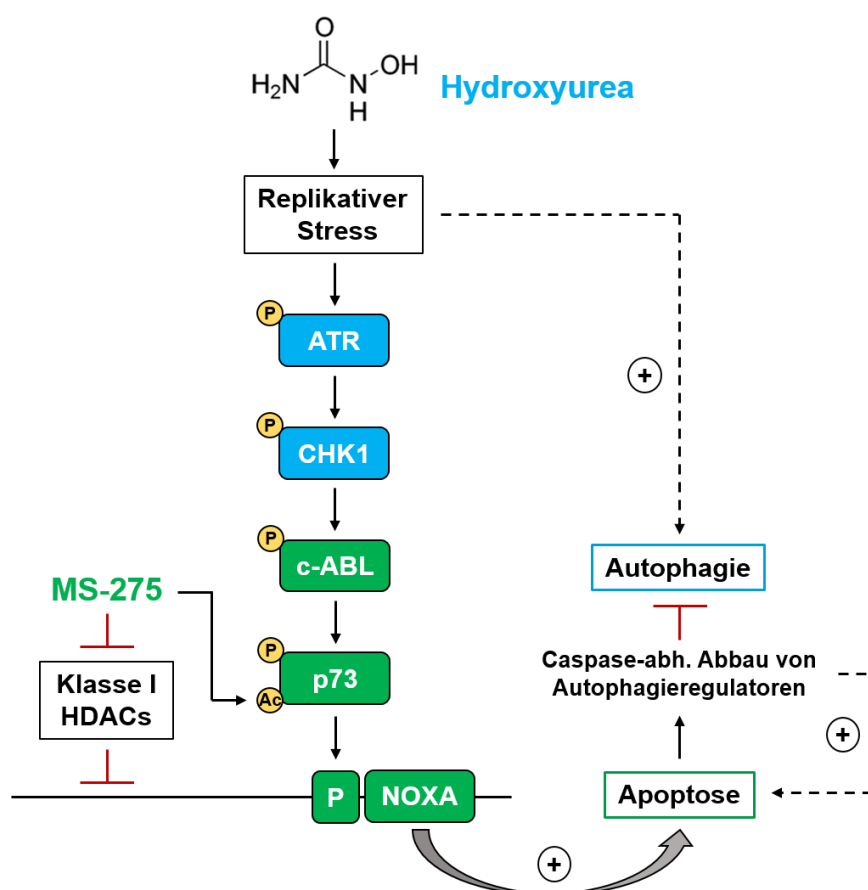


Abb. 4.2: Modell zum Mechanismus der Apoptoseinduktion in Leukämiezellen durch MS-275 und Hydroxyurea. Hydroxyurea erzeugt replikativen Stress durch eine Verringerung des dNTP Pools in Zellen. Im ersten Schritt der DDR wird ATR phosphoryliert. CHK1 wird von ATR an verschiedenen Stellen phosphoryliert (S317, S345) [151, 153] und aktiviert. Die TK c-ABL ist konstitutiv aktiv in den CML Zellen. c-ABL kann ATR phosphorylieren. Dadurch wird ATR wahrscheinlich vollständig aktiviert. Danach wird p73 durch CHK1 phosphoryliert. p73 wird durch die Behandlung mit MS-275 acetyliert, wodurch die pro-apoptischen Funktionen von p73 aktiviert werden. MS-275 hebt die Hemmung der Transkription von NOXA durch Klasse I HDACs auf. Phosphoryliertes und acetyliertes p73 kann an den NOXA Promotor (P) binden und die Transkription von NOXA induzieren. Die Induktion von mitochondrialer Apoptose führt zum Caspase-abhängigen Abbau von Autophagieregulatoren, wodurch die von Hydroxyurea induzierte Autophagie gehemmt wird. Die gespaltenen Fragmente der Autophagieregulatoren können die Apoptose zusätzlich stimulieren.

Der Mechanismus zur p53-unabhängigen Apoptoseinduktion in CML Zellen wurde in **Abb. 4.2** zusammengefasst. Darin ist nochmal aufgezeichnet, dass die Expression von NOXA durch Klasse I HDACs gehemmt wird, sodass diese Hemmung durch MS-275 aufgehoben wird. Hydroxyurea aktiviert die ATR-CHK1 Achse und die Phosphorylierung von p73 durch c-ABL. MS-275 ruft die Acetylierung von phosphoryliertem p73 hervor, wodurch dessen Fähigkeit, die Expression von pro-apoptischen Zielgenen zu induzieren, aktiviert wird. Phosphoryliertes und zugleich acetyliertes p73 kann statt p53 an den NOXA Promotor binden und dessen Transkription induzieren. Die Apoptose führt in CML Zellen zu einer Degradation von Autophagieregulatoren, wie von Beclin1, LC3B oder ATG5. Dadurch wird die Autophagie gehemmt.

5 Referenzen

- [1] Onko-Internetportal, Definition und Häufigkeit von Leukämie. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/leukaemie/definition-und-haeufigkeit.html>.
- [2] Kompetenznetz-Leukämien, Das Krankheitsbild Leukämie. <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/>.
- [3] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, J.E. Dick, Hematopoiesis: a human perspective, *Cell stem cell* 10(2) (2012) 120-36.
- [4] J. Seita, I.L. Weissman, Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation, *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 2(6) (2010) 640-53.
- [5] L. Robb, Cytokine receptors and hematopoietic differentiation, *Oncogene* 26(47) (2007) 6715-23.
- [6] W.S. Alexander, Cytokines in hematopoiesis, *International reviews of immunology* 16(5-6) (1998) 651-82.
- [7] D. DiGiusto, S. Chen, J. Combs, S. Webb, R. Namikawa, A. Tsukamoto, B.P. Chen, A.H. Galy, Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34, *Blood* 84(2) (1994) 421-32.
- [8] K. Dohner, H. Dohner, Molecular characterization of acute myeloid leukemia, *Haematologica* 93(7) (2008) 976-82.
- [9] Kompetenznetz-Leukämien, Akute myeloische Leukämie (AML). <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/aml/>.
- [10] Kompetenznetz-Leukämien, Chronische Myeloische Leukämie (CML). <https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/cml/>.
- [11] U. Testa, R. Riccioni, Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia, *Haematologica* 92(1) (2007) 81-94.
- [12] A. Di Bacco, K. Keeshan, S.L. McKenna, T.G. Cotter, Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis, *The oncologist* 5(5) (2000) 405-15.
- [13] M.P. Buzzeo, E.W. Scott, C.R. Cogle, The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia, *Leukemia* 21(8) (2007) 1619-27.
- [14] DKFZ, Leukämien bei Erwachsenen: Klassifikation von Erkrankungen des blutbildenden Systems, 2012. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/leukaemien/einteilung.php>.
- [15] Onmeda.de, Leukämie (Blutkrebs): Welche Anzeichen gibt es?, 2017. <https://www.onmeda.de/krankheiten/leukaemie.html>.
- [16] H. Kantarjian, C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, D. Niederwieser, D. Resta, R. Capdeville, U. Zoellner, M. Talpaz, B. Druker, J. Goldman, S.G. O'Brien, N. Russell, T. Fischer, O. Ottmann, P. Cony-Makhoul, T. Facon, R. Stone, C. Miller, M. Tallman, R. Brown, M. Schuster, T. Loughran, A. Gratwohl, F. Mandelli, G. Saglio, M. Lazzarino, D. Russo, M. Baccarani, E. Morra, Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *The New England journal of medicine* 346(9) (2002) 645-52.
- [17] S.Z. Usmani, S.A. Yunus, Y. Jamal, Overview of chronic myeloid leukemia patients in Pakistan in the pre-imatinib era, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 10(6) (2009) 1039-40.
- [18] P.K. Bhamidipati, H. Kantarjian, J. Cortes, A.M. Cornelison, E. Jabbour, Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia, *Therapeutic advances in hematology* 4(2) (2013) 103-17.
- [19] C.T. Dalgic, B.T. Kaymaz, M.C. Ozkan, A. Dalmizrak, F. Sahin, G. Saydam, Investigating the Role of JAK/STAT Pathway on Dasatinib-Induced Apoptosis for CML Cell Model K562, *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 15 Suppl (2015) S161-6.
- [20] M. Baccarani, G. Saglio, J. Goldman, A. Hochhaus, B. Simonsson, F. Appelbaum, J. Apperley, F. Cervantes, J. Cortes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, D. Niederwieser, R. Silver, R. Hehlmann, Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet, *Blood* 108(6) (2006) 1809-20.
- [21] R. Hehlmann, A. Hochhaus, M. Baccarani, Chronic myeloid leukaemia, *Lancet (London, England)* 370(9584) (2007) 342-50.
- [22] M. Bjorkholm, L. Ohm, S. Eloranta, A. Derolf, M. Hultcrantz, J. Sjoberg, T. Andersson, M. Hoglund, J. Richter, O. Landgren, S.Y. Kristinsson, P.W. Dickman, Success story of targeted therapy in chronic myeloid leukemia: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2008, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(18) (2011) 2514-20.
- [23] H. Kantarjian, S. O'Brien, E. Jabbour, G. Garcia-Manero, A. Quintas-Cardama, J. Shan, M.B. Rios, F. Ravandi, S. Faderl, T. Kadia, G. Borthakur, X. Huang, R. Champlin, M. Talpaz, J. Cortes, Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience, *Blood* 119(9) (2012) 1981-7.
- [24] M. Baccarani, J. Cortes, F. Pane, D. Niederwieser, G. Saglio, J. Apperley, F. Cervantes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, A. Hochhaus, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, J. Radich, B. Simonsson, R.T. Silver, J. Goldman, R. Hehlmann, Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(35) (2009) 6041-51.

- [25] M. Bacarani, M.W. Deininger, G. Rosti, A. Hochhaus, S. Soverini, J.F. Apperley, F. Cervantes, R.E. Clark, J.E. Cortes, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, T.P. Hughes, H.M. Kantarjian, D.W. Kim, R.A. Larson, J.H. Lipton, F.X. Mahon, G. Martinelli, J. Mayer, M.C. Muller, D. Niederwieser, F. Pane, J.P. Radich, P. Rousselot, G. Saglio, S. Saussele, C. Schiffer, R. Silver, B. Simonsson, J.L. Steegmann, J.M. Goldman, R. Hehlmann, European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, *Blood* 122(6) (2013) 872-84.
- [26] J. Pavlu, R.M. Szydlo, J.M. Goldman, J.F. Apperley, Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned?, *Blood* 117(3) (2011) 755-63.
- [27] H.M. Kantarjian, J. Cortes, P. La Rosee, A. Hochhaus, Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase, *Cancer* 116(6) (2010) 1419-30.
- [28] M. Talpaz, R. Hehlmann, A. Quintas-Cardama, J. Mercer, J. Cortes, Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia, *Leukemia* 27(4) (2013) 803-12.
- [29] T. Ernst, F.X. Gruber, O. Pelz-Ackermann, J. Maier, M. Pfirrmann, M.C. Muller, I. Mikkola, K. Porkka, D. Niederwieser, A. Hochhaus, T. Lange, A co-operative evaluation of different methods of detecting BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on second-line dasatinib or nilotinib therapy after failure of imatinib, *Haematologica* 94(9) (2009) 1227-35.
- [30] F.G. Stephen GO'B, John MG, et al., International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up, sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM). , *Blood* 116 (2010) 3758-65.
- [31] A. Hochhaus, S.G. O'Brien, F. Guilhot, B.J. Druker, S. Branford, L. Foroni, J.M. Goldman, M.C. Muller, J.P. Radich, M. Rudoltz, M. Mone, I. Gathmann, T.P. Hughes, R.A. Larson, Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia, *Leukemia* 23(6) (2009) 1054-61.
- [32] A. Hochhaus, Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure, *Expert opinion on pharmacotherapy* 8(18) (2007) 3257-64.
- [33] T. O'Hare, C.A. Eide, M.W. Deininger, Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia, *Blood* 110(7) (2007) 2242-9.
- [34] H. Kantarjian, N.P. Shah, A. Hochhaus, J. Cortes, S. Shah, M. Ayala, B. Moiraghi, Z. Shen, J. Mayer, R. Pasquini, H. Nakamae, F. Huguet, C. Boque, C. Chuah, E. Bleickardt, M.B. Bradley-Garelik, C. Zhu, T. Szatrowski, D. Shapiro, M. Bacarani, Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *The New England journal of medicine* 362(24) (2010) 2260-70.
- [35] G. Saglio, D.W. Kim, S. Issaragrisil, P. le Coutre, G. Etienne, C. Lobo, R. Pasquini, R.E. Clark, A. Hochhaus, T.P. Hughes, N. Gallagher, A. Hoenekopp, M. Dong, A. Haque, R.A. Larson, H.M. Kantarjian, Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia, *The New England journal of medicine* 362(24) (2010) 2251-9.
- [36] L.K. Durrin, R.K. Mann, P.S. Kayne, M. Grunstein, Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo, *Cell* 65(6) (1991) 1023-31.
- [37] S. Spange, T. Wagner, T. Heinzel, O.H. Kramer, Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels, *The international journal of biochemistry & cell biology* 41(1) (2009) 185-98.
- [38] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, M. Mann, Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions, *Science (New York, N.Y.)* 325(5942) (2009) 834-40.
- [39] S.Y. Roth, J.M. Denu, C.D. Allis, Histone acetyltransferases, *Annual review of biochemistry* 70 (2001) 81- 120.
- [40] S. Thiagalingam, K.H. Cheng, H.J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam, J.F. Ponte, Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code, *Annals of the New York Academy of Sciences* 983 (2003) 84-100.
- [41] N. Kiweler, B. Brill, M. Wirth, I. Breuksch, T. Laguna, C. Dietrich, S. Strand, G. Schneider, B. Groner, F. Butter, T. Heinzel, W. Brenner, O.H. Kramer, The histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 are required for the growth and survival of renal carcinoma cells, *Archives of toxicology* 92(7) (2018) 2227-2243.
- [42] C. Choudhary, B.T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(8) (2014) 536-50.
- [43] B.T. Weinert, T. Narita, S. Satpathy, B. Srinivasan, B.K. Hansen, C. Scholz, W.B. Hamilton, B.E. Zucconi, W.W. Wang, W.R. Liu, J.M. Brickman, E.A. Kesicki, A. Lai, K.D. Bromberg, P.A. Cole, C. Choudhary, Time-Resolved Analysis Reveals Rapid Dynamics and Broad Scope of the CBP/p300 Acetylome, *Cell* 174(1) (2018) 231-244 e12.
- [44] A. Inoue, D. Fujimoto, Enzymatic deacetylation of histone, *Biochemical and biophysical research communications* 36(1) (1969) 146-50.
- [45] T. Ginter, T. Heinzel, O.H. Kramer, Acetylation of endogenous STAT proteins, *Methods in molecular biology* 967 (2013) 167-78.
- [46] V.G. Allfrey, R. Faulkner, A.E. Mirsky, ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (1964) 786-94.
- [47] D.M. Phillips, The presence of acetyl groups of histones, *The Biochemical journal* 87 (1963) 258-63.

- [48] M. Buchwald, K. Pietschmann, P. Brand, A. Gunther, N.P. Mahajan, T. Heinzl, O.H. Kramer, SIAH ubiquitin ligases target the nonreceptor tyrosine kinase ACK1 for ubiquitinylation and proteasomal degradation, *Oncogene* 32(41) (2013) 4913-20.
- [49] M. Wieczorek, T. Ginter, P. Brand, T. Heinzl, O.H. Kramer, Acetylation modulates the STAT signaling code, *Cytokine & growth factor reviews* 23(6) (2012) 293-305.
- [50] K. Ververis, A. Hiong, T.C. Karagiannis, P.V. Licciardi, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents, *Biologics : targets & therapy* 7 (2013) 47-60.
- [51] A. Ungewickell, B.C. Medeiros, Novel agents in acute myeloid leukemia, *International journal of hematology* 96(2) (2012) 178-85.
- [52] L.Z. He, T. Tolentino, P. Grayson, S. Zhong, R.P. Warrell, Jr., R.A. Rifkind, P.A. Marks, V.M. Richon, P.P. Pandolfi, Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia, *The Journal of clinical investigation* 108(9) (2001) 1321-30.
- [53] J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nature reviews. Drug discovery* 5(9) (2006) 769-84.
- [54] A.J. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *The Biochemical journal* 370(Pt 3) (2003) 737-49.
- [55] M.C. Haigis, L.P. Guarente, Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction, *Genes & development* 20(21) (2006) 2913-21.
- [56] S.W. Buck, C.M. Gallo, J.S. Smith, Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases, *Journal of leukocyte biology* 75(6) (2004) 939-50.
- [57] I.V. Gregoret, Y.M. Lee, H.V. Goodson, Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis, *Journal of molecular biology* 338(1) (2004) 17-31.
- [58] X.J. Yang, E. Seto, The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men, *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(3) (2008) 206-18.
- [59] M. Martin, R. Kettmann, F. Dequiedt, Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators, *Oncogene* 26(37) (2007) 5450-67.
- [60] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, T.P. Yao, HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature* 417(6887) (2002) 455-8.
- [61] J.M. Denu, The Sir 2 family of protein deacetylases, *Current opinion in chemical biology* 9(5) (2005) 431-40.
- [62] E. Michishita, J.Y. Park, J.M. Burneskis, J.C. Barrett, I. Horikawa, Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins, *Molecular biology of the cell* 16(10) (2005) 4623-35.
- [63] J.T. Lee, W. Gu, SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation, *Genes & cancer* 4(3-4) (2013) 112-7.
- [64] L. Gao, M.A. Cueto, F. Asselbergs, P. Atadja, Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family, *The Journal of biological chemistry* 277(28) (2002) 25748-55.
- [65] S. Minucci, P.G. Pelicci, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer, *Nature reviews. Cancer* 6(1) (2006) 38-51.
- [66] S. Muller, O.H. Kramer, Inhibitors of HDACs--effective drugs against cancer?, *Current cancer drug targets* 10(2) (2010) 210-28.
- [67] D. Hennig, S. Muller, C. Wichmann, S. Drube, K. Pietschmann, L. Pelzl, M. Grez, G. Bug, T. Heinzl, O.H. Kramer, Antagonism between granulocytic maturation and deacetylase inhibitor-induced apoptosis in acute promyelocytic leukaemia cells, *British journal of cancer* 112(2) (2015) 329-37.
- [68] N. Ma, Y. Luo, Y. Wang, C. Liao, W.C. Ye, S. Jiang, Selective Histone Deacetylase Inhibitors with Anticancer Activity, *Current topics in medicinal chemistry* 16(4) (2016) 415-26.
- [69] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100(1) (2000) 57-70.
- [70] K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers, *Nature* 386(6627) (1997) 761, 763.
- [71] S. Spiegel, S. Milstien, S. Grant, Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy, *Oncogene* 31(5) (2012) 537-51.
- [72] W. Weichert, A. Roske, S. Niesporek, A. Noske, A.C. Buckendahl, M. Dietel, V. Gekeler, M. Boehm, T. Beckers, C. Denkert, Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(6) (2008) 1669-77.
- [73] C. Mercurio, S. Minucci, P.G. Pelicci, Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies, *Pharmacological research* 62(1) (2010) 18-34.
- [74] C.B. Yoo, P.A. Jones, Epigenetic therapy of cancer: past, present and future, *Nature reviews. Drug discovery* 5(1) (2006) 37-50.
- [75] A.H. Lund, M. van Lohuizen, Epigenetics and cancer, *Genes & development* 18(19) (2004) 2315-35.
- [76] S.B. Baylin, J.E. Ohm, Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?, *Nature reviews. Cancer* 6(2) (2006) 107-16.
- [77] M. Buchwald, K. Pietschmann, J.P. Muller, F.D. Bohmer, T. Heinzl, O.H. Kramer, Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation, *Leukemia* 24(8) (2010) 1412-21.
- [78] G. Bug, M. Ritter, B. Wassmann, C. Schoch, T. Heinzl, K. Schwarz, A. Romanski, O.H. Kramer, M. Kampfmann, D. Hoelzer, A. Neubauer, M. Ruthardt, O.G. Ottmann, Clinical trial of valproic acid and

- all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia, *Cancer* 104(12) (2005) 2717-25.
- [79] K. Pietschmann, M. Buchwald, S. Muller, S.K. Knauer, M. Kogl, T. Heinzl, O.H. Kramer, Differential regulation of PML-RARalpha stability by the ubiquitin ligases SIAH1/SIAH2 and TRIAD1, *The international journal of biochemistry & cell biology* 44(1) (2012) 132-8.
- [80] S.J. Harrison, M. Bishton, S.E. Bates, S. Grant, R.L. Piekarz, R.W. Johnstone, Y. Dai, B. Lee, M.E. Araujo, H.M. Prince, A focus on the preclinical development and clinical status of the histone deacetylase inhibitor, romidepsin (depsipeptide, Istodax((R))), *Epigenomics* 4(5) (2012) 571-89.
- [81] S. Affi, A. Michael, M. Azimi, M. Rodriguez, N. Lendvai, O. Landgren, Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Focus on Vorinostat and Panobinostat, *Pharmacotherapy* 35(12) (2015) 1173-88.
- [82] L. Cappellacci, D.R. Perinelli, F. Maggi, M. Grifantini, R. Petrelli, Recent Progress in Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents, *Current medicinal chemistry* (2018).
- [83] K. Hood, A. Shah, Belinostat for Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma, *Journal of the advanced practitioner in oncology* 7(2) (2016) 209-218.
- [84] O.H. Kramer, P. Zhu, H.P. Ostendorff, M. Golebiewski, J. Tiefenbach, M.A. Peters, B. Brill, B. Groner, I. Bach, T. Heinzl, M. Gottlicher, The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2, *The EMBO journal* 22(13) (2003) 3411-20.
- [85] M. Buchwald, O.H. Kramer, T. Heinzl, HDACi--targets beyond chromatin, *Cancer letters* 280(2) (2009) 160-7.
- [86] O.H. Kramer, HDAC2: a critical factor in health and disease, *Trends in pharmacological sciences* 30(12) (2009) 647-55.
- [87] O.H. Kramer, S. Muller, M. Buchwald, S. Reichardt, T. Heinzl, Mechanism for ubiquitylation of the leukemia fusion proteins AML1-ETO and PML-RARalpha, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(5) (2008) 1369-79.
- [88] O.H. Kramer, R.H. Stauber, G. Bug, J. Hartkamp, S.K. Knauer, SIAH proteins: critical roles in leukemogenesis, *Leukemia* 27(4) (2013) 792-802.
- [89] K. Pietschmann, H.A. Bolck, M. Buchwald, S. Spielberg, H. Polzer, K. Spiekermann, G. Bug, T. Heinzl, F.D. Bohmer, O.H. Kramer, Breakdown of the FLT3-ITD/STAT5 axis and synergistic apoptosis induction by the histone deacetylase inhibitor panobinostat and FLT3-specific inhibitors, *Molecular cancer therapeutics* 11(11) (2012) 2373-83.
- [90] W.L. Labisso, M. Wirth, N. Stojanovic, R.H. Stauber, A. Schnieke, R.M. Schmid, O.H. Kramer, D. Saur, G. Schneider, MYC directs transcription of MCL1 and eIF4E genes to control sensitivity of gastric cancer cells toward HDAC inhibitors, *Cell cycle* 11(8) (2012) 1593-602.
- [91] G. Schneider, O.H. Kramer, P. Fritsche, S. Schuler, R.M. Schmid, D. Saur, Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Journal of cellular and molecular medicine* 14(6A) (2010) 1255-63.
- [92] G. Schneider, O.H. Kramer, R.M. Schmid, D. Saur, Acetylation as a transcriptional control mechanism--HDACs and HATs in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Journal of gastrointestinal cancer* 42(2) (2011) 85-92.
- [93] R.H. Stauber, S.K. Knauer, N. Habtemichael, C. Bier, B. Unruhe, S. Weisheit, S. Spange, F. Nonnenmacher, V. Fetz, T. Ginter, S. Reichardt, C. Liebmann, G. Schneider, O.H. Kramer, A combination of a ribonucleotide reductase inhibitor and histone deacetylase inhibitors downregulates EGFR and triggers BIM-dependent apoptosis in head and neck cancer, *Oncotarget* 3(1) (2012) 31-43.
- [94] P.A. Marks, Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions, *Biochimica et biophysica acta* 1799(10-12) (2010) 717-25.
- [95] R. Tang, A.M. Faussat, P. Majdak, J.Y. Perrot, D. Chaoui, O. Legrand, J.P. Marie, Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1, *Leukemia* 18(7) (2004) 1246-51.
- [96] A. Burgess, A. Ruefli, H. Beamish, R. Warrener, N. Saunders, R. Johnstone, B. Gabrielli, Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells, *Oncogene* 23(40) (2004) 6693-701.
- [97] M. Dokmanovic, P.A. Marks, Prospects: histone deacetylase inhibitors, *Journal of cellular biochemistry* 96(2) (2005) 293-304.
- [98] P. Munster, D. Marchion, E. Bicaku, M. Lacevic, J. Kim, B. Centeno, A. Daud, A. Neuger, S. Minton, D. Sullivan, Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(7) (2009) 2488-96.
- [99] P.N. Munster, D. Marchion, S. Thomas, M. Egorin, S. Minton, G. Springett, J.H. Lee, G. Simon, A. Chiappori, D. Sullivan, A. Daud, Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker, *British journal of cancer* 101(7) (2009) 1044-50.
- [100] J.S. Carew, F.J. Giles, S.T. Nawrocki, Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy, *Cancer letters* 269(1) (2008) 7-17.
- [101] P. Munster, D. Marchion, E. Bicaku, M. Schmitt, J.H. Lee, R. DeConti, G. Simon, M. Fishman, S. Minton, C. Garrett, A. Chiappori, R. Lush, D. Sullivan, A. Daud, Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(15) (2007) 1979-85.

- [102] A. Masoudi, M. Elope, E. Amini, M.E. Nagel, J.L. Ater, V. Gopalakrishnan, J.E. Wolff, Influence of valproic acid on outcome of high-grade gliomas in children, *Anticancer research* 28(4C) (2008) 2437-42.
- [103] T.C. Karagiannis, H. Kn, A. El-Osta, The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity, *Epigenetics* 1(3) (2006) 131-7.
- [104] A.J. Frew, R.W. Johnstone, J.E. Bolden, Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors, *Cancer letters* 280(2) (2009) 125-33.
- [105] X. Ma, H.H. Ezzeldin, R.B. Diasio, Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials, *Drugs* 69(14) (2009) 1911-34.
- [106] A. Suraweera, K.J. O'Byrne, D.J. Richard, Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi, *Frontiers in oncology* 8 (2018) 92.
- [107] J.E. Bradner, R. Mak, S.K. Tanguturi, R. Mazitschek, S.J. Haggarty, K. Ross, C.Y. Chang, J. Bosco, N. West, E. Morse, K. Lin, J.P. Shen, N.P. Kwiatkowski, N. Gheldof, J. Dekker, D.J. DeAngelo, S.A. Carr, S.L. Schreiber, T.R. Golub, B.L. Ebert, Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(28) (2010) 12617-22.
- [108] National-Institute-of-Health, Clinical trials on MS-275. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Entinostat&pg=1>.
- [109] E.Y. Park, Y. Woo, S.J. Kim, D.H. Kim, E.K. Lee, U. De, K.S. Kim, J. Lee, J.H. Jung, K.T. Ha, W.S. Choi, I.S. Kim, B.M. Lee, S. Yoon, H.R. Moon, H.S. Kim, Anticancer Effects of a New SIRT Inhibitor, MHY2256, against Human Breast Cancer MCF-7 Cells via Regulation of MDM2-p53 Binding, *International journal of biological sciences* 12(12) (2016) 1555-1567.
- [110] E. Dikomey, J. Dahm-Daphi, I. Brammer, R. Martensen, B. Kaina, Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines, *International journal of radiation biology* 73(3) (1998) 269-78.
- [111] J. Lips, B. Kaina, DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts, *Carcinogenesis* 22(4) (2001) 579-85.
- [112] P. Pfeiffer, W. Goedecke, G. Obe, Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations, *Mutagenesis* 15(4) (2000) 289-302.
- [113] J.R. Chapman, M.R. Taylor, S.J. Boulton, Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice, *Molecular cell* 47(4) (2012) 497-510.
- [114] R.D. Johnson, M. Jasin, Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells, *The EMBO journal* 19(13) (2000) 3398-407.
- [115] M. Takata, M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, S. Takeda, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *The EMBO journal* 17(18) (1998) 5497-508.
- [116] I.H. Ismail, M.J. Hendzel, The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?, *Environmental and molecular mutagenesis* 49(1) (2008) 73-82.
- [117] A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis, Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin, *Nucleic acids research* 36(17) (2008) 5678-94.
- [118] E. Markova, S. Vasilyev, I. Belyaev, 53BP1 foci as a marker of tumor cell radiosensitivity, *Neoplasma* 62(5) (2015) 770-6.
- [119] M.K. Zeman, K.A. Cimprich, Causes and consequences of replication stress, *Nature cell biology* 16(1) (2014) 2-9.
- [120] A. Aguilera, T. Garcia-Muse, Causes of genome instability, *Annual review of genetics* 47 (2013) 1-32.
- [121] J.H. Barlow, R.B. Faryabi, E. Callen, N. Wong, A. Malhowski, H.T. Chen, G. Gutierrez-Cruz, H.W. Sun, P. McKinnon, G. Wright, R. Casellas, D.F. Robbiani, L. Staudt, O. Fernandez-Capetillo, A. Nussenzweig, Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability, *Cell* 152(3) (2013) 620-32.
- [122] A. Franchitto, Genome instability at common fragile sites: searching for the cause of their instability, *BioMed research international* 2013 (2013) 730714.
- [123] A. Letessier, G.A. Millot, S. Koundrioukoff, A.M. Lachages, N. Vogt, R.S. Hansen, B. Malfoy, O. Brison, M. Debatisse, Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site, *Nature* 470(7332) (2011) 120-3.
- [124] R. Itzykson, P. Fenaux, E. Solary, Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative?, *Best practice & research. Clinical haematology* 26(4) (2013) 387-400.
- [125] K. Madaan, D. Kaushik, T. Verma, Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy, *Expert review of anticancer therapy* 12(1) (2012) 19-29.
- [126] R. Hehlmann, U. Berger, M. Pfirrmann, A. Hochhaus, G. Metzgeroth, O. Maywald, J. Hasford, A. Reiter, D.K. Hossfeld, H.J. Kolb, H. Löffler, H. Pralle, W. Queisser, M. Griesshammer, C. Nerl, R. Kuse, A. Tobler, H. Eimermacher, A. Tichelli, C. Aul, M. Wilhelm, J.T. Fischer, M. Perker, C. Scheid, M. Schenk, J. Weiss, C.R. Meier, S. Kremers, L. Labeledzki, T. Schmeiser, H.P. Lohrmann, H. Heimpel, Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea, *Leukemia* 17(8) (2003) 1529-37.

- [127] K. Schlacher, N. Christ, N. Siaud, A. Egashira, H. Wu, M. Jasin, Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11, *Cell* 145(4) (2011) 529-42.
- [128] L.I. Toledo, M. Altmeyer, M.B. Rask, C. Lukas, D.H. Larsen, L.K. Povlsen, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, J. Bartek, J. Lukas, ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA, *Cell* 155(5) (2013) 1088-103.
- [129] E. Petermann, M.L. Orta, N. Issaeva, N. Schultz, T. Helleday, Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair, *Molecular cell* 37(4) (2010) 492-502.
- [130] M. Dobbelstein, C.S. Sorensen, Exploiting replicative stress to treat cancer, *Nature reviews. Drug discovery* 14(6) (2015) 405-23.
- [131] T. Nikolova, W.P. Roos, O.H. Kramer, H.M. Strik, B. Kaina, Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling, *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1868(1) (2017) 29-39.
- [132] A. Goder, C. Emmerich, T. Nikolova, N. Kiweler, M. Schreiber, T. Kuhl, D. Imhof, M. Christmann, T. Heinzl, G. Schneider, O.H. Kramer, HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130, *Nature communications* 9(1) (2018) 764.
- [133] K. Savitsky, A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D.A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S.R. Patanjali, A. Simmons, G.A. Clines, A. Sartieli, R.A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M.F. Lavin, N.G. Jaspers, A.M. Taylor, C.F. Arlett, T. Miki, S.M. Weissman, M. Lovett, F.S. Collins, Y. Shiloh, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science (New York, N.Y.)* 268(5218) (1995) 1749-53.
- [134] G.C. Smith, N. Divecha, N.D. Lakin, S.P. Jackson, DNA-dependent protein kinase and related proteins, *Biochemical Society symposium* 64 (1999) 91-104.
- [135] Y. Shiloh, ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, *Nature reviews. Cancer* 3(3) (2003) 155-68.
- [136] K.O. Hartley, D. Gell, G.C. Smith, H. Zhang, N. Divecha, M.A. Connelly, A. Admon, S.P. Lees-Miller, C.W. Anderson, S.P. Jackson, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product, *Cell* 82(5) (1995) 849-56.
- [137] D. Durocher, S.P. Jackson, DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?, *Current opinion in cell biology* 13(2) (2001) 225-31.
- [138] C.J. Bakkenist, M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature* 421(6922) (2003) 499-506.
- [139] I.M. Ward, J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, *The Journal of biological chemistry* 276(51) (2001) 47759-62.
- [140] K.D. Brown, A. Rathi, R. Kamath, D.I. Beardsley, Q. Zhan, J.L. Mannino, R. Baskaran, The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation, *Nature genetics* 33(1) (2003) 80-4.
- [141] C.E. Canman, D.S. Lim, K.A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan, J.D. Siliciano, Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science (New York, N.Y.)* 281(5383) (1998) 1677-9.
- [142] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *The Journal of biological chemistry* 276(45) (2001) 42462-7.
- [143] S. Matsuoka, G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai, S.J. Elledge, Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19) (2000) 10389-94.
- [144] V. Costanzo, D. Shechter, P.J. Lupardus, K.A. Cimprich, M. Gottesman, J. Gautier, An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication, *Molecular cell* 11(1) (2003) 203-13.
- [145] L. Zou, S.J. Elledge, Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes, *Science (New York, N.Y.)* 300(5625) (2003) 1542-8.
- [146] S. Ruiz, C. Mayor-Ruiz, V. Lafarga, M. Murga, M. Vega-Sendino, S. Ortega, O. Fernandez-Capetillo, A Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors, *Molecular cell* 62(2) (2016) 307-313.
- [147] M.P. Stokes, R. Van Hatten, H.D. Lindsay, W.M. Michael, DNA replication is required for the checkpoint response to damaged DNA in *Xenopus* egg extracts, *The Journal of cell biology* 158(5) (2002) 863-72.
- [148] E. Fanning, V. Klimovich, A.R. Nager, A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways, *Nucleic acids research* 34(15) (2006) 4126-37.
- [149] K.A. Cimprich, D. Cortez, ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(8) (2008) 616-27.
- [150] Z. Guo, A. Kumagai, S.X. Wang, W.G. Dunphy, Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts, *Genes & development* 14(21) (2000) 2745-56.
- [151] Q. Liu, S. Guntuku, X.S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, S. Carattini-Rivera, F. DeMayo, A. Bradley, L.A. Donehower, S.J. Elledge, Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint, *Genes & development* 14(12) (2000) 1448-59.
- [152] V.A. Smits, D.O. Warmerdam, Y. Martin, R. Freire, Mechanisms of ATR-mediated checkpoint signalling, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 15 (2010) 840-53.

- [153] H. Zhao, H. Piwnicka-Worms, ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1, *Mol Cell Biol* 21(13) (2001) 4129-39.
- [154] K.A. Nyberg, R.J. Michelson, C.W. Putnam, T.A. Weinert, Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints, *Annual review of genetics* 36 (2002) 617-56.
- [155] H.L. Ball, M.R. Ehrhardt, D.A. Mordes, G.G. Glick, W.J. Chazin, D. Cortez, Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins, *Mol Cell Biol* 27(9) (2007) 3367-77.
- [156] S. Liu, B. Shiotani, M. Lahiri, A. Marechal, A. Tse, C.C. Leung, J.N. Glover, X.H. Yang, L. Zou, ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation, *Molecular cell* 43(2) (2011) 192-202.
- [157] W.M. Michael, R. Ott, E. Fanning, J. Newport, Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase, *Science (New York, N.Y.)* 289(5487) (2000) 2133-7.
- [158] T.S. Byun, M. Pacek, M.C. Yee, J.C. Walter, K.A. Cimprich, Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint, *Genes & development* 19(9) (2005) 1040-52.
- [159] C.A. MacDougall, T.S. Byun, C. Van, M.C. Yee, K.A. Cimprich, The structural determinants of checkpoint activation, *Genes & development* 21(8) (2007) 898-903.
- [160] D. Cortez, S. Guntuku, J. Qin, S.J. Elledge, ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling, *Science (New York, N.Y.)* 294(5547) (2001) 1713-6.
- [161] V.P. Bermudez, L.A. Lindsey-Boltz, A.J. Cesare, Y. Maniwa, J.D. Griffith, J. Hurwitz, A. Sancar, Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4) (2003) 1633-8.
- [162] E.R. Parrilla-Castellar, S.J. Arlander, L. Karnitz, Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex, *DNA repair* 3(8-9) (2004) 1009-14.
- [163] S. Delacroix, J.M. Wagner, M. Kobayashi, K. Yamamoto, L.M. Karnitz, The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1, *Genes & development* 21(12) (2007) 1472-7.
- [164] Y. Takeishi, E. Ohashi, K. Ogawa, H. Masai, C. Obuse, T. Tsurimoto, Casein kinase 2-dependent phosphorylation of human Rad9 mediates the interaction between human Rad9-Hus1-Rad1 complex and TopBP1, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 15(7) (2010) 761-71.
- [165] A. Kumagai, J. Lee, H.Y. Yoo, W.G. Dunphy, TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex, *Cell* 124(5) (2006) 943-55.
- [166] J. Lee, A. Kumagai, W.G. Dunphy, The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR, *The Journal of biological chemistry* 282(38) (2007) 28036-44.
- [167] K. Beishline, J. Azizkhan-Clifford, Interplay between the cell cycle and double-strand break response in mammalian cells, *Methods in molecular biology* 1170 (2014) 41-59.
- [168] D. Shechter, V. Costanzo, J. Gautier, ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing, *Nature cell biology* 6(7) (2004) 648-55.
- [169] A. Maya-Mendoza, E. Petermann, D.A. Gillespie, K.W. Caldecott, D.A. Jackson, Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase, *The EMBO journal* 26(11) (2007) 2719-31.
- [170] K. Shirahige, Y. Hori, K. Shiraishi, M. Yamashita, K. Takahashi, C. Obuse, T. Tsurimoto, H. Yoshikawa, Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression, *Nature* 395(6702) (1998) 618-21.
- [171] G.K. Alderton, H. Joenje, R. Varon, A.D. Borglum, P.A. Jeggo, M. O'Driscoll, Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway, *Human molecular genetics* 13(24) (2004) 3127-38.
- [172] C.F. Chen, R. Ruiz-Vega, P. Vasudeva, F. Espitia, T.B. Krasieva, S. de Feraudy, B.J. Tromberg, S. Huang, C.P. Garner, J. Wu, D.S. Hoon, A.K. Ganesan, ATR Mutations Promote the Growth of Melanoma Tumors by Modulating the Immune Microenvironment, *Cell reports* 18(10) (2017) 2331-2342.
- [173] A.M. Casper, P. Nghiem, M.F. Arlt, T.W. Glover, ATR regulates fragile site stability, *Cell* 111(6) (2002) 779-89.
- [174] R.L. Ragland, M.F. Arlt, E.D. Hughes, T.L. Saunders, T.W. Glover, Mice hypomorphic for Atr have increased DNA damage and abnormal checkpoint response, *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 20(6) (2009) 375-85.
- [175] J. Campisi, F. d'Adda di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(9) (2007) 729-40.
- [176] F. d'Adda di Fagagna, Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response, *Nature reviews. Cancer* 8(7) (2008) 512-22.
- [177] E.J. Brown, D. Baltimore, ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality, *Genes & development* 14(4) (2000) 397-402.
- [178] A.J. Lopez-Contreras, J. Specks, J.H. Barlow, C. Ambrogio, C. Desler, S. Vikingsson, S. Rodrigo-Perez, H. Green, L.J. Rasmussen, M. Murga, A. Nussenzweig, O. Fernandez-Capetillo, Increased Rrm2 gene dosage reduces fragile site breakage and prolongs survival of ATR mutant mice, *Genes & development* 29(7) (2015) 690-5.
- [179] E. Lecona, O. Fernandez-Capetillo, Targeting ATR in cancer, *Nature reviews. Cancer* 18(9) (2018) 586-595.
- [180] G. Chen, S.S. Yuan, W. Liu, Y. Xu, K. Trujillo, B. Song, F. Cong, S.P. Goff, Y. Wu, R. Arlinghaus, D. Baltimore, P.J. Gasser, M.S. Park, P. Sung, E.Y. Lee, Radiation-induced assembly of Rad51 and

- Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl, *The Journal of biological chemistry* 274(18) (1999) 12748-52.
- [181] M. Gatei, D. Young, K.M. Cerosaletti, A. Desai-Mehta, K. Spring, S. Kozlov, M.F. Lavin, R.A. Gatti, P. Concannon, K. Khanna, ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure, *Nature genetics* 25(1) (2000) 115-9.
- [182] D.S. Lim, S.T. Kim, B. Xu, R.S. Maser, J. Lin, J.H. Petrini, M.B. Kastan, ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway, *Nature* 404(6778) (2000) 613-7.
- [183] S. Shangary, K.D. Brown, A.W. Adamson, S. Edmonson, B. Ng, T.K. Pandita, J. Yalowich, G.E. Taccioli, R. Baskaran, Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process, *The Journal of biological chemistry* 275(39) (2000) 30163-8.
- [184] B. Xu, A.H. O'Donnell, S.T. Kim, M.B. Kastan, Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation, *Cancer research* 62(16) (2002) 4588-91.
- [185] S. Kharbanda, P. Pandey, S. Jin, S. Inoue, A. Bharti, Z.M. Yuan, R. Weichselbaum, D. Weaver, D. Kufe, Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage, *Nature* 386(6626) (1997) 732-5.
- [186] S. Kharbanda, Z.M. Yuan, R. Weichselbaum, D. Kufe, Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage, *Oncogene* 17(25) (1998) 3309-18.
- [187] S. Matt, T.G. Hofmann, The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(15) (2016) 2829-50.
- [188] J. Falck, J. Coates, S.P. Jackson, Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage, *Nature* 434(7033) (2005) 605-11.
- [189] S. Matsuoka, B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, S.J. Elledge, ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage, *Science (New York, N.Y.)* 316(5828) (2007) 1160-6.
- [190] T. Stiff, S.A. Walker, K. Cerosaletti, A.A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll, P.A. Jeggo, ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling, *The EMBO journal* 25(24) (2006) 5775-82.
- [191] A. Jazayeri, J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, G.C. Smith, J. Lukas, S.P. Jackson, ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks, *Nature cell biology* 8(1) (2006) 37-45.
- [192] M. Goldberg, M. Stucki, J. Falck, D. D'Amours, D. Rahman, D. Pappin, J. Bartek, S.P. Jackson, MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint, *Nature* 421(6926) (2003) 952-6.
- [193] G.S. Stewart, B. Wang, C.R. Bignell, A.M. Taylor, S.J. Elledge, MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint, *Nature* 421(6926) (2003) 961-6.
- [194] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 461(7267) (2009) 1071-8.
- [195] S. Negrini, V.G. Gorgoulis, T.D. Halazonetis, Genomic instability--an evolving hallmark of cancer, *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(3) (2010) 220-8.
- [196] M.A. Dawson, T. Kouzarides, B.J. Huntly, Targeting epigenetic readers in cancer, *The New England journal of medicine* 367(7) (2012) 647-57.
- [197] F. Gong, K.M. Miller, Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation, *Mutation research* 750(1-2) (2013) 23-30.
- [198] K. Jacquet, A. Fradet-Turcotte, N. Avvakumov, J.P. Lambert, C. Roques, R.K. Pandita, E. Paquet, P. Herst, A.C. Gingras, T.K. Pandita, G. Legube, Y. Doyon, D. Durocher, J. Cote, The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation, *Molecular cell* 62(3) (2016) 409-421.
- [199] K.M. Miller, J.V. Tjeertes, J. Coates, G. Legube, S.E. Polo, S. Britton, S.P. Jackson, Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining, *Nature structural & molecular biology* 17(9) (2010) 1144-51.
- [200] C. Blattmann, S. Oertel, V. Ehemann, M. Thiemann, P.E. Huber, M. Bischof, O. Witt, H.E. Deubzer, A.E. Kulozik, J. Debus, K.J. Weber, Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition, *International journal of radiation oncology, biology, physics* 78(1) (2010) 237-45.
- [201] X. Chen, P. Wong, E.H. Radany, J.M. Stark, C. Laulier, J.Y. Wong, Suberoylanilide hydroxamic acid as a radiosensitizer through modulation of RAD51 protein and inhibition of homology-directed repair in multiple myeloma, *Molecular cancer research : MCR* 10(8) (2012) 1052-64.
- [202] X. Chen, E.H. Radany, P. Wong, S. Ma, K. Wu, B. Wang, J.Y. Wong, Suberoylanilide hydroxamic acid induces hypersensitivity to radiation therapy in acute myelogenous leukemia cells expressing constitutively active FLT3 mutants, *PloS one* 8(12) (2013) e84515.
- [203] P. Chinnaiyan, G. Vallabhaneni, E. Armstrong, S.M. Huang, P.M. Harari, Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition, *International journal of radiation oncology, biology, physics* 62(1) (2005) 223-9.
- [204] A. Munshi, J.F. Kurland, T. Nishikawa, T. Tanaka, M.L. Hobbs, S.L. Tucker, S. Ismail, C. Stevens, R.E. Meyn, Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair

- activity, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(13) (2005) 4912-22.
- [205] F. Gong, L.Y. Chiu, K.M. Miller, Acetylation Reader Proteins: Linking Acetylation Signaling to Genome Maintenance and Cancer, *PLoS genetics* 12(9) (2016) e1006272.
- [206] J.H. Lee, M.L. Choy, L. Ngo, S.S. Foster, P.A. Marks, Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(33) (2010) 14639-44.
- [207] A. Munshi, T. Tanaka, M.L. Hobbs, S.L. Tucker, V.M. Richon, R.E. Meyn, Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci, *Molecular cancer therapeutics* 5(8) (2006) 1967-74.
- [208] A.J. Wilson, A.S. Lalani, E. Wass, J. Saskowski, D. Khabele, Romidepsin (FK228) combined with cisplatin stimulates DNA damage-induced cell death in ovarian cancer, *Gynecologic oncology* 127(3) (2012) 579-86.
- [209] Y. Zhang, M. Adachi, H. Zou, M. Hareyama, K. Imai, Y. Shinomura, Histone deacetylase inhibitors enhance phosphorylation of histone H2AX after ionizing radiation, *International journal of radiation oncology, biology, physics* 65(3) (2006) 859-66.
- [210] S.F. Lin, J.D. Lin, T.C. Chou, Y.Y. Huang, R.J. Wong, Utility of a histone deacetylase inhibitor (PXD101) for thyroid cancer treatment, *PLoS one* 8(10) (2013) e77684.
- [211] M.J. Kim, J.S. Lee, S.E. Park, H.J. Yi, I.G. Jeong, J.S. Kang, J. Yun, J.Y. Lee, S. Ro, J.S. Lee, E.K. Choi, J.J. Hwang, C.S. Kim, Combination treatment of renal cell carcinoma with belinostat and 5-fluorouracil: a role for oxidative stress induced DNA damage and HSP90 regulated thymidine synthase, *The Journal of urology* 193(5) (2015) 1660-8.
- [212] L. Geng, K.C. Cuneo, A. Fu, T. Tu, P.W. Atadja, D.E. Hallahan, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer, *Cancer research* 66(23) (2006) 11298-304.
- [213] B. Groselj, M. Kerr, A.E. Kiltie, Radiosensitisation of bladder cancer cells by panobinostat is modulated by Ku80 expression, *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108(3) (2013) 429-33.
- [214] C. Xie, C. Drenberg, H. Edwards, J.T. Caldwell, W. Chen, H. Inaba, X. Xu, S.A. Buck, J.W. Taub, S.D. Baker, Y. Ge, Panobinostat enhances cytarabine and daunorubicin sensitivities in AML cells through suppressing the expression of BRCA1, CHK1, and Rad51, *PLoS one* 8(11) (2013) e79106.
- [215] S. Rundle, A. Bradbury, Y. Drew, N.J. Curtin, Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy, *Cancers* 9(5) (2017).
- [216] E.J. Brown, D. Baltimore, Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance, *Genes & development* 17(5) (2003) 615-28.
- [217] A. de Klein, M. Muijtjens, R. van Os, Y. Verhoeven, B. Smit, A.M. Carr, A.R. Lehmann, J.H. Hoeijmakers, Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice, *Current biology : CB* 10(8) (2000) 479-82.
- [218] M. Reimann, C. Loddenkemper, C. Rudolph, I. Schildhauer, B. Teichmann, H. Stein, B. Schlegelberger, B. Dorken, C.A. Schmitt, The Myc-evoked DNA damage response accounts for treatment resistance in primary lymphomas in vivo, *Blood* 110(8) (2007) 2996-3004.
- [219] M. Nieborowska-Skorska, T. Stoklosa, M. Datta, A. Czechowska, L. Rink, A. Slupianek, M. Koptyra, I. Seferynska, K. Krszyna, J. Blasiak, T. Skorski, ATR-Chk1 axis protects BCR/ABL leukemia cells from the lethal effect of DNA double-strand breaks, *Cell cycle* 5(9) (2006) 994-1000.
- [220] A. Ghelli Luserna di Rora, I. Iacobucci, G. Martinelli, The cell cycle checkpoint inhibitors in the treatment of leukemias, *Journal of hematology & oncology* 10(1) (2017) 77.
- [221] T.J. Ley, C. Miller, L. Ding, B.J. Raphael, A.J. Mungall, A. Robertson, K. Hoadley, T.J. Triche, Jr., P.W. Laird, J.D. Baty, L.L. Fulton, R. Fulton, S.E. Heath, J. Kalicki-veizer, C. Kandoth, J.M. Kico, D.C. Koboldt, K.L. Kanchi, S. Kulkarni, T.L. Lamprecht, D.E. Larson, L. Lin, C. Lu, M.D. McLellan, J.F. McMichael, J. Payton, H. Schmidt, D.H. Spencer, M.H. Tomasson, J.W. Wallis, L.D. Wartman, M.A. Watson, J. Welch, M.C. Wendl, A. Ally, M. Balasundaram, I. Birol, Y. Butterfield, R. Chiu, A. Chu, E. Chuah, H.J. Chun, R. Corbett, N. Dhalla, R. Guin, A. He, C. Hirst, M. Hirst, R.A. Holt, S. Jones, A. Karsan, D. Lee, H.I. Li, M.A. Marra, M. Mayo, R.A. Moore, K. Mungall, J. Parker, E. Pleasance, P. Plettner, J. Schein, D. Stoll, L. Swanson, A. Tam, N. Thiessen, R. Varhol, N. Wye, Y. Zhao, S. Gabriel, G. Getz, C. Sougnez, L. Zou, M.D. Leiserson, F. Vandin, H.T. Wu, F. Applebaum, S.B. Baylin, R. Akbani, B.M. Broom, K. Chen, T.C. Motter, K. Nguyen, J.N. Weinstein, N. Zhang, M.L. Ferguson, C. Adams, A. Black, J. Bowen, J. Gastier-Foster, T. Grossman, T. Lichtenberg, L. Wise, T. Davidsen, J.A. Demchok, K.R. Shaw, M. Sheth, H.J. Sofia, L. Yang, J.R. Downing, G. Eley, Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia, *The New England journal of medicine* 368(22) (2013) 2059-74.
- [222] J.V. Melo, A. Kumberova, A.G. van Dijk, J.M. Goldman, M.R. Yuille, Investigation on the role of the ATM gene in chronic myeloid leukaemia, *Leukemia* 15(9) (2001) 1448-50.
- [223] J.D. Charrier, S.J. Durrant, J.M. Golec, D.P. Kay, R.M. Knegtel, S. MacCormick, M. Mortimore, M.E. O'Donnell, J.L. Pinder, P.M. Reaper, A.P. Rutherford, P.S. Wang, S.C. Young, J.R. Pollard, Discovery of potent and selective inhibitors of ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase as potential anticancer agents, *Journal of medicinal chemistry* 54(7) (2011) 2320-30.

- [224] B. Salovska, I. Fabrik, K. Durisova, M. Link, J. Vavrova, M. Rezacova, A. Tichy, Radiosensitization of human leukemic HL-60 cells by ATR kinase inhibitor (VE-821): phosphoproteomic analysis, *International journal of molecular sciences* 15(7) (2014) 12007-26.
- [225] E. Fokas, R. Prevo, J.R. Pollard, P.M. Reaper, P.A. Charlton, B. Cornelissen, K.A. Vallis, E.M. Hammond, M.M. Olcina, W. Gillies McKenna, R.J. Muschel, T.B. Brunner, Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation, *Cell death & disease* 3 (2012) e441.
- [226] R. Prevo, E. Fokas, P.M. Reaper, P.A. Charlton, J.R. Pollard, W.G. McKenna, R.J. Muschel, T.B. Brunner, The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy, *Cancer biology & therapy* 13(11) (2012) 1072-81.
- [227] R. Josse, S.E. Martin, R. Guha, P. Ormanoglu, T.D. Pfister, P.M. Reaper, C.S. Barnes, J. Jones, P. Charlton, J.R. Pollard, J. Morris, J.H. Doroshow, Y. Pommier, ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses, *Cancer research* 74(23) (2014) 6968-79.
- [228] A.I. Daud, M.T. Ashworth, J. Strosberg, J.W. Goldman, D. Mendelson, G. Springett, A.P. Venook, S. Loechner, L.S. Rosen, F. Shanahan, D. Parry, S. Shumway, J.A. Grabowsky, T. Freshwater, C. Sorge, S.P. Kang, R. Isaacs, P.N. Munster, Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(9) (2015) 1060-6.
- [229] C.G. Engelke, L.A. Parsels, Y. Qian, Q. Zhang, D. Karnak, J.R. Robertson, D.M. Tanska, D. Wei, M.A. Davis, J.D. Parsels, L. Zhao, J.K. Greenson, T.S. Lawrence, J. Maybaum, M.A. Morgan, Sensitization of pancreatic cancer to chemoradiation by the Chk1 inhibitor MK8776, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(16) (2013) 4412-21.
- [230] S. Grabauskiene, E.J. Bergeron, G. Chen, A.C. Chang, J. Lin, D.G. Thomas, T.J. Giordano, D.G. Beer, M.A. Morgan, R.M. Reddy, CHK1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by CHK1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells, *Lung cancer* 82(3) (2013) 477-84.
- [231] Y. Dai, S. Chen, M. Kmiecik, L. Zhou, H. Lin, X.Y. Pei, S. Grant, The novel Chk1 inhibitor MK-8776 sensitizes human leukemia cells to HDAC inhibitors by targeting the intra-S checkpoint and DNA replication and repair, *Molecular cancer therapeutics* 12(6) (2013) 878-89.
- [232] K.A. Schafer, The cell cycle: a review, *Veterinary pathology* 35(6) (1998) 461-78.
- [233] R.A. El-Aouar Filho, A. Nicolas, T.L. De Paula Castro, M. Deplanche, V.A. De Carvalho Azevedo, P.L. Goossens, F. Taieb, G. Lina, Y. Le Loir, N. Berkova, Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections, *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7 (2017) 208.
- [234] M. Donzelli, G.F. Draetta, Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation, *EMBO reports* 4(7) (2003) 671-7.
- [235] B.B. Zhou, S.J. Elledge, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective, *Nature* 408(6811) (2000) 433-9.
- [236] W.P. Roos, B. Kaina, DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends in molecular medicine* 12(9) (2006) 440-50.
- [237] M. Raff, Cell suicide for beginners, *Nature* 396(6707) (1998) 119-22.
- [238] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer* 26(4) (1972) 239-57.
- [239] J.C. Reed, Dysregulation of apoptosis in cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17(9) (1999) 2941-53.
- [240] W.P. Roos, B. Kaina, DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis, *Cancer letters* 332(2) (2013) 237-48.
- [241] R.T. Allen, M.W. Cluck, D.K. Agrawal, Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54(5) (1998) 427-45.
- [242] G. Hacker, A. Weber, BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?, *Archives of biochemistry and biophysics* 462(2) (2007) 150-5.
- [243] S. Inoue, R. Walewska, M.J. Dyer, G.M. Cohen, Downregulation of Mcl-1 potentiates HDACi-mediated apoptosis in leukemic cells, *Leukemia* 22(4) (2008) 819-25.
- [244] D.C. Huang, A. Strasser, BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death, *Cell* 103(6) (2000) 839-42.
- [245] V. Labi, M. Erlacher, S. Kiessling, A. Villunger, BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy, *Cell death and differentiation* 13(8) (2006) 1325-38.
- [246] O. Kepp, K. Rajalingam, S. Kimmig, T. Rudel, Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis, *The EMBO journal* 26(3) (2007) 825-34.
- [247] D. Acehan, X. Jiang, D.G. Morgan, J.E. Heuser, X. Wang, C.W. Akey, Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Molecular cell* 9(2) (2002) 423-32.
- [248] C. Pop, J. Timmer, S. Sperandio, G.S. Salvesen, The apoptosome activates caspase-9 by dimerization, *Molecular cell* 22(2) (2006) 269-75.
- [249] S.M. Srinivasula, M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, E.S. Alnemri, Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Molecular cell* 1(7) (1998) 949-57.

- [250] P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, X. Wang, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91(4) (1997) 479-89.
- [251] L. Ravagnan, T. Roumier, G. Kroemer, Mitochondria, the killer organelles and their weapons, *Journal of cellular physiology* 192(2) (2002) 131-7.
- [252] X. Saelens, N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. van Loo, P. Vandenabeele, Toxic proteins released from mitochondria in cell death, *Oncogene* 23(16) (2004) 2861-74.
- [253] S.M. Srinivasula, P. Datta, X.J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang, E.S. Alnemri, Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway, *The Journal of biological chemistry* 275(46) (2000) 36152-7.
- [254] D.C. Altieri, Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery, *Nature reviews. Cancer* 8(1) (2008) 61-70.
- [255] A.M. Hunter, E.C. LaCasse, R.G. Korneluk, The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12(9) (2007) 1543-68.
- [256] A.D. Schimmer, Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice, *Cancer research* 64(20) (2004) 7183-90.
- [257] H.K. Lorenzo, S.A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer, Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death, *Cell death and differentiation* 6(6) (1999) 516-24.
- [258] L.Y. Li, X. Luo, X. Wang, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature* 412(6842) (2001) 95-9.
- [259] Z.N. Oltvai, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell* 74(4) (1993) 609-19.
- [260] M. Nomura, S. Shimizu, T. Ito, M. Narita, H. Matsuda, Y. Tsujimoto, Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2, *Cancer research* 59(21) (1999) 5542-8.
- [261] S.N. Willis, L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J.I. Fletcher, J.M. Adams, D.C. Huang, Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes & development* 19(11) (2005) 1294-305.
- [262] D.R. Premkumar, E.P. Jane, N.R. Agostino, J.D. DiDomenico, I.F. Pollack, Bortezomib-induced sensitization of malignant human glioma cells to vorinostat-induced apoptosis depends on reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction, Noxa upregulation, Mcl-1 cleavage, and DNA damage, *Molecular carcinogenesis* 52(2) (2013) 118-33.
- [263] L. Chen, S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, J.M. Adams, D.C. Huang, Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Molecular cell* 17(3) (2005) 393-403.
- [264] T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 414(6859) (2001) 105-11.
- [265] S. Derenne, B. Monia, N.M. Dean, J.K. Taylor, M.J. Rapp, J.L. Harousseau, R. Bataille, M. Amiot, Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells, *Blood* 100(1) (2002) 194-9.
- [266] B.Z. Carter, M. Milella, T. Tsao, T. McQueen, W.D. Schober, W. Hu, N.M. Dean, L. Steelman, J.A. McCubrey, M. Andreeff, Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia, *Leukemia* 17(11) (2003) 2081-9.
- [267] J.C. Wilkinson, E. Cepero, L.H. Boise, C.S. Duckett, Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis, *Mol Cell Biol* 24(16) (2004) 7003-14.
- [268] I. Tamm, S. Richter, D. Oltersdorf, U. Creutzig, J. Harbott, F. Scholz, L. Karawajew, W.D. Ludwig, C. Wuchter, High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(11) (2004) 3737-44.
- [269] J. Grooten, V. Goossens, B. Vanhaesebroeck, W. Fiers, Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity, *Cytokine* 5(6) (1993) 546-55.
- [270] S.L. Fink, B.T. Cookson, Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infection and immunity* 73(4) (2005) 1907-16.
- [271] P. Golstein, G. Kroemer, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends in biochemical sciences* 32(1) (2007) 37-43.
- [272] N. Festjens, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response, *Biochimica et biophysica acta* 1757(9-10) (2006) 1371-87.
- [273] N. Mizushima, Autophagy in protein and organelle turnover, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76 (2011) 397-402.
- [274] P. Boya, F. Reggiori, P. Codogno, Emerging regulation and functions of autophagy, *Nature cell biology* 15(7) (2013) 713-20.
- [275] A.M. Cuervo, E. Wong, Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging, *Cell research* 24(1) (2014) 92-104.
- [276] B. Ravikumar, S. Sarkar, J.E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z.W. Green-Thompson, M. Jimenez-Sanchez, V.I. Korolchuk, M. Lichtenberg, S. Luo, D.C. Massey, F.M. Menzies, K. Moreau, U. Narayanan, M. Renna, F.H. Siddiqi, B.R. Underwood, A.R. Winslow, D.C. Rubinsztein, Regulation of

- mammalian autophagy in physiology and pathophysiology, *Physiological reviews* 90(4) (2010) 1383-435.
- [277] E. White, Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer, *Nature reviews. Cancer* 12(6) (2012) 401-10.
- [278] T. Sanli, G.R. Steinberg, G. Singh, T. Tsakiridis, AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway, *Cancer biology & therapy* 15(2) (2014) 156-69.
- [279] E.Y. Chan, S. Kir, S.A. Tooze, siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy, *The Journal of biological chemistry* 282(35) (2007) 25464-74.
- [280] K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, Y. Ohsumi, The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation, *The EMBO journal* 20(21) (2001) 5971-81.
- [281] C.W. Wang, D.J. Klionsky, The molecular mechanism of autophagy, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 9(3-4) (2003) 65-76.
- [282] M. Tsukada, Y. Ohsumi, Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS letters* 333(1-2) (1993) 169-74.
- [283] K. Nakahira, A.M. Choi, Autophagy: a potential therapeutic target in lung diseases, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305(2) (2013) L93-107.
- [284] B. Levine, V. Deretic, Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity, *Nature reviews. Immunology* 7(10) (2007) 767-77.
- [285] C.H. Jung, S.H. Ro, J. Cao, N.M. Otto, D.H. Kim, mTOR regulation of autophagy, *FEBS letters* 584(7) (2010) 1287-95.
- [286] S.A. Tooze, T. Yoshimori, The origin of the autophagosomal membrane, *Nature cell biology* 12(9) (2010) 831-5.
- [287] Y.P. Yang, Z.Q. Liang, Z.L. Gu, Z.H. Qin, Molecular mechanism and regulation of autophagy, *Acta pharmacologica Sinica* 26(12) (2005) 1421-34.
- [288] Z.J. Yang, C.E. Chee, S. Huang, F.A. Sinicrope, The role of autophagy in cancer: therapeutic implications, *Molecular cancer therapeutics* 10(9) (2011) 1533-41.
- [289] N. Mizushima, M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell* 147(4) (2011) 728-41.
- [290] N. Mizushima, Autophagy: process and function, *Genes & development* 21(22) (2007) 2861-73.
- [291] M. Komatsu, S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, *Cell* 131(6) (2007) 1149-63.
- [292] T. Lamark, V. Kirkin, I. Dikic, T. Johansen, NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets, *Cell cycle* 8(13) (2009) 1986-90.
- [293] A. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, Y. Tashiro, Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells, *Cell structure and function* 23(1) (1998) 33-42.
- [294] R. Mathew, S. Kongara, B. Beaudoin, C.M. Karp, K. Bray, K. Degenhardt, G. Chen, S. Jin, E. White, Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability, *Genes Dev* 21(11) (2007) 1367-81.
- [295] R. Mathew, C.M. Karp, B. Beaudoin, N. Vuong, G. Chen, H.Y. Chen, K. Bray, A. Reddy, G. Bhanot, C. Gelinas, R.S. Dipaola, V. Karantza-Wadsworth, E. White, Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62, *Cell* 137(6) (2009) 1062-75.
- [296] A. Takamura, M. Komatsu, T. Hara, A. Sakamoto, C. Kishi, S. Waguri, Y. Eishi, O. Hino, K. Tanaka, N. Mizushima, Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors, *Genes Dev* 25(8) (2011) 795-800.
- [297] S. Yang, X. Wang, G. Contino, M. Liesa, E. Sahin, H. Ying, A. Bause, Y. Li, J.M. Stommel, G. Dell'antonio, J. Mautner, G. Tonon, M. Haigis, O.S. Shirihai, C. Doglioni, N. Bardeesy, A.C. Kimmelman, Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth, *Genes Dev* 25(7) (2011) 717-29.
- [298] J.Y. Guo, H.Y. Chen, R. Mathew, J. Fan, A.M. Strohecker, G. Karsli-Uzunbas, J.J. Kamphorst, G. Chen, J.M. Lemons, V. Karantza, H.A. Collier, R.S. Dipaola, C. Gelinas, J.D. Rabinowitz, E. White, Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis, *Genes Dev* 25(5) (2011) 460-70.
- [299] A. Yang, N.V. Rajeshkumar, X. Wang, S. Yabuuchi, B.M. Alexander, G.C. Chu, D.D. Von Hoff, A. Maitra, A.C. Kimmelman, Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations, *Cancer Discov* 4(8) (2014) 905-13.
- [300] M. Cicchini, V. Karantza, B. Xia, Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context, *Clin Cancer Res* 21(3) (2015) 498-504.
- [301] X. Sui, R. Chen, Z. Wang, Z. Huang, N. Kong, M. Zhang, W. Han, F. Lou, J. Yang, Q. Zhang, X. Wang, C. He, H. Pan, Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment, *Cell Death Dis* 4 (2013) e838.
- [302] T. Shintani, D.J. Klionsky, Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science (New York, N.Y.)* 306(5698) (2004) 990-5.
- [303] Y.M. Kulkarni, V. Kaushik, N. Azad, C. Wright, Y. Rojanasakul, G. O'Doherty, A.K. Iyer, Autophagy-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells by a Novel Digitoxin Analog, *Journal of cellular physiology* 231(4) (2016) 817-28.

- [304] M.C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, G. Kroemer, Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(9) (2007) 741-52.
- [305] P. Czarny, E. Pawlowska, J. Bialkowska-Warzechka, K. Kaarniranta, J. Blasiak, Autophagy in DNA damage response, *International journal of molecular sciences* 16(2) (2015) 2641-62.
- [306] J.S. Carew, S.T. Nawrocki, C.N. Kahue, H. Zhang, C. Yang, L. Chung, J.A. Houghton, P. Huang, F.J. Giles, J.L. Cleveland, Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance, *Blood* 110(1) (2007) 313-22.
- [307] M.L. Torgersen, N. Engedal, S.O. Boe, P. Hokland, A. Simonsen, Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells, *Blood* 122(14) (2013) 2467-76.
- [308] O.H. Kramer, S.K. Knauer, D. Zimmermann, R.H. Stauber, T. Heinzl, Histone deacetylase inhibitors and hydroxyurea modulate the cell cycle and cooperatively induce apoptosis, *Oncogene* 27(6) (2008) 732-40.
- [309] M.V. Stankov, M. El Khatib, B. Kumar Thakur, K. Heitmann, D. Panayotova-Dimitrova, J. Schoening, J.P. Bourquin, N. Schweitzer, M. Leverkus, K. Welte, D. Reinhardt, Z. Li, S.H. Orkin, G.M. Behrens, J.H. Klusmann, Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in myeloid leukemia by suppressing autophagy, *Leukemia* 28(3) (2014) 577-88.
- [310] W. Chen, L. Zhang, K. Zhang, B. Zhou, M.L. Kuo, S. Hu, L. Chen, M. Tang, Y.R. Chen, L. Yang, D.K. Ann, Y. Yen, Reciprocal regulation of autophagy and dNTP pools in human cancer cells, *Autophagy* 10(7) (2014) 1272-84.
- [311] K.Z. Weber A, Potthoff S, Ploner C, Häcker G. , Endogenous Noxa Determines the Strong Proapoptotic Synergism of the BH3-Mimetic ABT-737 with Chemotherapeutic Agents in Human Melanoma Cells. , *Transl Oncol.* 2(2) (2009) 73-83.
- [312] M. Wirth, N. Stojanovic, J. Christian, M.C. Paul, R.H. Stauber, R.M. Schmid, G. Hacker, O.H. Kramer, D. Saur, G. Schneider, MYC and EGR1 synergize to trigger tumor cell death by controlling NOXA and BIM transcription upon treatment with the proteasome inhibitor bortezomib, *Nucleic acids research* 42(16) (2014) 10433-47.
- [313] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321-334, *Blood* 128(16) (2016) 1995.
- [314] A. Neubauer, M. He, C.A. Schmidt, D. Huhn, E.T. Liu, Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques, *Leukemia* 7(4) (1993) 593-600.
- [315] T. Blom, G. Nilsson, C. Sundstrom, K. Nilsson, L. Hellman, Characterization of a human basophil-like cell line (LAMA-84), *Scandinavian journal of immunology* 44(1) (1996) 54-61.
- [316] M. Ogura, Y. Morishima, R. Ohno, Y. Kato, N. Hirabayashi, H. Nagura, H. Saito, Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 66(6) (1985) 1384-92.
- [317] D.S. Fleckenstein, C.C. Uphoff, H.G. Drexler, H. Quentmeier, Detection of p53 gene mutations by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines, *Leukemia research* 26(2) (2002) 207-14.
- [318] I. Kubonishi, I. Miyoshi, Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis, *International journal of cell cloning* 1(2) (1983) 105-17.
- [319] S. Bi, T. Hughes, J. Bungey, A. Chase, P. de Fabritiis, J.M. Goldman, p53 in chronic myeloid leukemia cell lines, *Leukemia* 6(8) (1992) 839-42.
- [320] T. Ohkubo, T. Kamamoto, K. Kita, A. Hiraoka, Y. Yoshida, H. Uchino, A novel Ph1 chromosome positive cell line established from a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis, *Leukemia research* 9(7) (1985) 921-6.
- [321] J.M. Walker, *The protein protocols handbook.*, Springer (1996).
- [322] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259) (1970) 680-5.
- [323] G. Boeck, Current status of flow cytometry in cell and molecular biology, *International review of cytology* 204 (2001) 239-98.
- [324] L. Marx-Blumel, C. Marx, M. Kuhne, J. Sonnemann, Assessment of HDACi-Induced Cytotoxicity, *Methods in molecular biology* 1510 (2017) 23-45.
- [325] L.L. Chan, D. Shen, A.R. Wilkinson, W. Patton, N. Lai, E. Chan, D. Kuksin, B. Lin, J. Qiu, A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells, *Autophagy* 8(9) (2012) 1371-82.
- [326] A. Goder, N. Mahendrarajah, O.H. Kramer, Detection of Autophagy Induction After HDAC Inhibitor Treatment in Leukemic Cells, *Methods in molecular biology* 1510 (2017) 3-10.
- [327] E.T. Jordan, M. Collins, J. Terefe, L. Ugozzoli, T. Rubio, Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells, *Journal of biomolecular techniques : JBT* 19(5) (2008) 328-34.
- [328] B. Gopalakrishnan, J. Wolff, siRNA and DNA transfer to cultured cells, *Methods in molecular biology* 480 (2009) 31-52.
- [329] A.K. Moore JC, Yeung PL, et al. , Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. , *Stem Cell Res Ther.* ((3)) (2010) 23.
- [330] O. Ostling, K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and biophysical research communications* 123(1) (1984) 291-8.

- [331] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental cell research* 175(1) (1988) 184-91.
- [332] V.J. McKelvey-Martin, M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo, A. Collins, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review, *Mutation research* 288(1) (1993) 47-63.
- [333] T. Nikolova, F. Marini, B. Kaina, Genotoxicity testing: Comparison of the gammaH2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays, *Mutation research* 822 (2017) 10-18.
- [334] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic acids research* 32(12) (2004) e103.
- [335] S.E.a.C.S.M. Denman, Quantitative (real-time) PCR. , *Methods in gut microbial ecology for ruminants*. Springer (2005) 105-115.
- [336] E. Koeneke, O. Witt, I. Oehme, HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities, *Cells* 4(2) (2015) 135-68.
- [337] I. Oehme, J.P. Linke, B.C. Bock, T. Milde, M. Lodrini, B. Hartenstein, I. Wiegand, C. Eckert, W. Roth, M. Kool, S. Kaden, H.J. Grone, J.H. Schulte, S. Lindner, A. Hamacher-Brady, N.R. Brady, H.E. Deubzer, O. Witt, Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(28) (2013) E2592-601.
- [338] C. Park, Y. Suh, A.M. Cuervo, Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage, *Nature communications* 6 (2015) 6823.
- [339] M. Vairapandi, A.G. Balliet, B. Hoffman, D.A. Liebermann, GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress, *Journal of cellular physiology* 192(3) (2002) 327-38.
- [340] G. Morciano, C. Giorgi, D. Balestra, S. Marchi, D. Perrone, M. Pinotti, P. Pinton, Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death, *Molecular biology of the cell* 27(1) (2016) 20-34.
- [341] M. Marani, T. Tenev, D. Hancock, J. Downward, N.R. Lemoine, Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis, *Mol Cell Biol* 22(11) (2002) 3577-89.
- [342] M. Pons, C.M. Reichardt, D. Hennig, A. Nathan, N. Kiweler, C. Stocking, C. Wichmann, M. Christmann, F. Butter, S. Reichardt, G. Schneider, T. Heinzel, C. Englert, J. Hartkamp, O.H. Kramer, N. Mahendrarajah, Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells, *Archives of toxicology* 92(6) (2018) 2119-2135.
- [343] T. Nikolova, N. Kiweler, O.H. Kramer, Interstrand Crosslink Repair as a Target for HDAC Inhibition, *Trends in pharmacological sciences* 38(9) (2017) 822-836.
- [344] A. Singh, Y.J. Xu, The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea, *Genes* 7(11) (2016).
- [345] T. Nikolova, M. Dvorak, F. Jung, I. Adam, E. Kramer, A. Gerhold-Ay, B. Kaina, The gammaH2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: comparison of H2AX phosphorylation with cell death response, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 140(1) (2014) 103-17.
- [346] R. Buisson, J.L. Boisvert, C.H. Benes, L. Zou, Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase, *Molecular cell* 59(6) (2015) 1011-24.
- [347] C.S. Sorensen, R.G. Syljuasen, Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication, *Nucleic acids research* 40(2) (2012) 477-86.
- [348] L.A. Parsels, Y. Qian, D.M. Tanska, M. Gross, L. Zhao, M.C. Hassan, S. Arumugarajah, J.D. Parsels, L. Hylander-Gans, D.M. Simeone, D. Morosini, J.L. Brown, S.D. Zabrudoff, J. Maybaum, T.S. Lawrence, M.A. Morgan, Assessment of chk1 phosphorylation as a pharmacodynamic biomarker of chk1 inhibition, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(11) (2011) 3706-15.
- [349] S. Sidi, T. Sanda, R.D. Kennedy, A.T. Hagen, C.A. Jette, R. Hoffmans, J. Pascual, S. Imamura, S. Kishi, J.F. Amatrudda, J.P. Kanki, D.R. Green, A.A. D'Andrea, A.T. Look, Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3, *Cell* 133(5) (2008) 864-77.
- [350] K. Ando, J.L. Kernan, P.H. Liu, T. Sanda, E. Logette, J. Tschopp, A.T. Look, J. Wang, L. Bouchier-Hayes, S. Sidi, PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling, *Molecular cell* 47(5) (2012) 681-93.
- [351] K. Sanjiv, A. Hagenkort, J.M. Calderon-Montano, T. Koolmeister, P.M. Reaper, O. Mortusewicz, S.A. Jacques, R.V. Kuiper, N. Schultz, M. Scobie, P.A. Charlton, J.R. Pollard, U.W. Berglund, M. Altun, T. Helleday, Cancer-Specific Synthetic Lethality between ATR and CHK1 Kinase Activities, *Cell reports* 17(12) (2016) 3407-3416.
- [352] K. Valis, L. Prochazka, E. Boura, J. Chladova, T. Obsil, J. Rohlena, J. Truksa, L.F. Dong, S.J. Ralph, J. Neuzil, Hippo/Mst1 stimulates transcription of the proapoptotic mediator NOXA in a FoxO1-dependent manner, *Cancer research* 71(3) (2011) 946-54.
- [353] A. Angulo-Molina, J. Reyes-Leyva, A. Lopez-Malo, J. Hernandez, The role of alpha tocopheryl succinate (alpha-TOS) as a potential anticancer agent, *Nutrition and cancer* 66(2) (2014) 167-76.
- [354] A.G. Martin, J. Trama, D. Crighton, K.M. Ryan, H.O. Fearnhead, Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B, *Aging* 1(3) (2009) 335-49.

- [355] L. Grande, G. Bretones, M. Rosa-Garrido, E.M. Garrido-Martin, T. Hernandez, S. Fraile, L. Botella, E. de Alava, A. Vidal, X. Garcia del Muro, A. Villanueva, M.D. Delgado, J.L. Fernandez-Luna, Transcription factors Sp1 and p73 control the expression of the proapoptotic protein NOXA in the response of testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin, *The Journal of biological chemistry* 287(32) (2012) 26495-505.
- [356] N. Stojanovic, Z. Hassan, M. Wirth, P. Wenzel, M. Beyer, C. Schafer, P. Brand, A. Kroemer, R.H. Stauber, R.M. Schmid, A. Arlt, A. Sellmer, S. Mahboobi, R. Rad, M. Reichert, D. Saur, O.H. Kramer, G. Schneider, HDAC1 and HDAC2 integrate the expression of p53 mutants in pancreatic cancer, *Oncogene* 36(13) (2017) 1804-1815.
- [357] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*, CA: a cancer journal for clinicians 69(1) (2019) 7-34.
- [358] C.L. Sawyers, Molecular consequences of the BCR-ABL translocation in chronic myelogenous leukemia, *Leukemia & lymphoma* 11 Suppl 2 (1993) 101-3.
- [359] C.L. Sawyers, Chronic myeloid leukemia, *The New England journal of medicine* 340(17) (1999) 1330-40.
- [360] G.A. Horne, L. Jackson, V. Helgason, T.L. Holyoake, Stem Cell Guardians - Old and New Perspectives in LSC Biology, *Current drug targets* 18(4) (2017) 405-413.
- [361] S.A. Abraham, L.E. Hopcroft, E. Carrick, M.E. Drotar, K. Dunn, A.J. Williamson, K. Korfi, P. Baquero, L.E. Park, M.T. Scott, F. Pellicano, A. Pierce, M. Copland, C. Nourse, S.M. Grimmond, D. Vetrie, A.D. Whetton, T.L. Holyoake, Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells, *Nature* 534(7607) (2016) 341-6.
- [362] R.C. Donehower, An overview of the clinical experience with hydroxyurea, *Seminars in oncology* 19(3 Suppl 9) (1992) 11-9.
- [363] J.L. Spivak, H. Hasselbalch, Hydroxycarbamide: a user's guide for chronic myeloproliferative disorders, *Expert review of anticancer therapy* 11(3) (2011) 403-14.
- [364] J. Kim, K.H. Kim, Y.Z. Kim, The Clinical Outcome of Hydroxyurea Chemotherapy after Incomplete Resection of Atypical Meningiomas, *Brain tumor research and treatment* 5(2) (2017) 77-86.
- [365] J. Teng, S. Hejazi, L. Hiddingh, L. Carvalho, M.C. de Gooijer, H. Wakimoto, M. Barazas, M. Tannous, A.S. Chi, D.P. Noske, P. Wesseling, T. Wurdinger, T.T. Batchelor, B.A. Tannous, Recycling drug screen repurposes hydroxyurea as a sensitizer of glioblastomas to temozolomide targeting de novo DNA synthesis, irrespective of molecular subtype, *Neuro-oncology* 20(5) (2018) 642-654.
- [366] V.P. Androutsopoulos, D.A. Spandidos, Antiproliferative effects of TSA, PXD101 and MS275 in A2780 and MCF7 cells: Acetylated histone H4 and acetylated tubulin as markers for HDACi potency and selectivity, *Oncology reports* 38(6) (2017) 3412-3418.
- [367] S.J. Haggarty, K.M. Koeller, J.C. Wong, C.M. Grozinger, S.L. Schreiber, Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8) (2003) 4389-94.
- [368] R.W. Johnstone, Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, *Nature reviews. Drug discovery* 1(4) (2002) 287-99.
- [369] P.A. Marks, T. Miller, V.M. Richon, Histone deacetylases, *Current opinion in pharmacology* 3(4) (2003) 344-51.
- [370] P. Marks, R.A. Rifkind, V.M. Richon, R. Breslow, T. Miller, W.K. Kelly, Histone deacetylases and cancer: causes and therapies, *Nature reviews. Cancer* 1(3) (2001) 194-202.
- [371] P.A. Marks, V.M. Richon, R.A. Rifkind, Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells, *Journal of the National Cancer Institute* 92(15) (2000) 1210-6.
- [372] B.G. Gabrielli, R.W. Johnstone, N.A. Saunders, Identifying molecular targets mediating the anticancer activity of histone deacetylase inhibitors: a work in progress, *Current cancer drug targets* 2(4) (2002) 337-53.
- [373] R.G. Pestell, C. Albanese, A.T. Reutens, J.E. Segall, R.J. Lee, A. Arnold, The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation, *Endocrine reviews* 20(4) (1999) 501-34.
- [374] P.W. Hinds, S. Mittnacht, V. Dulic, A. Arnold, S.I. Reed, R.A. Weinberg, Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins, *Cell* 70(6) (1992) 993-1006.
- [375] E.J. Morris, N.J. Dyson, Retinoblastoma protein partners, *Advances in cancer research* 82 (2001) 1-54.
- [376] J.A. Vrana, R.H. Decker, C.R. Johnson, Z. Wang, W.D. Jarvis, V.M. Richon, M. Ehinger, P.B. Fisher, S. Grant, Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53, *Oncogene* 18(50) (1999) 7016-25.
- [377] V.M. Richon, T.W. Sandhoff, R.A. Rifkind, P.A. Marks, Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(18) (2000) 10014-9.
- [378] H. Flores-Rozas, Z. Kelman, F.B. Dean, Z.Q. Pan, J.W. Harper, S.J. Elledge, M. O'Donnell, J. Hurwitz, Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(18) (1994) 8655-9.
- [379] E. Telles, E. Seto, Modulation of cell cycle regulators by HDACs, *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 4 (2012) 831-9.

- [380] G. Zupkovitz, R. Grausenburger, R. Brunmeir, S. Senese, J. Tischler, J. Jurkin, M. Rembold, D. Meunier, G. Egger, S. Lagger, S. Chiocca, F. Propst, G. Weitzer, C. Seiser, The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation, *Mol Cell Biol* 30(5) (2010) 1171-81.
- [381] G. Lagger, D. O'Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein, C. Seiser, Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression, *The EMBO journal* 21(11) (2002) 2672-81.
- [382] R.H. Wilting, E. Yanover, M.R. Heideman, H. Jacobs, J. Horner, J. van der Torre, R.A. DePinho, J.H. Dannenberg, Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis, *The EMBO journal* 29(15) (2010) 2586-97.
- [383] A.J. Wilson, D.S. Byun, N. Popova, L.B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L.H. Augenlicht, J.M. Mariadason, Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer, *The Journal of biological chemistry* 281(19) (2006) 13548-58.
- [384] W. Huang, D. Tan, X. Wang, S. Han, J. Tan, Y. Zhao, J. Lu, B. Huang, Histone deacetylase 3 represses p15(INK4b) and p21(WAF1/cip1) transcription by interacting with Sp1, *Biochemical and biophysical research communications* 339(1) (2006) 165-71.
- [385] A. Ciccia, S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives, *Molecular cell* 40(2) (2010) 179-204.
- [386] K. Furuya, A.M. Carr, DNA checkpoints in fission yeast, *Journal of cell science* 116(Pt 19) (2003) 3847-8.
- [387] G.M. Alvino, D. Collingwood, J.M. Murphy, J. Delrow, B.J. Brewer, M.K. Raghuraman, Replication in hydroxyurea: it's a matter of time, *Mol Cell Biol* 27(18) (2007) 6396-406.
- [388] P. Zegerman, J.F. Diffley, Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation, *Nature* 467(7314) (2010) 474-8.
- [389] J. Lopez-Mosqueda, N.L. Maas, Z.O. Jonsson, L.G. Defazio-Eli, J. Wohlschlegel, D.P. Toczyski, Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing, *Nature* 467(7314) (2010) 479-83.
- [390] M.A. Marchetti, M. Weinberger, Y. Murakami, W.C. Burhans, J.A. Huberman, Production of reactive oxygen species in response to replication stress and inappropriate mitosis in fission yeast, *Journal of cell science* 119(Pt 1) (2006) 124-31.
- [391] A.M. Carr, S. Lambert, Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination, *Journal of molecular biology* 425(23) (2013) 4733-44.
- [392] T. Hirano, S. Funahashi, T. Uemura, M. Yanagida, Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cutmutants that block nuclear division but not cytokinesis, *The EMBO journal* 5(11) (1986) 2973-9.
- [393] Y. Saka, M. Yanagida, Fission yeast cut5+, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene rad4+, *Cell* 74(2) (1993) 383-93.
- [394] W.K. Sinclair, Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle, *Science (New York, N.Y.)* 150(3704) (1965) 1729-31.
- [395] O. Fernandez-Capetillo, N. Yan, J. Dionne, D. Bassett, S. Sebastian, C. Hendon, H. Schlichting, M. Baker, Hopes for the year ahead, *Nature* 517(7532) (2015) 111-3.
- [396] R.R. Rosato, S. Grant, Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality, *Expert opinion on therapeutic targets* 9(4) (2005) 809-24.
- [397] R.R. Rosato, J.A. Almenara, S.C. Maggio, P. Atadja, R. Craig, J. Vrana, P. Dent, S. Grant, Potentiation of the lethality of the histone deacetylase inhibitor LAQ824 by the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine in human leukemia cells, *Molecular cancer therapeutics* 4(11) (2005) 1772-85.
- [398] M.D. Haschka, C. Soratroi, S. Kirschnek, G. Hacker, R. Hilbe, S. Geley, A. Villunger, L.L. Fava, The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest, *Nature communications* 6 (2015) 6891.
- [399] C. Ploner, J. Rainer, S. Lobenwein, S. Geley, R. Kofler, Repression of the BH3-only molecule PMAIP1/Noxa impairs glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14(6) (2009) 821-8.
- [400] M. Certo, V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S.A. Armstrong, A. Letai, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members, *Cancer cell* 9(5) (2006) 351-65.
- [401] P. Gomez-Bougie, E. Menoret, P. Juin, C. Dousset, C. Pellat-Deceunynck, M. Amiot, Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction, *Biochemical and biophysical research communications* 413(3) (2011) 460-4.
- [402] A.R. Stankiewicz, A.M. Livingstone, N. Mohseni, D.D. Mosser, Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70, *Cell death and differentiation* 16(4) (2009) 638-47.
- [403] U. Heinicke, J. Kupka, S. Fulda, JNJ-26481585 primes rhabdomyosarcoma cells for chemotherapeutics by engaging the mitochondrial pathway of apoptosis, *Oncotarget* 6(35) (2015) 37836-51.
- [404] A.J. Souers, J.D. Levenson, E.R. Boghaert, S.L. Ackler, N.D. Catron, J. Chen, B.D. Dayton, H. Ding, S.H. Enschede, W.J. Fairbrother, D.C. Huang, S.G. Hymowitz, S. Jin, S.L. Khaw, P.J. Kovar, L.T. Lam, J. Lee, H.L. Maecker, K.C. Marsh, K.D. Mason, M.J. Mitten, P.M. Nimmer, A. Oleksijew, C.H. Park, C.M. Park, D.C. Phillips, A.W. Roberts, D. Sampath, J.F. Seymour, M.L. Smith, G.M. Sullivan, S.K.

- Tahir, C. Tse, M.D. Wendt, Y. Xiao, J.C. Xue, H. Zhang, R.A. Humerickhouse, S.H. Rosenberg, S.W. Elmore, ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets, *Nature medicine* 19(2) (2013) 202-8.
- [405] A.W. Roberts, M.S. Davids, J.M. Pagel, B.S. Kahl, S.D. Puvvada, J.F. Gerecitano, T.J. Kipps, M.A. Anderson, J.R. Brown, L. Gressick, S. Wong, M. Dunbar, M. Zhu, M.B. Desai, E. Cerri, S. Heitner Enschede, R.A. Humerickhouse, W.G. Wierda, J.F. Seymour, Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia, *The New England journal of medicine* 374(4) (2016) 311-22.
- [406] M. Baou, S.L. Kohlhaas, M. Butterworth, M. Vogler, D. Dinsdale, R. Walewska, A. Majid, E. Eldering, M.J. Dyer, G.M. Cohen, Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells, *Haematologica* 95(9) (2010) 1510-8.
- [407] K. Brinkmann, P. Zigrino, A. Witt, M. Schell, L. Ackermann, P. Broxtermann, S. Schull, M. Andree, O. Coutelle, B. Yazdanpanah, J.M. Seeger, D. Klubertz, U. Drebbler, U.T. Hacker, M. Kronke, C. Mauch, T. Hoppe, H. Kashkar, Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 potentiates cancer chemosensitivity by stabilizing NOXA, *Cell reports* 3(3) (2013) 881-91.
- [408] M.A. Dengler, A. Weilbacher, M. Gutekunst, A.M. Staiger, M.C. Vohringer, H. Horn, G. Ott, W.E. Aulitzky, H. van der Kuip, Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma, *Cell death & disease* 5 (2014) e1013.
- [409] E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, N. Tanaka, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science (New York, N.Y.)* 288(5468) (2000) 1053-8.
- [410] J.Y. Kim, H.J. Ahn, J.H. Ryu, K. Suk, J.H. Park, BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha, *The Journal of experimental medicine* 199(1) (2004) 113-24.
- [411] T. Hershko, D. Ginsberg, Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis, *The Journal of biological chemistry* 279(10) (2004) 8627-34.
- [412] M. Flinterman, L. Guelen, S. Ezzati-Nik, R. Killick, G. Melino, K. Tominaga, J.S. Mymryk, J. Gaken, M. Tavassoli, E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis, *The Journal of biological chemistry* 280(7) (2005) 5945-59.
- [413] M.N. Saha, H. Jiang, Y. Yang, D. Reece, H. Chang, PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa, *Molecular cancer therapeutics* 12(11) (2013) 2331-41.
- [414] M.A. Nikiforov, M. Riblett, W.H. Tang, V. Gratchouck, D. Zhuang, Y. Fernandez, M. Verhaegen, S. Varambally, A.M. Chinnaiyan, A.J. Jakubowiak, M.S. Soengas, Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49) (2007) 19488-93.
- [415] M.J. Ausserlechner, C. Salvador, A. Deutschmann, M. Bodner, G. Viola, R. Bortolozzi, G. Basso, J. Hagenbuchner, P. Obexer, Therapy-resistant acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells inactivate FOXO3 to escape apoptosis induction by TRAIL and Noxa, *Oncotarget* 4(7) (2013) 995-1007.
- [416] Y. Mei, C. Xie, X. Tian, M. Li, M. Wu, Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis, *Neoplasia (New York, N.Y.)* 9(10) (2007) 871-81.
- [417] C. Sheridan, G. Brumatti, M. Elgendy, M. Brunet, S.J. Martin, An ERK-dependent pathway to Noxa expression regulates apoptosis by platinum-based chemotherapeutic drugs, *Oncogene* 29(49) (2010) 6428-41.
- [418] S.H. Tonino, J. van Laar, M.H. van Oers, J.Y. Wang, E. Eldering, A.P. Kater, ROS-mediated upregulation of Noxa overcomes chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia, *Oncogene* 30(6) (2011) 701-13.
- [419] F. Conforti, A.E. Sayan, R. Sreekumar, B.S. Sayan, Regulation of p73 activity by post-translational modifications, *Cell death & disease* 3 (2012) e285.
- [420] D. Engelmann, C. Meier, V. Alla, B.M. Putzer, A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression, *Oncogene* 34(33) (2015) 4287-99.
- [421] S. Buhlmann, B.M. Putzer, DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications, *Biochimica et biophysica acta* 1785(2) (2008) 207-16.
- [422] M. Muller, T. Schilling, A.E. Sayan, A. Kairat, K. Lorenz, H. Schulze-Bergkamen, M. Oren, A. Koch, A. Tannapfel, W. Stremmel, G. Melino, P.H. Krammer, TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma, *Cell death and differentiation* 12(12) (2005) 1564-77.
- [423] C.W. Lee, N.B. La Thangue, Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73, *Oncogene* 18(29) (1999) 4171-81.
- [424] Y.L. Lin, S. Sengupta, K. Gurdziel, G.W. Bell, T. Jacks, E.R. Flores, p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair, *PLoS genetics* 5(10) (2009) e1000680.
- [425] J.G. Gong, A. Costanzo, H.Q. Yang, G. Melino, W.G. Kaelin, Jr., M. Levrero, J.Y. Wang, The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage, *Nature* 399(6738) (1999) 806-9.
- [426] Z.M. Yuan, H. Shioya, T. Ishiko, X. Sun, J. Gu, Y.Y. Huang, H. Lu, S. Kharbanda, R. Weichselbaum, D. Kufe, p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage, *Nature* 399(6738) (1999) 814-7.

- [427] R. Agami, G. Blandino, M. Oren, Y. Shaul, Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis, *Nature* 399(6738) (1999) 809-13.
- [428] S. Gonzalez, C. Prives, C. Cordon-Cardo, p73alpha regulation by Chk1 in response to DNA damage, *Mol Cell Biol* 23(22) (2003) 8161-71.
- [429] V. Meltzer, M. Ben-Yehoyada, N. Reuven, Y. Shaul, c-Abl downregulates the slow phase of double-strand break repair, *Cell death & disease* 1 (2010) e20.
- [430] X. Wang, L. Zeng, J. Wang, J.F. Chau, K.P. Lai, D. Jia, A. Poonepalli, M.P. Hande, H. Liu, G. He, L. He, B. Li, A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response, *Cell death and differentiation* 18(1) (2011) 5-15.
- [431] K.K. Tsai, Z.M. Yuan, c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction, *Cancer research* 63(12) (2003) 3418-24.
- [432] A. Costanzo, P. Merlo, N. Pediconi, M. Fulco, V. Sartorelli, P.A. Cole, G. Fontemaggi, M. Fanciulli, L. Schiltz, G. Blandino, C. Balsano, M. Levrero, DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes, *Molecular cell* 9(1) (2002) 175-86.
- [433] F. Mantovani, S. Piazza, M. Gostissa, S. Strano, P. Zacchi, R. Mantovani, G. Blandino, G. Del Sal, Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function, *Molecular cell* 14(5) (2004) 625-36.
- [434] R. Sanchez-Prieto, V.J. Sanchez-Arevalo, J.M. Servitja, J.S. Gutkind, Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway, *Oncogene* 21(6) (2002) 974-9.
- [435] Z.M. Yuan, T. Utsugisawa, T. Ishiko, S. Nakada, Y. Huang, S. Kharbanda, R. Weichselbaum, D. Kufe, Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation, *Oncogene* 16(13) (1998) 1643-8.
- [436] F. Cong, S.P. Goff, c-Abl-induced apoptosis, but not cell cycle arrest, requires mitogen-activated protein kinase kinase 6 activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24) (1999) 13819-24.
- [437] J.I. Park, H.S. Choi, J.S. Jeong, J.Y. Han, I.H. Kim, Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562 cells, *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12(9) (2001) 481-6.
- [438] J. Ren, R. Datta, H. Shioya, Y. Li, E. Oki, V. Biedermann, A. Bharti, D. Kufe, p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage, *The Journal of biological chemistry* 277(37) (2002) 33758-65.
- [439] C. Gaiddon, M. Lokshin, I. Gross, D. Levasseur, Y. Taya, J.P. Loeffler, C. Prives, Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73, *The Journal of biological chemistry* 278(30) (2003) 27421-31.
- [440] S. Kramer, T. Ozaki, K. Miyazaki, C. Kato, T. Hanamoto, A. Nakagawara, Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells, *Oncogene* 24(5) (2005) 938-44.
- [441] H. Kikuchi, T. Ozaki, K. Furuya, T. Hanamoto, M. Nakanishi, H. Yamamoto, K. Yoshida, S. Todo, A. Nakagawara, NF-kappaB regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway, *Oncogene* 25(58) (2006) 7608-17.
- [442] M. Rossi, V. De Laurenzi, E. Munarriz, D.R. Green, Y.C. Liu, K.H. Vousden, G. Cesareni, G. Melino, The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability, *The EMBO journal* 24(4) (2005) 836-48.
- [443] A. Oberst, M. Malatesta, R.I. Aqeilan, M. Rossi, P. Salomoni, R. Murillas, P. Sharma, M.R. Kuehn, M. Oren, C.M. Croce, F. Bernassola, G. Melino, The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27) (2007) 11280-5.
- [444] D. Levy, Y. Adamovich, N. Reuven, Y. Shaul, The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73, *Cell death and differentiation* 14(4) (2007) 743-51.
- [445] I. Dulloo, K. Sabapathy, Transactivation-dependent and -independent regulation of p73 stability, *The Journal of biological chemistry* 280(31) (2005) 28203-14.
- [446] B.S. Sayan, A.L. Yang, F. Conforti, P. Tucci, M.C. Piro, G.J. Browne, M. Agostini, S. Bernardini, R.A. Knight, T.W. Mak, G. Melino, Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(29) (2010) 12877-82.
- [447] E.J. Kim, J.S. Park, S.J. Um, Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family in vivo, *The Journal of biological chemistry* 277(35) (2002) 32020-8.
- [448] E. Lapi, S. Di Agostino, S. Donzelli, H. Gal, E. Domany, G. Rechavi, P.P. Pandolfi, D. Givol, S. Strano, X. Lu, G. Blandino, PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop, *Molecular cell* 32(6) (2008) 803-14.
- [449] D. Levy, Y. Adamovich, N. Reuven, Y. Shaul, Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage, *Molecular cell* 29(3) (2008) 350-61.
- [450] S. Strano, O. Monti, N. Pediconi, A. Baccharini, G. Fontemaggi, E. Lapi, F. Mantovani, A. Damalas, G. Citro, A. Sacchi, G. Del Sal, M. Levrero, G. Blandino, The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage, *Molecular cell* 18(4) (2005) 447-59.

- [451] P. Klanrit, P. Taebunpakul, M.B. Flinterman, E.W. Odell, M.A. Riaz, G. Melino, P. Salomoni, J.S. Mymryk, J. Gaken, F. Farzaneh, M. Tavassoli, PML involvement in the p73-mediated E1A-induced suppression of EGFR and induction of apoptosis in head and neck cancers, *Oncogene* 28(39) (2009) 3499-512.
- [452] S. Basu, N.F. Totty, M.S. Irwin, M. Sudol, J. Downward, Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis, *Molecular cell* 11(1) (2003) 11-23.
- [453] B. Hoffman, D.A. Liebermann, Role of gadd45 in myeloid cells in response to hematopoietic stress, *Blood cells, molecules & diseases* 39(3) (2007) 344-7.
- [454] D.A. Liebermann, B. Hoffman, Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress, *Blood cells, molecules & diseases* 39(3) (2007) 329-35.
- [455] J.G. Jackson, O.M. Pereira-Smith, p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts, *Cancer research* 66(17) (2006) 8356-60.
- [456] Re: Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R, Schonfeld P, Roessner A, and Gali-Muhtasib H (2005) 5-aza-Cytidine Is a Potent Inhibitor of DNA Methyltransferase 3a and Induces Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells via Gadd45- and p53-Dependent Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* February 2005 312:525-536; doi:10.1124/jpet.104.074195, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 359(1) (2016) 90.
- [457] Q. Zhan, M.J. Antinore, X.W. Wang, F. Carrier, M.L. Smith, C.C. Harris, A.J. Fornace, Jr., Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45, *Oncogene* 18(18) (1999) 2892-900.
- [458] S.J. Elledge, Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science (New York, N.Y.)* 274(5293) (1996) 1664-72.
- [459] S. Jin, M.J. Antinore, F.D. Lung, X. Dong, H. Zhao, F. Fan, A.B. Colchagie, P. Blanck, P.P. Roller, A.J. Fornace, Jr., Q. Zhan, The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression, *The Journal of biological chemistry* 275(22) (2000) 16602-8.
- [460] Q. Yang, A. Manicone, J.D. Coursen, S.P. Linke, M. Nagashima, M. Forgues, X.W. Wang, Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint, *The Journal of biological chemistry* 275(47) (2000) 36892-8.
- [461] J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* 75(4) (1993) 805-16.
- [462] H. Zhang, Y. Xiong, D. Beach, Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes, *Molecular biology of the cell* 4(9) (1993) 897-906.
- [463] Y. Xiong, G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, D. Beach, p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature* 366(6456) (1993) 701-4.
- [464] M. Vairapandi, N. Azam, A.G. Balliet, B. Hoffman, D.A. Liebermann, Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control, *The Journal of biological chemistry* 275(22) (2000) 16810-9.
- [465] A.W. Murray, Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls, *Nature* 359(6396) (1992) 599-604.
- [466] M. Christmann, M.T. Tomicic, W.P. Roos, B. Kaina, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193(1-2) (2003) 3-34.
- [467] P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal, Survivin: A molecular biomarker in cancer, *The Indian journal of medical research* 141(4) (2015) 389-97.
- [468] A. Rauch, A. Carlstedt, C. Emmerich, A.M. Mustafa, A. Goder, S.K. Knauer, M. Linnebacher, T. Heinzl, O.H. Kramer, Survivin antagonizes chemotherapy-induced cell death of colorectal cancer cells, *Oncotarget* 9(45) (2018) 27835-27850.
- [469] J. Sonnemann, C. Marx, S. Becker, S. Wittig, C.D. Palani, O.H. Kramer, J.F. Beck, p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors, *British journal of cancer* 110(3) (2014) 656-67.
- [470] V. Gottifredi, S. Shieh, Y. Taya, C. Prives, p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(3) (2001) 1036-41.
- [471] R. Beckerman, A.J. Donner, M. Mattia, M.J. Peart, J.L. Manley, J.M. Espinosa, C. Prives, A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint, *Genes & development* 23(11) (2009) 1364-77.
- [472] B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell* 132(1) (2008) 27-42.
- [473] N. Mizushima, B. Levine, A.M. Cuervo, D.J. Klionsky, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature* 451(7182) (2008) 1069-75.
- [474] X. Qu, J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, B. Levine, Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene, *The Journal of clinical investigation* 112(12) (2003) 1809-20.
- [475] T. Robert, F. Vanoli, I. Chiolo, G. Shubassi, K.A. Bernstein, R. Rothstein, O.A. Botrugno, D. Parazzoli, A. Oldani, S. Minucci, M. Foiani, HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy, *Nature* 471(7336) (2011) 74-79.

- [476] N.I. Orłotti, G. Cimino-Reale, E. Borghini, M. Pennati, C. Sissi, F. Perrone, M. Palumbo, M.G. Daidone, M. Folini, N. Zaffaroni, Autophagy acts as a safeguard mechanism against G-quadruplex ligand-mediated DNA damage, *Autophagy* 8(8) (2012) 1185-96.
- [477] V.V. Eapen, J.E. Haber, DNA damage signaling triggers the cytoplasm-to-vacuole pathway of autophagy to regulate cell cycle progression, *Autophagy* 9(3) (2013) 440-1.
- [478] A. Alexander, S.L. Cai, J. Kim, A. Nanez, M. Sahin, K.H. MacLean, K. Inoki, K.L. Guan, J. Shen, M.D. Person, D. Kusewitt, G.B. Mills, M.B. Kastan, C.L. Walker, ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(9) (2010) 4153-8.
- [479] A. Alexander, J. Kim, C.L. Walker, ATM engages the TSC2/mTORC1 signaling node to regulate autophagy, *Autophagy* 6(5) (2010) 672-3.
- [480] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.L. Guan, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nature cell biology* 13(2) (2011) 132-41.
- [481] M. Liu, T. Zeng, X. Zhang, C. Liu, Z. Wu, L. Yao, C. Xie, H. Xia, Q. Lin, L. Xie, D. Zhou, X. Deng, H.L. Chan, T.J. Zhao, H.R. Wang, ATR/Chk1 signaling induces autophagy through sumoylated RhoB-mediated lysosomal translocation of TSC2 after DNA damage, *Nature communications* 9(1) (2018) 4139.
- [482] S. Chen, C. Wang, L. Sun, D.L. Wang, L. Chen, Z. Huang, Q. Yang, J. Gao, X.B. Yang, J.F. Chang, P. Chen, L. Lan, Z. Mao, F.L. Sun, RAD6 promotes homologous recombination repair by activating the autophagy-mediated degradation of heterochromatin protein HP1, *Mol Cell Biol* 35(2) (2015) 406-16.
- [483] D.H. Liang, D.S. Choi, J.E. Ensor, B.A. Kaiparettu, B.L. Bass, J.C. Chang, The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair, *Cancer letters* 376(2) (2016) 249-58.
- [484] R.K. Amaravadi, D. Yu, J.J. Lum, T. Bui, M.A. Christophorou, G.I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko, C.B. Thompson, Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma, *The Journal of clinical investigation* 117(2) (2007) 326-36.
- [485] Y. Pan, Y. Gao, L. Chen, G. Gao, H. Dong, Y. Yang, B. Dong, X. Chen, Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(10) (2011) 3248-58.
- [486] J. Wang, G.S. Wu, Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells, *The Journal of biological chemistry* 289(24) (2014) 17163-73.
- [487] S. Piya, S.M. Kornblau, V.R. Ruvolo, H. Mu, P.P. Ruvolo, T. McQueen, R.E. Davis, N. Hail, Jr., H. Kantarjian, M. Andreeff, G. Borthakur, Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia, *Blood* 128(9) (2016) 1260-9.
- [488] I. Iaccarino, D. Hancock, G. Evan, J. Downward, c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner, *Cell death and differentiation* 10(5) (2003) 599-608.
- [489] L.S. Hart, J.T. Cunningham, T. Datta, S. Dey, F. Tameire, S.L. Lehman, B. Qiu, H. Zhang, G. Cerniglia, M. Bi, Y. Li, Y. Gao, H. Liu, C. Li, A. Maity, A. Thomas-Tikhonenko, A.E. Perl, A. Koong, S.Y. Fuchs, J.A. Diehl, I.G. Mills, D. Ruggero, C. Koumenis, ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth, *The Journal of clinical investigation* 122(12) (2012) 4621-34.
- [490] K. Liu, Y. Shi, X. Guo, S. Wang, Y. Ouyang, M. Hao, D. Liu, L. Qiao, N. Li, J. Zheng, D. Chen, CHOP mediates ASPP2-induced autophagic apoptosis in hepatoma cells by releasing Beclin-1 from Bcl-2 and inducing nuclear translocation of Bcl-2, *Cell death & disease* 5 (2014) e1323.
- [491] D. Crighton, J. O'Prey, H.S. Bell, K.M. Ryan, p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death, *Cell death and differentiation* 14(6) (2007) 1071-9.
- [492] Z. He, H. Liu, M. Agostini, S. Yousefi, A. Perren, M.P. Tschan, T.W. Mak, G. Melino, H.U. Simon, p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene, *Cell death and differentiation* 20(10) (2013) 1415-24.
- [493] J.M. Rosenbluth, D.J. Mays, M.F. Pino, L.J. Tang, J.A. Pietenpol, A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73, *Mol Cell Biol* 28(19) (2008) 5951-64.
- [494] D. Crighton, S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P.R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook, K.M. Ryan, DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis, *Cell* 126(1) (2006) 121-34.
- [495] E. Tasdemir, M.C. Maiuri, L. Galluzzi, I. Vitale, M. Djavaheri-Mergny, M. D'Amelio, A. Criollo, E. Morselli, C. Zhu, F. Harper, U. Nannmark, C. Samara, P. Pinton, J.M. Vicencio, R. Carnuccio, U.M. Moll, F. Madeo, P. Paterlini-Brechot, R. Rizzuto, G. Szabadkai, G. Pierron, K. Blomgren, N. Tavernarakis, P. Codogno, F. Cecconi, G. Kroemer, Regulation of autophagy by cytoplasmic p53, *Nature cell biology* 10(6) (2008) 676-87.
- [496] E. Tasdemir, M. Chiara Maiuri, E. Morselli, A. Criollo, M. D'Amelio, M. Djavaheri-Mergny, F. Cecconi, N. Tavernarakis, G. Kroemer, A dual role of p53 in the control of autophagy, *Autophagy* 4(6) (2008) 810-4.
- [497] M.C. Maiuri, G. Le Toumelin, A. Criollo, J.C. Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, G. Pierron, K. Troulinaki, N. Tavernarakis, J.A. Hickman, O. Geneste, G. Kroemer, Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1, *The EMBO journal* 26(10) (2007) 2527-39.

- [498] S. Pattingre, A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, B. Levine, Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy, *Cell* 122(6) (2005) 927-39.
- [499] E. Zalckvar, H. Berissi, L. Mizrachi, Y. Idelchuk, I. Koren, M. Eisenstein, H. Sabanay, R. Pinkas-Kramarski, A. Kimchi, DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy, *EMBO reports* 10(3) (2009) 285-92.
- [500] S. Pattingre, C. Bauvy, S. Carpentier, T. Levade, B. Levine, P. Codogno, Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy, *The Journal of biological chemistry* 284(5) (2009) 2719-28.
- [501] Y. Wei, S. Pattingre, S. Sinha, M. Bassik, B. Levine, JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy, *Molecular cell* 30(6) (2008) 678-88.
- [502] D. Tang, R. Kang, K.M. Livesey, C.W. Cheh, A. Farkas, P. Loughran, G. Hoppe, M.E. Bianchi, K.J. Tracey, H.J. Zeh, 3rd, M.T. Lotze, Endogenous HMGB1 regulates autophagy, *The Journal of cell biology* 190(5) (2010) 881-92.
- [503] G. Kroemer, G. Marino, B. Levine, Autophagy and the integrated stress response, *Molecular cell* 40(2) (2010) 280-93.
- [504] S. Luo, D.C. Rubinsztein, Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL, *Cell death and differentiation* 17(2) (2010) 268-77.
- [505] W. Hou, J. Han, C. Lu, L.A. Goldstein, H. Rabinowich, Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis, *Autophagy* 6(7) (2010) 891-900.
- [506] R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, *Cell death and differentiation* 18(4) (2011) 571-80.
- [507] M. Djavaheri-Mergny, M.C. Maiuri, G. Kroemer, Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1, *Oncogene* 29(12) (2010) 1717-9.
- [508] S. Yousefi, R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, H.U. Simon, Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis, *Nature cell biology* 8(10) (2006) 1124-32.
- [509] N.J. Waterhouse, D.M. Finucane, D.R. Green, J.S. Elce, S. Kumar, E.S. Alnemri, G. Litwack, K. Khanna, M.F. Lavin, D.J. Watters, Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis, *Cell death and differentiation* 5(12) (1998) 1051-61.
- [510] G. Marino, M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, G. Kroemer, Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(2) (2014) 81-94.
- [511] M. Kwok, N. Davies, A. Agathangelou, E. Smith, C. Oldreive, E. Petermann, G. Stewart, J. Brown, A. Lau, G. Pratt, H. Parry, M. Taylor, P. Moss, P. Hillmen, T. Stankovic, ATR inhibition induces synthetic lethality and overcomes chemoresistance in TP53- or ATM-defective chronic lymphocytic leukemia cells, *Blood* 127(5) (2016) 582-95.
- [512] ClinicalTrials.gov, A Study of AZD6738 and Acalabrutinib in Subjects With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03328273?term=atr+inhibitor&cond=cll&rank=1>.
- [513] E.L. Schenk, B.D. Koh, K.S. Flatten, K.L. Peterson, D. Parry, A.D. Hess, B.D. Smith, J.E. Karp, L.M. Karnitz, S.H. Kaufmann, Effects of selective checkpoint kinase 1 inhibition on cytarabine cytotoxicity in acute myelogenous leukemia cells in vitro, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(19) (2012) 5364-73.
- [514] K. Chamoun, G. Borthakur, Investigational CHK1 inhibitors in early stage clinical trials for acute myeloid leukemia, *Expert opinion on investigational drugs* (2018) 1-6.
- [515] M. Murga, S. Campaner, A.J. Lopez-Contreras, L.I. Toledo, R. Soria, M.F. Montana, L. Artista, T. Schleker, C. Guerra, E. Garcia, M. Barbacid, M. Hidalgo, B. Amati, O. Fernandez-Capetillo, Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors, *Nature structural & molecular biology* 18(12) (2011) 1331-1335.
- [516] N. Foray, D. Marot, V. Randrianarison, N.D. Venezia, D. Picard, M. Perricaudet, V. Favaudon, P. Jeggo, Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation, *Mol Cell Biol* 22(12) (2002) 4020-32.

6 Anhang

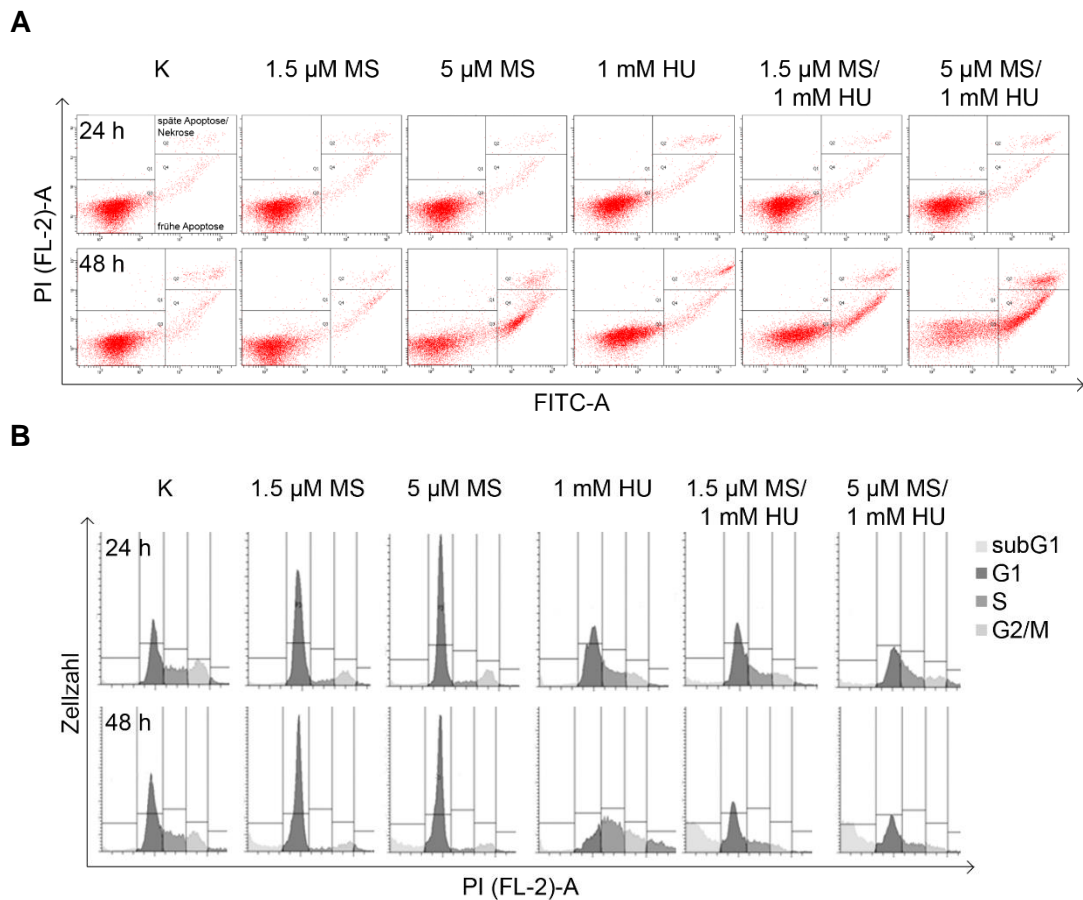


Abb. 6.1: Zelltodinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 1,5-5 μ M MS-275 (MS) und/oder 1 mM Hydroxyurea (HU) für 24-48 h behandelt. **(A)** Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Dotplots der AnnexinV/PI-Messung sowie **(B)** Histogramme der PI-Messung.

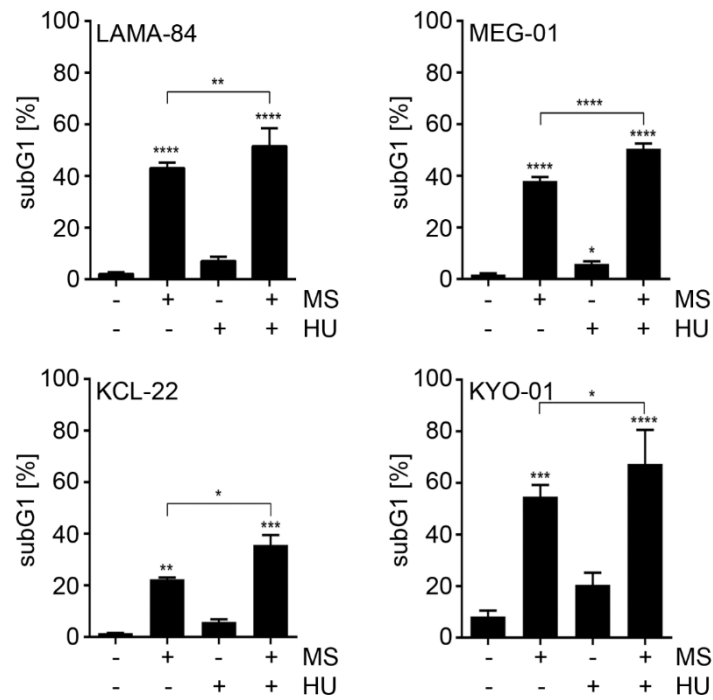


Abb. 6.2: Zelltodinduktion in CML Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 1,5-5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. Dargestellt sind durchflusszytometrische Messungen der subG1-Fractionen; $n=5\pm$ SD (LAMA-84); $n=3\pm$ SD (alle anderen CML Zelllinien); One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

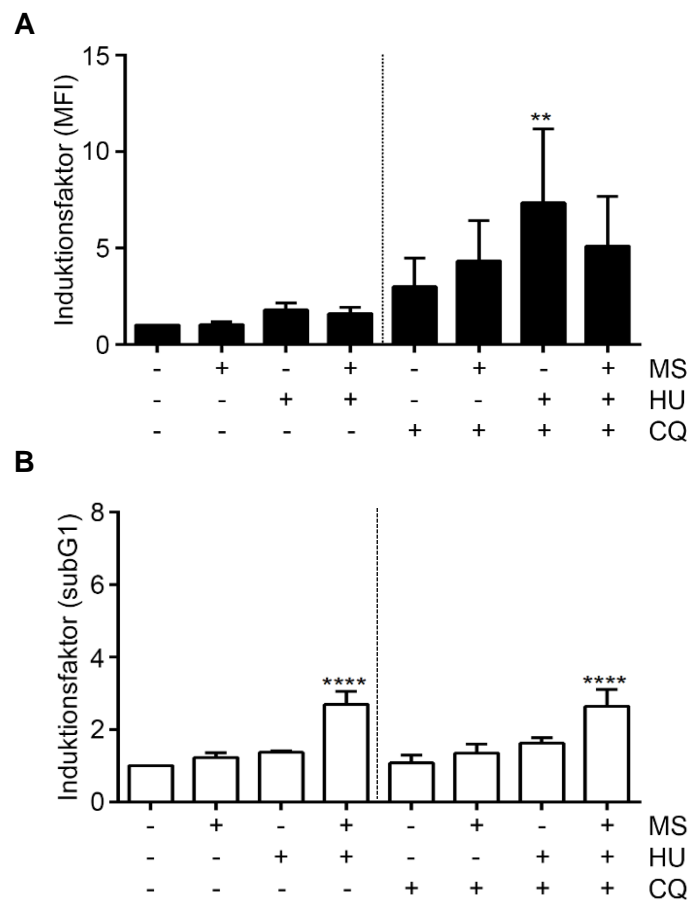
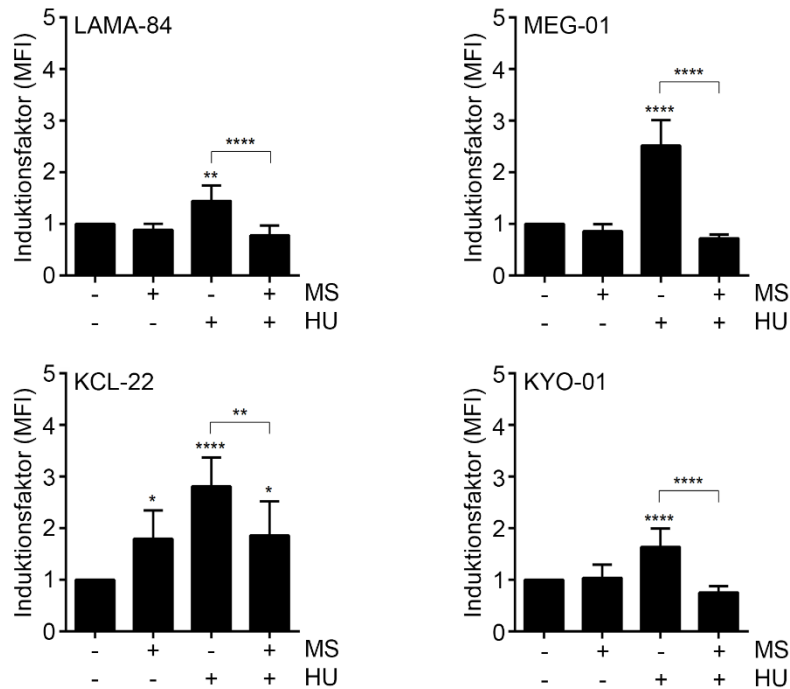


Abb. 6.3: Autophagieinduktion in K562 Zellen durch Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. Zusätzlich wurden sie für die gleiche Zeitdauer mit 10 μ M Chloroquin

(CQ) behandelt (A) Durchflusszytometrische Messungen der Cyto-ID®- sowie der (B) PI-Färbung; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Signals; $n=3\pm SD$; *One-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

A



B

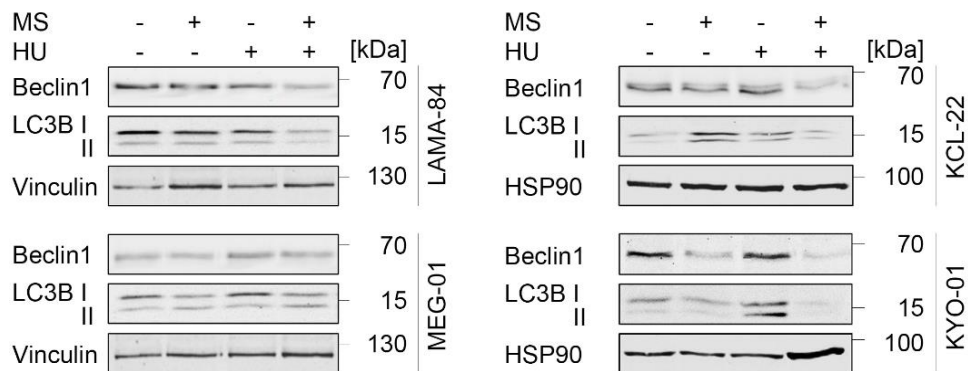


Abb. 6.4: Autophagieinduktion in CML Zellen durch Hydroxyurea. LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μM MS und/oder 1 mM HU für 24-48 h behandelt. (A) Messung der Cyto-ID®-gefärbten LAMA-84 Zellen nach 24 h sowie der anderen CML Zellen nach 48 h Behandlung; $n=5\pm SD$; *One-way ANOVA*, Bonferroni's *multiple comparisons test*; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$. (B) Expression von Beclin1 und LC3B wurde mittels Western Blot bestimmt; LAMA-84 und MEG-01 nach 24 h; KCL-22 und KYO-01 nach 48 h. Vinculin und HSP90 dienten als Ladekontrollen.

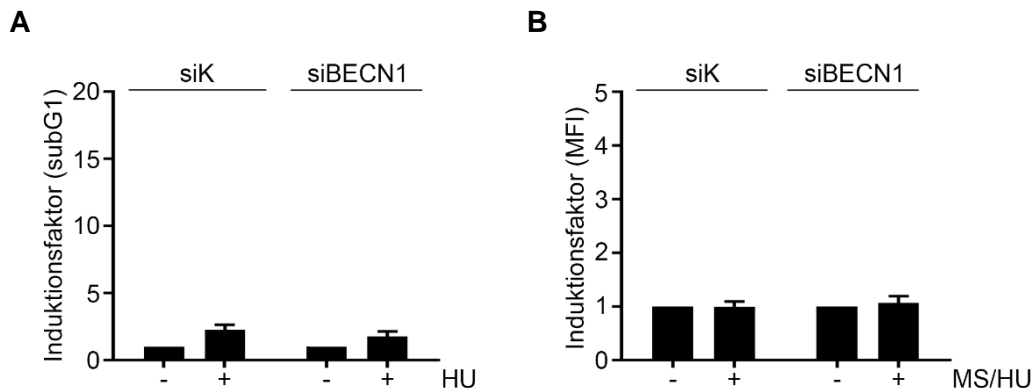


Abb. 6.5: Einfluss von Beclin1 Knock-down auf Autophagie- und Apoptoseinduktion in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. Knock-down von *Beclin1* in K562 Zellen erfolgte mittels RNAi. Die mit Kontroll-siRNA (siK) und siRNA gegen *Beclin1* (siBECN1) transfizierten Zellen wurden mit 1 mM HU und/oder 5 μ M MS für 24-48 h behandelt. (A) Durchflusszytometrische Messung der subG1-Fraktion nach 48 h. (B) Messung von Cyto-ID[®]-gefärbten Zellen nach 24 h. Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle (=1) normiert; n=3 \pm SD.

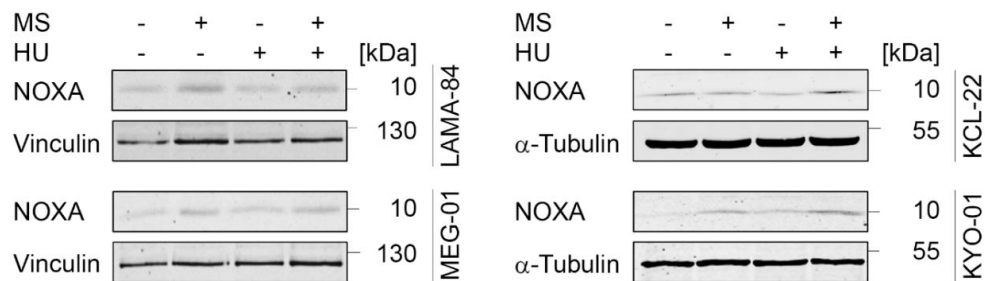


Abb. 6.6: Expression von NOXA in CML Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. NOXA Expression wurde mittels Western Blot detektiert. Vinculin und α -Tubulin dienen als Ladekontrollen.

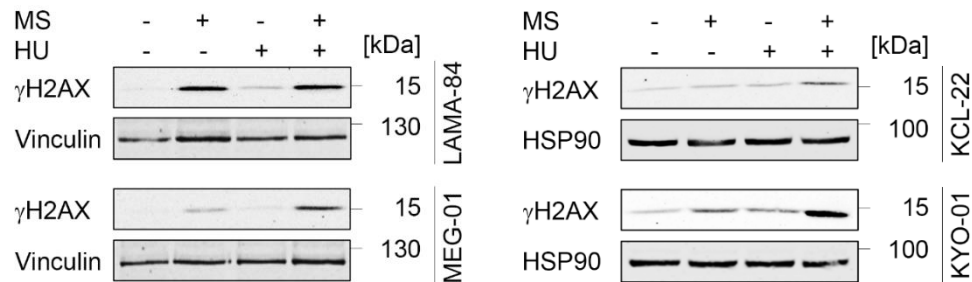


Abb. 6.7: Expression von gammaH2AX in CML Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 24 h behandelt. Bestimmung der gammaH2AX Expression erfolgte mittels Western Blot. Vinculin und HSP90 dienen als Ladekontrollen.

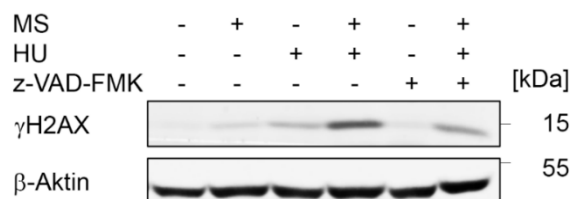


Abb. 6.8: Caspase-abhängige Induktion von gammaH2AX in K562 Zellen nach Behandlung mit MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und/oder 1 mM HU für 48 h behandelt. Zellen mit Kombinationsbehandlung wurden 1 h mit 50 μ M z-VAD-FMK vorbehandelt. Expression von gammaH2AX Expression wurde mittels Western Blot nachgewiesen. beta-Aktin diente als Ladekontrolle.

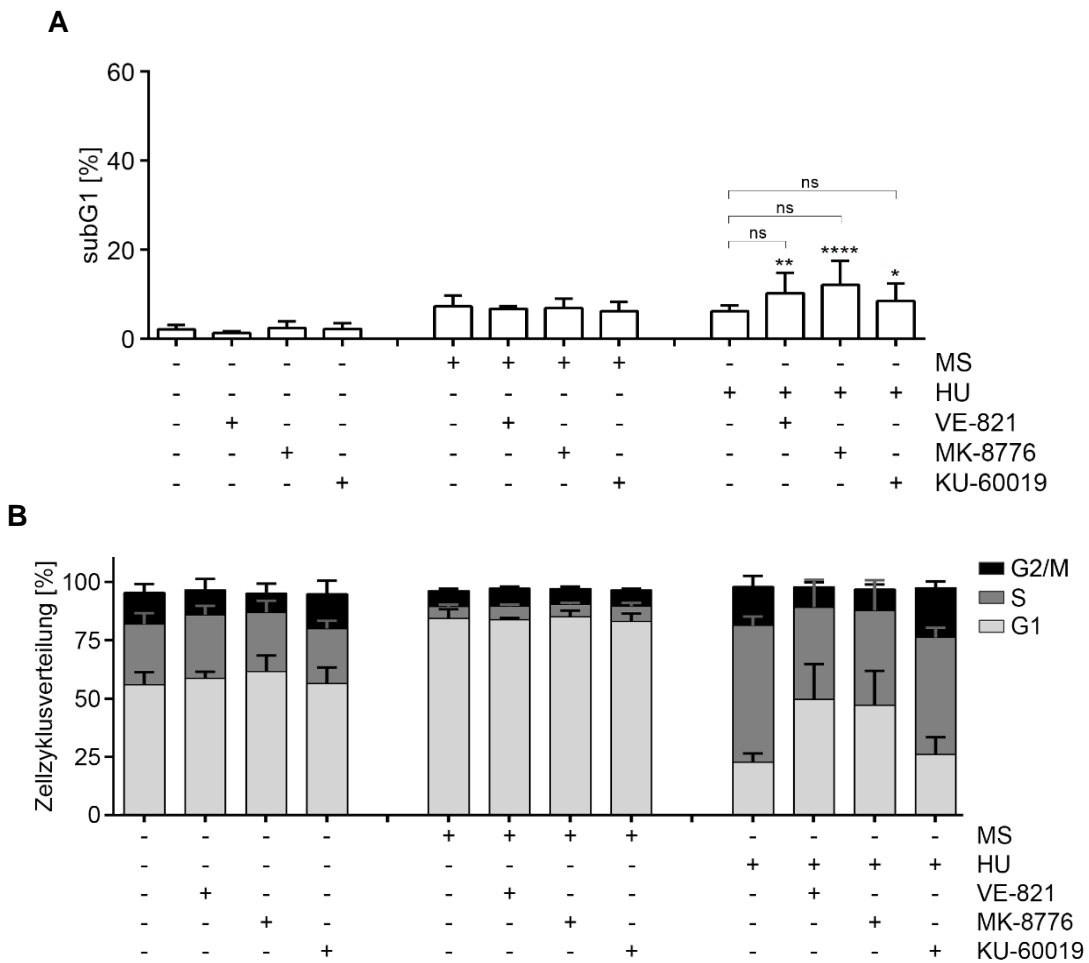


Abb. 6.9: Einfluss der Hemmung von ATR, CHK1 und ATM auf Zelltodinduktion und Zellzyklusverteilung in K562 Zellen durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 (VE), 500 nM MK-8776 (MK) und/oder 3 μ M KU-60019 vorbehandelt. **(A)** Messung der subG1-Fractionen mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung; $n=5\pm SD$; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; ns, nicht signifikant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$. **(B)** Darstellung der Zellzyklusverteilung. $n=5\pm SD$; G1: HU vs. HUVE: *** und HU vs. HUMK: **, S: HU vs. HUVE: *, Two-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

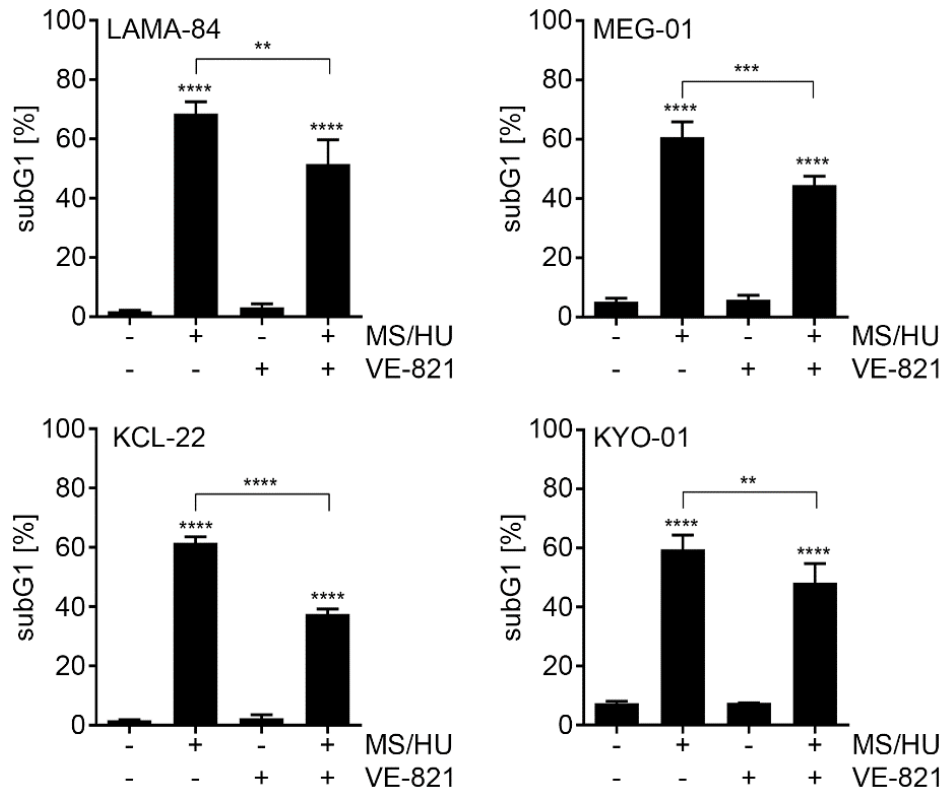


Abb. 6.10: Hemmung von ATR schützt CML Zellen vor Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea. LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 vorbehandelt. (A) Durchflusszytometrische Messung der subG1-Fractionen nach PI-Färbung. n=3-4 \pm SD; One-way ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

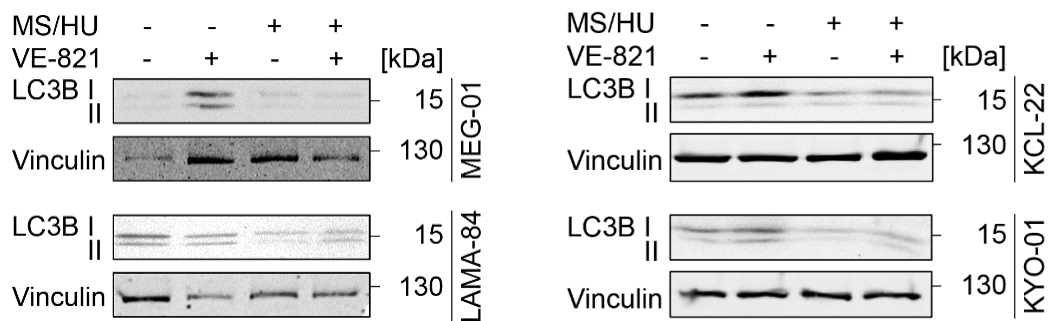


Abb. 6.11: Hemmung von ATR beeinflusst die Autophagie nicht in MS-275/Hydroxyurea behandelten CML Zellen. MEG-01, LAMA-84, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 vorbehandelt. Expression von LC3B wurde mittels Western Blot detektiert. Vinculin diente als Ladekontrolle.

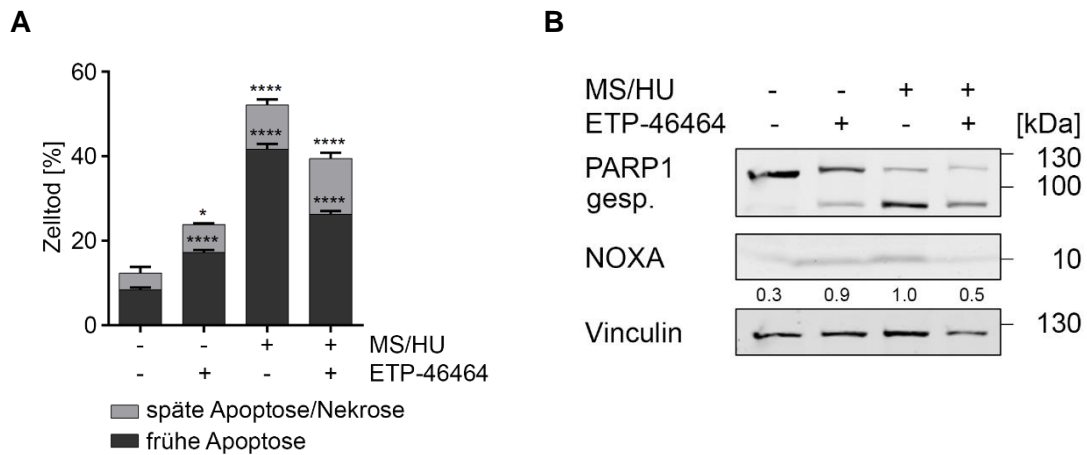


Abb. 6.12: Hemmung von ATR schützt K562 Zellen vor Zelltodinduktion durch MS-275 und Hydroxyurea. K562 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M ETP-46464 vorbehandelt. **(A)** Durchflusszytometrische Messung von AnnexinV/PI-gefärbten Zellen; $n=3\pm$ SD; *Two-way* ANOVA, Bonferroni's *multiple comparisons test*; * $p<0.05$, **** $p<0.0001$. **(B)** Expression von NOXA und PARP1 wurde mittels Western Blot bestimmt; gesp., gespalten. Vinculin diente als Ladekontrolle.

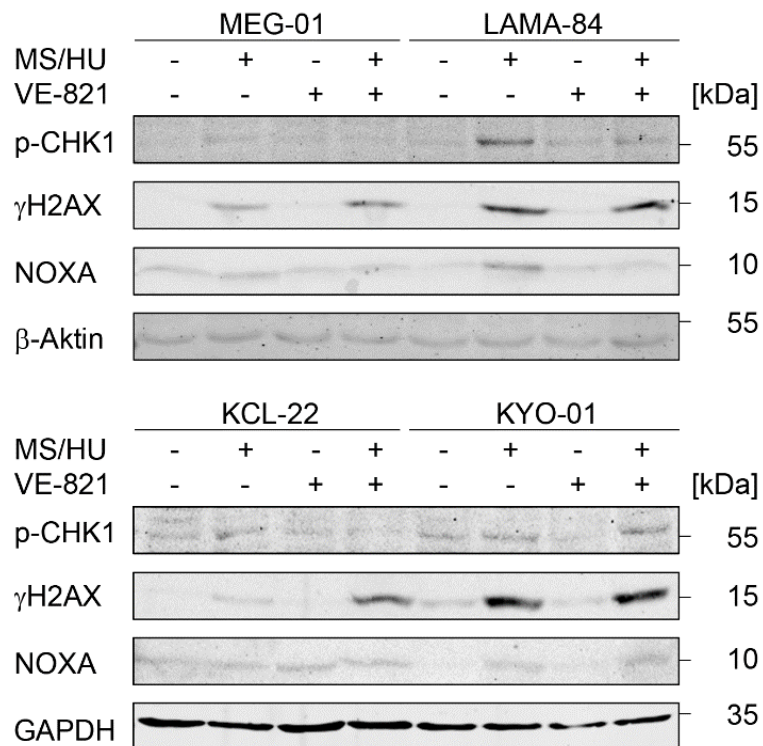


Abb. 6.13: Hemmung von ATR unterdrückt in CML Zellen die Expression von NOXA und verstärkt zugleich den durch MS-275 und Hydroxyurea induzierten DNA-Schaden. MEG-01, LAMA-84, KCL-22 und KYO-01 Zellen wurden mit 5 μ M MS und 1 mM HU für 48 h behandelt sowie 1 h mit 3 μ M VE-821 vorbehandelt. Western Blot-Analysen von γ H2AX, NOXA und p-CHK1 (S317). Wirkung von VE-821 wurde durch Detektion von p-CHK1 bestätigt. Vinculin diente als Ladekontrolle.

Publikationen

Originalarbeiten

- Manuskript in Vorbereitung: **Mahendrarajah N**, : ATR-CHK1 and NOXA integrate apoptosis, autophagy, and DNA damage in leukemic cells.
1. Pons M, Reichardt CM, Hennig D, Nathan A, Kiweler N, Stocking C, Wichmann C, Christmann M, Butter F, Reichardt S, Schneider G, Heinzl T, Englert C, Hartkamp J, Krämer OH*, **Mahendrarajah N***; * equal last author contribution.
Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells.
Archives of Toxicology. 2018 Jun;92(6):2119-2135.
 2. **Mahendrarajah N**, Borisova ME, Reichardt S, Godmann M, Sellmer A, Mahboobi S, Haitel A, Schmid K, Kenner L, Heinzl T, Beli P, Krämer OH.
HSP90 is necessary for the ACK1-dependent phosphorylation of STAT1 and STAT3.
Cell Signal. 2017 Nov;39:9-17.
 3. Noack K, **Mahendrarajah N**, Hennig D, Schmidt L, Grebien F, Hildebrand D, Christmann M, Kaina B, Sellmer A, Mahboobi S, Kubatzky K, Heinzl T, Krämer OH.
Analysis of the interplay between all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in leukemic cells.
Archives of Toxicology. 2017 May;91(5):2191-2208.
 4. Schäfer C, Göder A, Beyer M, Kiweler N, **Mahendrarajah N**, Rauch A, Nikolova T, Stojanovic N, Wieczorek M, Reich TR, Tomicic MT, Michael Linnebacher M, Sonnemann J, Dietrich S, Sellmer A, Mahboobi S, Heinzl T, Schneider G, and Krämer OH.
Class I histone deacetylases regulate p53/NF- κ B crosstalk in cancer cells
Cell Signal. 2017 Jan;29:218-225.
 5. **Mahendrarajah N**, Paulus R, Krämer OH.
Histone deacetylase inhibitors induce proteolysis of activated CDC42-associated kinase-1 in leukemic cells.
J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Nov;142(11):2263-73.

Buchkapitel

6. Göder A, **Mahendrarajah N**, Krämer OH.
Detection of Autophagy Induction After HDAC Inhibitor Treatment in Leukemic Cells.
Methods Mol Biol. 2017; 1510:3-10.

Übersichtsarbeit

7. Knauer SK, **Mahendrarajah N**, Roos WP, Krämer OH.
The inducible E3 ubiquitin ligases SIAH1 and SIAH2 perform critical roles in breast and prostate cancers.
Cytokine Growth Factor Rev. 2015 Aug; 26(4):405-13.

Veröffentlichte Manuskripte

Loss of Wilms tumor 1 protein is a marker for apoptosis in response to replicative stress in leukemic cells

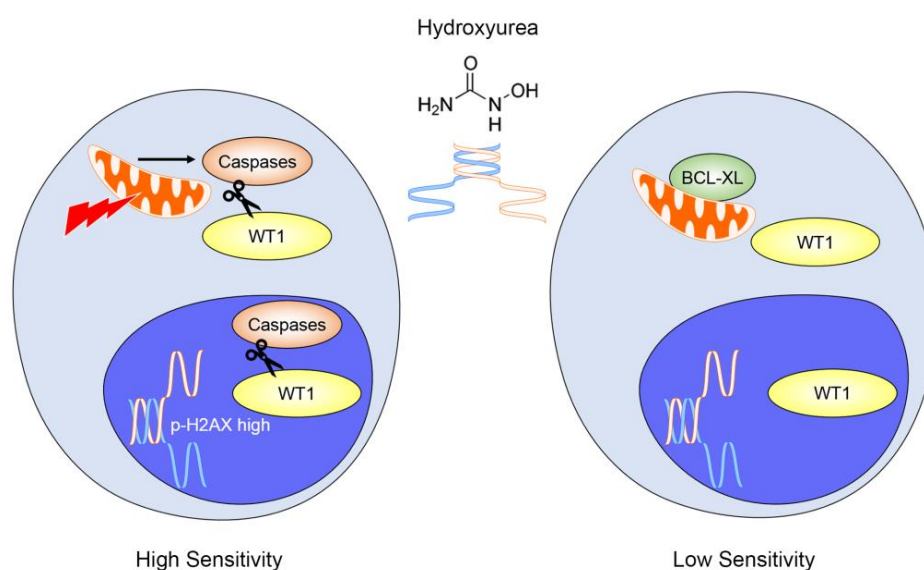
Veröffentlicht in Archives of Toxicology (Jun 2018); Band 92, Ausgabe 6, Seiten 2119-35

Autoren: Miriam Pons*, Claudia M*. Reichardt, Dorle Hennig, Abinaya Nathan, Nicole Kiweler, Carol Stocking, Christian Wichmann, Markus Christmann, Falk Butter, Sigrid Reichardt, Günter Schneider, Thorsten Heinzel, Christoph Englert, Jörg Hartkamp#, Oliver H. Krämer#, **Nisinha Mahendrarajah#**

* geteilte Erstautorschaft; # geteilte Letztautorschaft

Zusammenfassung

Diese Arbeit deckt auf, dass der Ribonukleotidreduktase-Inhibitor Hydroxyurea, welcher früher als Standardtherapie gegen Leukämie eingesetzt wurde, zu einer Caspase-abhängigen Prozessierung des Transkriptionsfaktors WT1 führt. Dies ist wichtig, weil WT1 ein klinischer Marker für nach einer Chemotherapie verbliebene Tumorzellen ist. Weiter zeigen wir, dass die anti-apoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-XL in Hydroxyurea-sensitiven Leukämiezellen die Spaltung von WT1 und somit eine starke Aktivierung von γ H2AX, einem DSB-Marker, verhindern können. Dementsprechend wiesen Hydroxyurea-robuste Leukämiezellen deutlich mehr BCL-XL auf als Hydroxyurea-sensitive Zellen. Bezüglich der Relevanz von WT1 haben wir festgestellt, dass WT1 zwar ein Zielprotein der apoptotischen Kaskade darstellt, dessen genetische Eliminierung jedoch zu keiner Sensitivierung von Leukämiezellen gegen Hydroxyurea führt. Unsere Daten zeigen, dass WT1 ein Marker für die Effizienz von Hydroxyurea und andere Chemotherapeutika ist, seine funktionelle Rolle jedoch überdacht werden sollte.



Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung und Auswertung der Experimente in Fig. 1E-F; Fig. 2D-E; Fig. 3C, F; Fig. 4C; Fig. 6A-D
- Densitometrische Analysen der Western Blots in Fig. 2A-B, Fig. 5B
- Selektion der IF-Bilder und Quantifizierung der γ H2AX MFI in Fig. 6E
- Durchführung von Teilen der Datenanalyse
- Schreiben von Teilen des Manuskripts sowie Erstellung der gesamten Abbildungen
- Zusammenstellung der gesamten Rohdaten in Excel und PowerPoint als Supplement

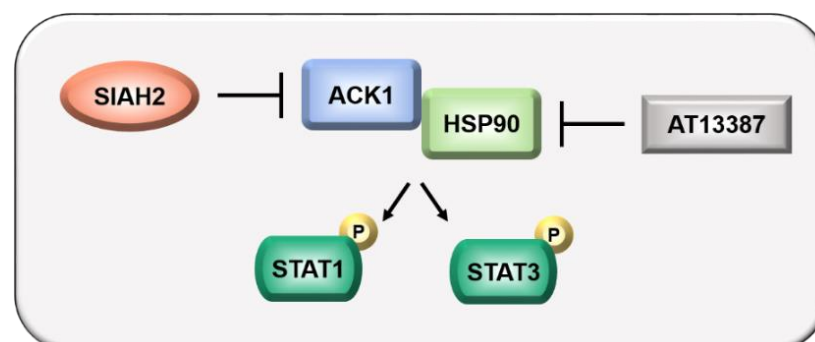
HSP90 is necessary for the ACK1-dependent phosphorylation of STAT1 and STAT3

Veröffentlicht in Cellular Signalling (Nov 2017); Band 39, Seiten 9-17

Autoren: Nisinha Mahendrarajah, Marina E. Borisova, Sigrid Reichardt, Maren Godmann, Andreas Sellmer, Siavosh Mahboobi, Andrea Haitel, Katharina Schmid, Lukas Kenner, Thorsten Heinzl, Petra Beli, Oliver H. Krämer

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Hemmung von der Tyrosinkinase ACK1 (activated CDC42-associated kinase-1) sowie dem Hitzeschockprotein HSP90 die ACK1-abhängige Phosphorylierung von STATs (*Signal transducers and activators of transcription*) negativ beeinflusst. Proteomic-basierte Interaktionsanalysen ergaben nur bekannte Interaktionspartner von ACK1, wie z.B. HSP90. Wir konnten jedoch zeigen, dass ACK1 eine bisher unbekannte Phosphorylierung des tumorrelevanten STAT3 auslöst. Desweiteren fanden wir, dass die E3 Ubiquitin Ligase SIAH2 zu einem proteasomalen Abbau von ACK1 führt und so die ACK1-abhängige Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 reguliert. Dazu muss das ACK1 aber über ein intaktes Valin-909 Bindungsmotiv verfügen. Entsprechend dieser Daten korreliert das Expressionslevel von ACK1 positiv mit phosphoryliertem STAT3 (Y705) in primären Lungenadenocarcinomen. Die Hemmung von aktivem HSP90 mit dem klinisch derzeit erprobten Inhibitor Onalespib (AT13387) blockiert demgemäß die ACK1-abhängige Phosphorylierung von STAT1 und STAT3. Daher liefern unsere Daten molekulare Einblicke und eine pharmakologische Strategie, um die ACK1-STAT Achse zu unterbinden.



Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung und Auswertung der Experimente in Fig. 1C; Fig. 2A; Fig. 3A-B; Fig. 4A (Kultivierung der Zellen in SILAC Medium, Transfektion, Zellyse, IP); Fig. 4C; Fig. 5A, C
- Densitometrische Analysen der Western Blots in Fig. 5B, D
- Durchführung von Teilen der Datenanalyse
- Schreiben von Teilen des Manuskripts sowie Erstellung der gesamten Abbildungen

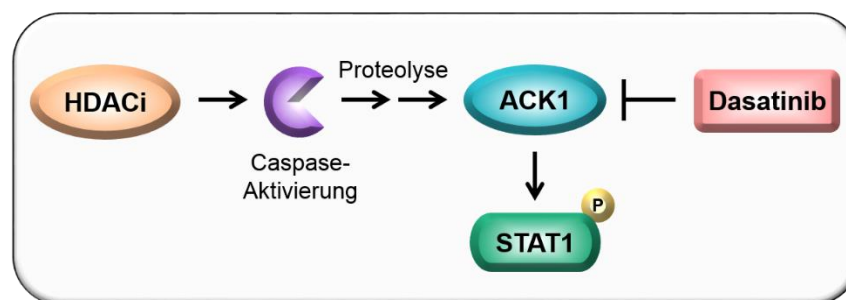
Histone deacetylase inhibitors induce proteolysis of activated CDC42-associated kinase-1 in leukemic cells

Veröffentlicht in Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (Nov 2016);
Band 142, Ausgabe 11, Seiten 2263-73

Autoren: Nisinha Mahendrarajah, Ramin Paulus, Oliver H. Krämer

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob klinisch relevante HDACi einen Einfluss auf ACK1 haben und ob HDACi vorteilhaft mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib zusammenwirken. Wir konnten zeigen, dass MS-275 und LBH589 eine Caspase-abhängige Proteolyse von ACK1 in CML und AML Zellen auslösen. Die mit der Induktion von Apoptose korrelierende Prozessierung von ACK1 führt, wie die Behandlung mit Dasatinib, zu einer Hemmung der Phosphorylierung von STAT3, einem Zielprotein von ACK1. In der Kombination zeigen HDACi und Dasatinib synergistische Effekte gegen Leukämiezellen, was zu weiteren Analysen dieser Kombination ermutigt.



Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung und Auswertung der Experimente in Fig. 1F; Fig. 2A-F; Fig. 3A-B
- Durchführung der restlichen Experimente/Datenanalyse/Densitometrischen Analyse gemeinsam mit meinem Bachelorstudenten Ramin Paulus
- Durchführung von Teilen der Literaturrecherchen
- Schreiben von Teilen des Manuskripts sowie Erstellung der gesamten Abbildungen

Konferenzteilnahmen

- 03/2017 83rd Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)
Heidelberg, Deutschland
Posterpräsentation
- 12/2016 32nd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine: Precision oncology: Translating basic discoveries into patient survival
Köln, Deutschland
Posterpräsentation
- 11/2016 Symposium "DNA damage response, genetic instability and cancer"
Mainz, Deutschland
Posterpräsentation
- 04/2016 2nd Cologne Ageing Conference
Köln, Deutschland
- 02/2016 82nd Jahrestagung der DGPT
Berlin, Deutschland
Posterpräsentation
- 09/2014 13th Biennial Meeting der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR)
Mainz, Deutschland
Unterstützung bei der Organisation der Konferenz

Mitbetreute Studenten

(BSc. Biotechnik, FH Bingen, 2016):

„Analysen zur Destabilisierung onkologisch relevanter Proteine durch epigenetische Modulatoren“

(BSc. Biomedizinische Chemie, JGU Mainz, 2017):

„Sensitivierung von Leukämiezellen gegenüber Hydroxyurea durch MS-275“

Lehre

- Studenten-Seminar „Toxikologie für Naturwissenschaftler“; Thema: „Induktion von Apoptose durch HDACi und replikativen Stress“, Vortrag und Diskussion
- Progress-Seminar „Molekulare und Genetische Toxikologie“, Vortrag und Diskussion

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Juni 2018 am Institut für Toxikologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von _____ durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Referenzen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, Januar 2019

Nisinha Mahendrarajah