

Einfluss der Autophagie auf den Zellzyklus und die Chemosensibilität von Leukämiezellen

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Alena Gschwind
geboren am 5. Oktober 1995 in Krumbach (Schwaben)**

Gutachter (*akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort*)

1. Prof. Dr. med. habil. James F. Beck, Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena

2. apl. Prof. Dr. med. Sebastian Scholl, Klinik für Innere Medizin II, Abt. Hämatologie/ internistische Onkologie, Universitätsklinikum Jena

3. Prof. Dr. med. Peter Bader, Schwerpunkt Stammzelltransplantation, Immunologie und Intensivmedizin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Frankfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.08.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Akute Leukämien.....	3
2.1.1	Epidemiologie und Prognose.....	3
2.1.2	Definition und Ätiologie.....	3
2.1.3	Klassifikationen und Prognosefaktoren.....	4
2.1.4	Therapie	5
2.2	Autophagie.....	6
2.2.1	Zellulärer Mechanismus der Autophagie.....	7
2.2.2	Dysfunktion der Autophagie als Ursache verschiedener Pathologien: Schwerpunkt Tumorentstehung und Progression	11
2.2.3	Pharmakologische Modulation der Autophagie	13
2.2.4	Nachweis der Autophagie-Aktivität mittels Cyto-ID Green®	16
2.2.5	Ausblick.....	16
2.3	Zellzyklus.....	17
2.3.1	Kontrolle und Regulation des Zellzyklus	18
2.3.2	Dysregulation des Zellzyklus und Tumorgenese.....	19
2.3.3	Zellzyklus und Autophagie.....	20
3	Zielstellung der Arbeit.....	22
4	Material und Methoden.....	24
4.1	Material	24
4.1.1	Geräte.....	24
4.1.2	Verbrauchsmaterial	25
4.1.3	Reagenzien, Medien, Puffer und Kits.....	26
4.1.4	Zelllinie.....	28
4.2	Methoden	29
4.2.1	Zellbiologische Methoden	29
4.2.1.1	Zellkultivierung und Passagieren der Zellen	29
4.2.1.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	29
4.2.1.3	Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche.....	30
4.2.1.4	Wirkstoffapplikation	30
4.2.2	Funktionelle Methoden	31
4.2.2.1	Durchflusszytometrische Analyse mittel FACS	31
4.2.2.2	Zellsortierung von MOLM-13-Zellen nach ihrer Autophagie-Aktivität	36
4.2.2.3	Immunoblotting.....	39
4.2.2.4	Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs und der Laktatsekretion	41
4.2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie	44

4.2.3	Molekularbiologische Methoden	45
4.2.3.1	Isolierung und Arbeiten mit RNA.....	45
4.2.3.2	Photometrische Quantifizierung der RNA.....	46
4.2.3.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	46
4.2.3.4	Real-Time RT-PCR mittels TaqMan® Technologie	47
4.2.4	Statistische Auswertung.....	49
5	Ergebnisse.....	50
5.1	Wirkung des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin auf den Etoposid-induzierten Zellzyklusarrest in MOLM-13-Zellen	50
5.1.1	Autophagie-Aktivierung durch Etoposid in MOLM-13-Zellen	51
5.1.2	Zellzyklusphasen-abhängige Autophagie-Aktivität in Etoposid-behandelten MOLM-13-Zellen.....	51
5.1.3	Kinetik des Etoposid-Effekts auf Autophagie und Zellzyklusarrest in MOLM-13-Zellen	53
5.1.4	Autophagie-abhängige Verteilung der MOLM-13-Zellen im Zellzyklus	54
5.2	Optimierung der Methode der Autophagie-spezifischen Zellsortierung mittels Cyto-ID	56
5.2.1	Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz	57
5.2.2	Zytotoxizität von Cyto-ID in MOLM-13-Zellen.....	58
5.2.3	Autophagie-Aktivierung durch SRT1720 in MOLM-13-Zellen	58
5.3	Unterschiede in der basalen Autophagie-Aktivität der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	60
5.3.1	Autophagie-Kinetik der sortierten Fraktionen.....	60
5.3.2	Expressionsmuster Autophagie-relevanter Gene in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	62
5.3.3	Nachweis der Expression Autophagie-relevanter Proteine in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	63
5.3.4	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von LC3B- und p62-Puncta in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	64
5.4	Analyse des Energiestoffwechsels der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	65
5.4.1	Zunahme des mitochondrialen Metabolismus mit steigender basaler Autophagie.....	66
5.4.2	Zunahme der glykolytischen Aktivität mit steigender basaler Autophagie... 68	67
5.5	Analyse des Zellzyklus der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	68
5.5.1	Unterschiede im Zellzyklusprofil zwischen den Cyto-ID-sortierten Fraktionen	68
5.5.2	Expressionsmuster Zellzyklus-relevanter Gene in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	71
5.5.3	Nachweis der Expression Zellzyklus-relevanter-Proteine in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	72
5.6	Chemosensibilität der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	73

6	Diskussion	76
6.1	Einfluss der Autophagie-Modulatoren 3-Methyladenin und Etoposid auf den Zellzyklus und die Autophagie in MOLM-13-Zellen.....	77
6.2	Interaktion zwischen konstitutiver Autophagie und Zellzyklus in MOLM-13-Zellen	79
6.3	Unterschiede in der konstitutiven Autophagie sind über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil – auch bei Vorbehandlung mit SRT1720.....	82
6.3.1	Unterschiede der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf Genexpressionsebene: Erhöhte Expression von ULK1-mRNA in Aut ^{HI}	83
6.3.2	Expression von LC3B-II bestätigt die erfolgreiche Autophagie-spezifische Zellsortierung der MOLM-13-Zellen.....	83
6.4	Cyto-ID-sortierte MOLM-13-Zellen unterscheiden sich in ihrem Metabolismus – Zusammenhang der konstitutiven Autophagie und des Metabolismus	85
6.5	Hohe konstitutive Autophagie-Aktivität ist mit der G2/M-Phase des Zellzyklus assoziiert.....	87
6.5.1	Erhöhte Expression G2/M-spezifischer Proteine und Gene in Aut ^{ME} - und Aut ^{HI} -Zellen	87
6.5.2	Möglicher Einfluss der Zellzyklusphase auf den Metabolismus der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen	90
6.6	Unterschiede in der konstitutiven Autophagie-Aktivität haben keinen Einfluss auf die Chemosensibilität von MOLM-13-Zellen.....	91
7	Schlussfolgerung	95
8	Anhang.....	96
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	96
8.2	Tabellenverzeichnis	98
8.3	Literaturverzeichnis	99
8.4	Danksagung.....	113
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	114

Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CDK	<i>cyclin-dependent-kinases</i>
CKI	CDK-Inhibitor
cm ²	Quadratzenimeter
CQ	Chloroquin
CR	<i>complete remission</i> (komplette Remission)
Ct-Wert	<i>cycle-threshold</i> -Wert
DDR	<i>DNA-damage-response</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
FLI	Fritz-Lippman-Institut
FLM	farbloses Nährmedium
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	<i>hora</i> (Stunde)
HKP	<i>house keeping protein</i>
IKZ	Inkubationszeit
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LC3B-II	<i>microtubule associated protein 2 light chain 3</i>
LC3-I	<i>microtubule associated protein 1 light chain 3</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	mitochondriales Membranpotential
M-Phase	Mitose-Phase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
p53	Protein 53
PAS	<i>phagophore assembly site</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PI3P	Posphatidylinositol-3-Phosphat
PLK	<i>Polo-like-kinase</i>
pS10H3	an Serin 10 phosphoryliertes Histon 3
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase A	<i>Ribonuclease-A</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Sirt1	Sirtuin 1
SL	Stammlösung
S-Phase	Synthese-Phase
SQSTM1	Sequestrom 1
SSC	<i>sideways scatter</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
Topo-II α	Topoisomerase-II α
U	Umdrehung
ULK1	<i>unc-51-like autophagy-activating kinase 1</i>
$\Delta\Psi_m$	mitochondriale Transmembranpotential

1 Zusammenfassung

Die Autophagie ist ein zytoprotektiver, für die zelluläre Homöostase essentieller Mechanismus. Sie ist in allen Zellen konstitutiv aktiv und dient dem Abbau schädlicher Zellbestandteile wie z. B. dem gealterter dysfunktionaler Organellen oder dem aberranter Proteinaggregate. Darüber hinaus handelt es sich um einen adaptiven Stress-induzierten Mechanismus, mit dem Zellen unter anderem auf Hunger oder DNA-Schäden reagieren. Sie spielt daher eine bedeutende physiologische, aber auch pathophysiologische Rolle: Eine fehlerhafte Autophagie kann zur Entstehung verschiedener - insbesondere neurodegenerativer und maligner - Krankheiten beitragen. Während eine defekte Autophagie also einerseits an der neoplastischen Transformation beteiligt sein kann, unterstützt die Autophagie andererseits aber auch Krebszellen, Stress zu begegnen, z. B. indem sie sie vor den zytotoxischen Folgen der Chemotherapie schützt. Basierend auf dieser Erkenntnis werden bereits klinische Studien vorgenommen, in denen die Kombination von Zytostatika mit dem Autophagie-Inhibitor Chloroquin an Krebspatienten getestet wird. Andere Studien allerdings zeigen, dass die Aktivierung der Autophagie auch zum Krebszelltod führen kann, womit ihre Inhibierung gänzlich kontraindiziert wäre. Die Gründe, warum die Autophagie den Krebszelltod sowohl hemmen als auch verstärken kann, sind bislang allenfalls ansatzweise verstanden. Um eines Tages therapeutische Erfolge durch die Autophagie-Modulation erzielen zu können, ist mithin noch viel Grundlagenforschung erforderlich.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es, einen Beitrag zur Klärung der komplexen Rolle der Autophagie in Neoplasien zu leisten. Erstmals wurde hier die konstitutive Autophagie-Aktivität in Krebszellen, und zwar in der Leukämie-Zelllinie MOLM-13, hinsichtlich des Zusammenhangs mit zellbiologischen Aspekten wie Zellzyklus, Metabolismus und Chemosensibilität untersucht. Dafür wurde eine vor kurzem Arbeitsgruppen-intern entwickelte Methode optimiert, die es erlaubt, Zellen nach ihrer autophagozytotischen Aktivität zu sortieren und für Anschlussversuche weiterzukultivieren. Auf Basis des Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID wurden die Zellen mit einem FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Sortiergerät in drei Populationen mit unterschiedlicher Autophagie-Aktivität fraktioniert; die drei Fraktionen wurden im Weiteren als Aut^{LO}, Aut^{ME} und Aut^{HI} bezeichnet. Die Cyto-ID-basierte Zellsortierung wurde mit Standardverfahren zum Nachweis der Autophagieaktivierung auf Proteinebene mittels Western Blot und auf Transkriptionsebene mittels Real-Time RT-PCR geprüft: Die Autophagie-Marker *microtubule associated protein 2 light chain 3* (LC3B-II) und *unc-51-like autophagy-activating kinase 1* (ULK1) erwiesen sich

in der Aut^{LO}-Fraktion als jeweils am niedrigsten und in der Aut^{HI}-Fraktion als jeweils am höchsten exprimiert. Dies validierte die Methode der Autophagie-spezifischen Zellsortierung. Eine potentielle Interaktion von Autophagie und Zellzyklus wurde mit Hilfe von Kombinationsbehandlungen mit dem Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin und dem Autophagie-Aktivator Etoposid, einem Zellzyklus-beeinflussenden Zytostatikum, untersucht. 3-Methyladenin unterband den Etoposid-induzierten Zellzyklusarrest, was einen ersten Hinweis auf einen Zusammenhang von Autophagie und Zellzyklus gab. Dieser Zusammenhang bestätigte sich in Zellzyklusanalysen von Cyto-ID-sortierten Zellen: Die Aut^{LO}-Zellen befanden sich weit überwiegend in der G1-Phase des Zellzyklus, während die Aut^{HI}-Fraktion von Zellen in der G2/M-Phase dominiert wurde. Expressionsanalysen mittels Western Blot und Real-Time RT-PCR bestätigten diesen Befund: Standardmarker für die G2/M-Phase, nämlich Cyclin B1 und phosphoryliertes Histon H3 (pS10H3) wie auch die mRNAs von Cyclin B1 und von der Polo-Like-Kinase 1, erwiesen sich als viel häufiger in der Aut^{HI}- als in der Aut^{LO}-Fraktion. Diese Ergebnisse zeigen eine differentielle Regulation der Autophagie-Aktivität während des Durchlaufens des Zellzyklus. Die Cyto-ID-sortierten Zellen unterschieden sich außerdem in ihrem Metabolismus, der mittels des Seahorse XF96 analysiert wurde. Mit steigender Autophagie-Aktivität nahmen der mitochondriale Metabolismus und die Glykolyse-Aktivität signifikant zu. Zuletzt wurde erstmalig mithilfe der Autophagie-spezifischen Zellsortierung der Einfluss der konstitutiven Autophagie auf die Wirkung von Zytostatika untersucht. Dabei zeigte sich, dass unterschiedliche Autophagie-Aktivitäten die Sensibilität der Zellen gegenüber vier verschiedenen Zytostatika, nämlich Cytarabin, Etoposid, Vincristin und Camptothecin, nicht beeinflussten.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir eine neue Methode in der Grundlagenforschung an konstitutiver Autophagie, nämlich die Autophagie-spezifische Zellsortierung, validieren und optimieren. Mithilfe dieser Methode gelang es uns Klarheit in das widersprüchliche Feld der Erkenntnisse über das Zusammenspiel zwischen Autophagie und Zellzyklus zu bringen. Wir konnten eine differentielle Regulation der Autophagie im Zellzyklus nachweisen, die sich durch eine Koexistenz signifikant erhöht exprimierter G2/M-spezifischer und Autophagie-spezifischer Marker sowohl auf Protein- als auch Transkriptionsebene zeigte. Somit kommen wir dem Ziel näher, den Autophagie-Prozess eines Tages gut genug zu verstehen, um ihn für therapeutische Zwecke modulieren zu können.

2 Einleitung

2.1 Akute Leukämien

2.1.1 Epidemiologie und Prognose

Im Jahr 2018 erkrankten circa 3,91 Millionen Menschen in Europa neu an Krebs und circa 1,93 Millionen Europäer starben im selben Jahr daran (Ferlay et al. 2018). Eine Hochrechnung über die Inzidenz und die Mortalität von 25 Tumorarten in 40 europäischen Ländern ergab, dass die häufigste Tumorart Brustkrebs, gefolgt von Darmkrebs, Lungenkrebs, und Prostatakrebs ist. Die Hälfte aller Krebserkrankungen europaweit wurden von diesen vier Tumoren abgedeckt (Ferlay et al. 2018). Laut dem „Bericht zum Krebsgeschehen 2016 in Deutschland“, veröffentlicht vom Robert-Koch-Institut, nahmen die Leukämien, akute und chronische, bei den Frauen 2,5 % und bei den Männern 3 % aller Neuerkrankungen an bösartigen Neubildungen ein. Betrachtet man nur die akuten Leukämien, so erkrankten circa 80 % an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) und nur 20 % an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Von allen Menschen, die an einer ALL erkrankten, sind 45 % unter 15 Jahre alt. Das mediane Neuerkrankungsalter betrug bei der ALL 20 Jahre, wohingegen es bei der AML bei 72 Jahren lag. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ALL vor allem im Kindesalter auftritt. In Zahlen sind 25 % aller Krebserkrankungen im Kindesalter Akute lymphatische Leukämien. Betrachtet man die Verteilung von ALL zu AML bei Patienten unter 15 Jahren im Vergleich zu Patienten über 15 Jahren, so drehen sich die prozentualen Anteile sogar um, womit von allen akuten Leukämien circa 80 % auf die ALL entfallen und nur 20 % auf die AML. Nicht nur die Verteilung ist eine andere, sondern auch die damit verbundene 5-Jahres-Überlebensrate. Diese beträgt bei Kindern (< 15 Jahre) für die ALL 92 % und für die AML 74 % in Deutschland (Kraywinkel und Spix 2017). Bei erwachsenen Patienten gilt: je höher das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, desto schlechter ist die Prognose und damit geringer das 5-Jahres-Überleben. Beispielsweise beträgt diese für die ALL 30 % und für die AML 34 % für Patienten, die zwischen dem 55. und dem 64. Lebensjahr erkranken (Kraywinkel und Spix 2017).

2.1.2 Definition und Ätiologie

Unter der Leukämie versteht man eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems. Es handelt sich hierbei um die unkontrollierte, klonale Vermehrung von hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen, die als Blasten im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut oder nach Infiltration extramedullärer Organe, zu finden sind. Diese malignen Zellen sind in ihrer Funktion beeinträchtigt. Durch die Akkumulation der Blasten im Knochenmark wird zudem

die normale Hämatopoese gestört, wodurch es zur Insuffizienz des Knochenmarks kommt. Als Resultat kann es zum Auftreten einer Anämie, Thrombozytopenie oder Granulozytopenie kommen, woraus sich die Hauptsymptome der Leukämie ableiten lassen. Die Herkunft der Blasten, also je nachdem ob eine Zelle der myeloischen oder lymphatischen Reihe neoplastisch transformiert ist, entscheidet, ob es sich um eine AML oder eine ALL handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde an der AML, die eine weitaus schlechtere Prognose im Kindesalter hat, geforscht.

Für die akkurate Diagnostik, die richtige prognostische Einschätzung und die Entwicklung zielgerichteter Therapien ist eine genetisch-basierende Klassifikation der AML unerlässlich (Watts und Nimer 2018). Die akute promyelozytische Leukämie oder die chronisch myeloische Leukämie, ebenfalls Neoplasien myeloischen Ursprungs, können mittlerweile durch Diagnose der Hauptmutation, welche jeweils zu einer Akkumulation eines onkogenen Fusionsproteins in der Zelle führt, sehr gut behandelt werden. Die Ursache für die Mutation per se ist meist unbekannt, erwiesen ist lediglich, dass ein paralleles Auftreten mehrerer DNA-Sequenz-Mutationen und epigenetischer Modifikationen eine entscheidende Rolle spielt (Watts und Nimer 2018). Chromosomale Anomalien (Down-Syndrom, Fanconi-Anämie), angeborene Immundefekte, Keimbahnmutationen und die Exposition von Karzinogenen wie Benzol oder ionisierende Strahlung sind bekannte prädisponierende Faktoren (Buffler et al. 2005, Moassass et al. 2018).

2.1.3 Klassifikationen und Prognosefaktoren

Ursprünglich wurden die akuten Leukämien anhand der FAB-Klassifikation (French-American-British Klassifikation) eingeteilt. Die AML konnte aufgrund ihrer zytomorphologischen Charakteristika, also je nach Ursprung der Leukämiezellen, in acht Untergruppen eingeteilt werden (M0-M7). Berücksichtigt wurden hierfür beispielsweise der Differenzierungsgrad der Blasten, das Vorhandensein von Auer-Stäbchen oder mögliche zytogenetische Aberrationen. Im klinischen Alltag wurde diese Einteilung von der WHO-Klassifikation (2016) abgelöst, die vor allem zyto- und molekulargenetische Kriterien mit einbezieht. Darunter werden Aspekte wie das Bestehen eines Zusammenhangs mit einem vorherig diagnostizierten myelodysplastischen Syndrom, einer Trisomie 21 oder einer vorausgegangenen Chemotherapie oder Radiatio berücksichtigt. Das Augenmerk liegt auf spezifischen genetischen Aberrationen, die entscheidend für die Prognosestellung sind. Nach der ELN (European LeukemiaNet) Klassifikation kann die AML anhand der genetischen Aberrationen in günstig (t (8;21), Inversion inv (16) etc.), intermediär I + II (t (9;21), *Wildtyp-*

NPM1 ohne FLT3-ITD etc.) und ungünstig (komplexe Aberrationen (> 3), Deletion von Chromosom 5 und 7 etc.) eingeteilt werden (Mrozek et al. 2012). Diese Einteilung erlaubt es, eine Aussage über das 5-Jahres-Überleben zu treffen. Neben den genetischen Veränderungen gilt auch das Alter bei Erstdiagnose als entscheidender Prognosefaktor, wobei gilt: je älter der Patient (> 60 Jahre), desto geringer die Chance auf eine komplette Remission (CR) und desto höher das Risiko eines Rezidivs. Daneben sind eine Leukozytenzahl von über 100.000/ μ l und eine therapierefraktäre AML negative Prognosefaktoren.

2.1.4 Therapie

Durch den Zugang zu modernen molekulargenetischen Verfahren konnte insbesondere die Therapie kindlicher AML-Patienten in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Beispielsweise konnten mittels Next Generation Sequencing einige Mutationen in den AML-Blasten der Patienten aufgefunden werden, die zu neuen Ansätzen in der Entwicklung gezielter Therapien beitragen (Watts und Nimer 2018). Allgemein muss bei der Therapie von AML zwischen jungen, nicht komorbiden und alten oder komorbiden Patienten unterschieden werden. Ziel jeder Induktionstherapie ist das Erreichen der CR. Die CR definiert sich durch einen Blastenanteil von < 5 % im Knochenmark, ein Ausbleiben einer extramedullären Manifestation und das Ausbleiben von Auerstäbchen und eine Thrombozytenzahl von > 100.000/ μ l und einer Neutrophilenzahl von > 1000/ μ l. Bei jungen (< 60 Jahre) Patienten kommt es im Gegensatz zu alten Patienten bereits bei einer Verzögerung des Beginns der Therapie von mehr als fünf Tagen nach Diagnosesicherung zu einer Verschlechterung der Prognose und der Therapieergebnisse (Sekeres et al. 2009). Im Folgenden wird beispielhaft das Therapieregime für junge AML-Patienten beschrieben. Die Induktionstherapie für junge AML-Patienten besteht aus dem „7 + 3“-Regime, worunter man eine 7-tägige kontinuierliche Behandlung mit Cytarabin kombiniert mit einem Anthracyclin, d. h. Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron, von Tag 1-3, versteht (Dombret und Gardin 2016). Zusätzlich wird bei zytogenetischer Sicherung einer FLT3-Mutation, wobei es sich um eine aktivierende Mutation der Signaltransduktion handelt (Watts und Nimer 2018), von Tag 18-21 der Induktionstherapie Midostaurin gegeben. Midostaurin ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der zum einen mutierte Formen von FLT3 direkt inhibiert und zum anderen zusätzliche Kinasen, die direkt eine Rolle bei der Dysregulation von Signalwegen in der AML spielen, ebenfalls inhibiert (Manley et al. 2018). Bei Patienten mit CR schließt an die Induktionstherapie die Konsolidierungstherapie an, um die CR zu festigen und einen Rückfall der AML zu verhindern. Je nach Risikoprofil der AML und Allgemeinzustand des Patienten wird entweder Patienten mit günstiger Prognose

hochdosiertes Cytarabin verabreicht oder bei Patienten mit ungünstiger Prognose eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt (Dohner et al. 2017). Unter Berücksichtigung einer vorliegenden FLT3-IDT- oder FLT3-KIT-Mutation wird die Chemokonsolidierung modifiziert oder eine Stammzelltransplantation vorgenommen (Cornelissen et al. 2012). Sollte es nach abgeschlossener Konsolidierungstherapie zu einem Rezidiv kommen, wird erneut intermediär bis hochdosiert Cytarabin als Reinduktionstherapie eingesetzt. Für die anschließende Konsolidierung ist eine allogene Stammzelltransplantation Mittel der Wahl. Ein festes Regime jedoch gibt es nicht. Die Rezidivtherapie wird für jeden Patienten individuell entschieden. Es bestehen neben Midostaurin einige weitere neue Therapieansätze, die bereits verschiedene Phasen der klinischen Studien durchlaufen (Watts und Nimer 2018). Eine Verbesserung der Prognose junger AML-Patienten wurde trotz des beibehaltenen „7+3“-Regimes vermerkt. Diese ließ sich vor allem auf die verbesserte Supportivtherapie zurückführen (Othus et al. 2014).

Interessanterweise wurde in den letzten Jahrzehnten neben der Zugänglichkeit zur Untersuchung des genetischen Materials von AML-Zellen auch ein weiterer zellulärer Mechanismus zum Vorschein gebracht, der sich eventuell als neues Therapieziel anbieten könnte. Dabei handelt es sich um die Autophagie, einen Prozess, der im Folgenden genauer beschrieben und Schwerpunkt dieser Dissertation sein wird. Das Erforschen dieses intrazellulären Mechanismus steht momentan im Mittelpunkt der zellbiologischen Forschung, seit bekannt wurde, dass Störungen des physiologischen Autophagie-Prozesses ursächlich für eine Vielzahl von Erkrankungen sind (Levine und Kroemer 2008).

2.2 Autophagie

Christian de Duve beschrieb 1963 erstmalig den Prozess der Autophagie (griechisch: Selbstverdauung) (Harnett et al. 2017). Darunter verstand er den Transport intrazellulären Materials zum Lysosom zur dortigen Degradierung. In den darauffolgenden Jahren konzentrierte sich die Forschung vor allem auf die Aktivierung der Autophagie durch Nährstoffmangel. Der biochemische Prozess dahinter konnte aber erst in jüngster Zeit durch die Arbeit des Forschers Yoshinori Ohsumi besser verstanden werden. Er beschrieb ausführlich den Prozess der Autophagie in Hefezellen und machte 15 Autophagie-relevante (im Folgenden Atg) Proteine ausfindig. Dafür wurde ihm 2016 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen (Ke 2017). Aufgrund seiner Entdeckung wurde das Feld der Autophagie neu aufgerollt und es wurden massive Erfolge im Verständnis der Funktion, des molekularen Mechanismus und des sich daraus ergebenden therapeutisch relevanten Angriffspunkts

verzeichnet. Autophagie-Mechanismen wie die Mikroautophagie, bei der Bestandteile des Zytosols durch Membraninvagination ins Lysosom eingeschlossen werden, und die Chaperon-vermittelte Autophagie, die HSC70-markierte Proteine durch Bindung an einen auf zytosolischer Seite des Lysosoms gelegenen Rezeptor (LAMP2 α) ebenfalls direkt zum Abbau ins Lysosom schleust, wurden entdeckt (Montecucco et al. 2015). Die Makroautophagie, der besterforschte Autophagie-Prozess (im Folgenden Autophagie), beschreibt einen katabolen intrazellulären Mechanismus, der auf basalem Niveau zur zellulären Homöostase beiträgt und durch Zellstressoren wie Nahrungsmangel, ROS-Akkumulation, Infektionen oder auch DNA-Schäden zusätzlich induziert werden kann (Dikic und Elazar 2018a). Es handelt sich um eine Art zellprotektive „Selbstverdauung“. Die Zelle wird dabei sowohl von alten, funktionslosen Zellorganellen (vor allem Mitochondrien) als auch anderen zytoplasmatischen Bestandteilen wie fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen befreit. Die Zelle versucht durch den Prozess der Autophagie ihr Überleben zu sichern. Dies geschieht zum einen durch die Versorgung der Zelle mit den energiereichen Abbauprodukten des degradierten Materials, zum anderen durch die Eliminierung des zellschädigenden intrazellulär akkumulierten Materials (Rabinowitz und White 2010). Auch wenn physiologische Level der Autophagie für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essentiell sind, können durch verschiedenste Zellstress-induzierende Umstände unkontrolliert hohe Level an Autophagie existieren und darüber zum Autophagie-abhängigen Zelltod führen (Liu und Levine 2015). Zudem existiert auch eine Form eines Autophagie-abhängigen nicht-apoptotischen Zelltods, der als Autosis bezeichnet wird und auch durch Autophagie-stimulierende Faktoren wie Nährstoffmangel oder Hypoxie induziert werden kann (Liu und Levine 2015). Je nach Kontext kann die Autophagie eine Zelle vor dem Zelltod schützen oder diesen initiieren (Li et al. 2017). Eine tiefgründige Erforschung dessen steht momentan im Raum, da vor allem in Hinblick auf die Therapie von bestimmten Krankheiten mittels Autophagie-Modulatoren die Interaktion der Autophagie mit dem Zelltod bekannt sein sollte (Yonekawa und Thorburn 2013). Die Dysfunktion dieses lebensnotwendigen Mechanismus trägt maßgeblich zur Entstehung verschiedener Krankheiten bei (Levine und Kroemer 2008).

2.2.1 Zellulärer Mechanismus der Autophagie

Der Prozess der Bildung des Phagophors bis zum Abbau des enthaltenen Materials wird als *autophagic flux* bezeichnet und beschreibt einen dynamischen, mehrstufigen Prozess (Dikic und Elazar 2018a). Dieser lässt sich grob in fünf Abschnitte gliedern: die Induktion, gefolgt von der Phagophoren-Bildung, der Phagophoren-Expansion, der Reifung und Fusion zum

Autolysosom und der abschließenden Degradation des enthaltenen Materials. Die Induktion besteht aus der Rekrutierung von Atgs zu einer spezifischen subzellulären Region, der *phagophore assembly site* (PAS) (Dikic und Elazar 2018a). Dort wird eine einfache Isolationsmembran gebildet, die sich um das abzubauen Material stülpt (Phagophorbildung und -expansion), fusioniert und sich daraus zur doppelten Biomembran entwickelt (Autophagosom). Um mit dem Lysosom zu verschmelzen, lösen sich die meisten Atgs und das Autophagosom wird über ein Mikrotubulisystem zum Lysosom transportiert (Monastyrska et al. 2009). Dort verschmelzen die äußere Membran des Autophagosoms und die Lysosomenmembran (Autolysosom) und der Inhalt des Autophagosoms, umhüllt von einer einfachen Membran (*autophagic body*), wird durch die lysosomalen Hydrolasen abgebaut. Der Prozess endet mit der Freigabe der Abbauprodukte ins Zytoplasma (Yin et al. 2016).

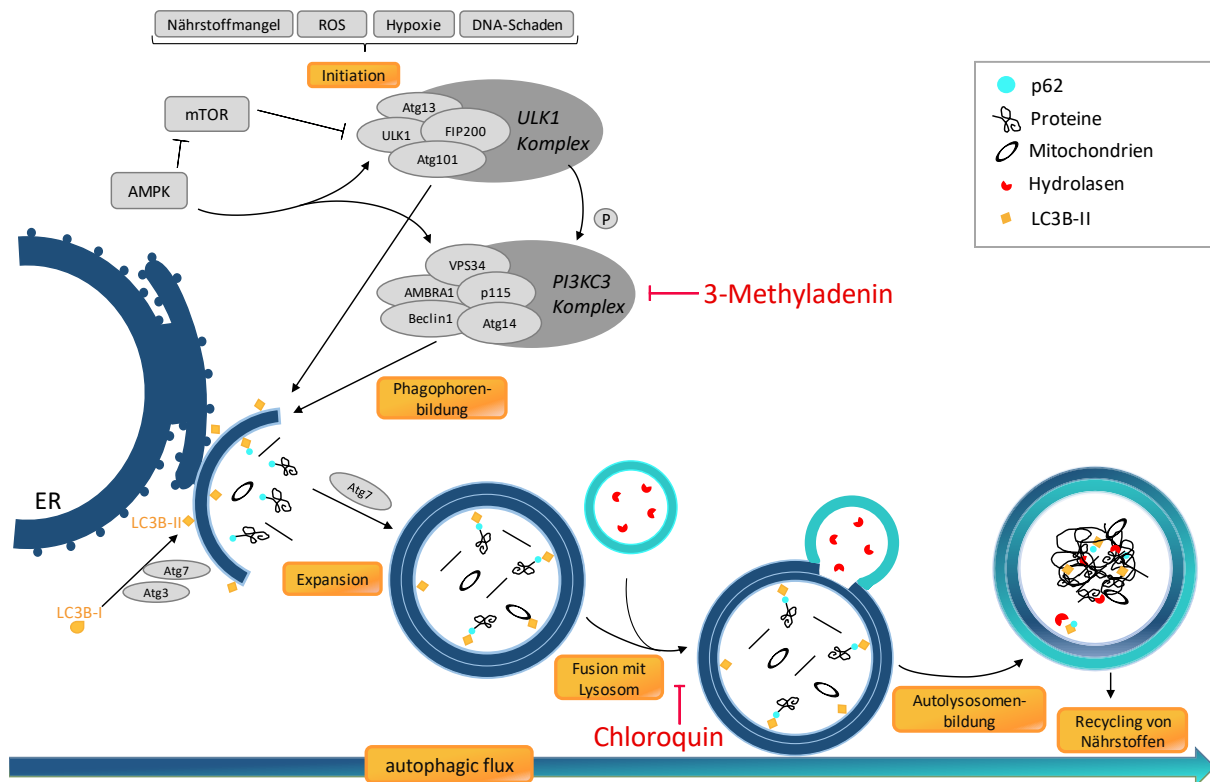


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Autophagie-Prozesses und spezifischer Inhibitoren. Gezeigt ist die Beteiligung einzelner Atgs am Prozess sowie den Werdegang des abzubauenen Materials von der Umhüllung bis hin zum Abbau im Lysosom. Gezeigt auch der Ort der Inhibition von 3-MA und CQ (Wirkmechanismus siehe 2.2.4).

1. Induktion: Der Hauptregulator des Zellwachstums durch die Eigenschaft als Nährstoffsensoren ist die Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Yang und Klionsky 2010). Bei nährstoffreichen Bedingungen inhibiert mTORC1 (einer der beiden vorkommenden Proteinkomplexe von mTOR) die Autophagie. Bei zellulärem Stress, wie beispielsweise Aminosäuren-Mangel, wird mTORC1 unter anderem durch Phosphorylierung

an der ULK1-bindenden Domäne inhibiert, wodurch dann, durch fehlende Inhibition, die Autophagie induziert wird (Parzych und Klionsky 2014). Die Initiationskinase ULK1, die im Zustand von Nährstoffreichtum durch Phosphorylierung inaktiviert und mit Atg13 an mTORC1 gebunden vorliegt, kann nun von mTORC1 dissoziieren. Es folgt die Autophosphorylierung von ULK1, die anschließend Atg13 und FIP200 aktiviert (Dikic und Elazar 2018a). Die AMPK (5' *AMP-activated protein kinase*), die zellulären ATP-Mangel detektiert, kann sowohl über die Inhibition von mTORC1 Autophagie-induzierend wirken als auch unabhängig davon über die direkte Phosphorylierung von ULK1 und Hauptbestandteile des PI3KC3-Komplex-1, VPS34 und Beclin1, die für die Phagophoren-Bildung zuständig sind, induzierend wirken (Kim et al. 2011). Daneben wurden kürzlich auch weitere Transkriptionsregulatoren entdeckt, die die Autophagie auf genetischer Ebene regulieren (Dikic und Elazar 2018a).

2. Bildung des Phagophors: Die Entstehung des Phagophors findet an der PAS am endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Die Membran-Abschnitte der PAS sind reich an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), durch das Protein ZFYVE1 (*Zink-Finger FYVE domain-containing protein 1*) markiert und werden als „Omeegasom“ bezeichnet (Abada und Elazar 2014). Forschungsergebnisse zeigten, dass zell- und kontextabhängig ER-Mitochondrien (Hamasaki et al. 2013), ER-Plasmamembranen (Graef et al. 2013), Golgi-Komplexe (van der Vaart et al. 2010), Plasmamembranen (Moreau et al. 2011) und recycelnde Endosomen (Puri et al. 2013) als mögliche PAS dienen und eventuell Membranbestandteile zur Formation der Isolationsmembran beisteuern. Die eigentliche Formation des Phagophors stellt sich als sehr komplexer Prozess dar und ist noch wenig verstanden. Es wird angenommen, dass die PAS-Bildung die Aktivierung des Initiationskomplexes ULK1, des PI3KC3-Komplex-1, der aus der Klasse III PI3K Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), Beclin 1, Atg14, AMBRA1 (*activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*) und dem p115 (*general vesicular transport factor*) besteht und die simultane Aktivierung der Phosphatidylinositol-Synthase beinhaltet (Dikic und Elazar 2018a). Um die Membranexpansion zu unterstützen, werden womöglich weitere Lipide und Proteine über Vesikel des sekretorischen Wegs, die Atg9 als Transmembranprotein besitzen, an die PAS geliefert (He et al. 2008). Der PI3KC3-Komplex-1 phosphoryliert Phosphatidylinositol zu PI3P. Die PI3P-Anreicherung am Omeegasom rekrutiert über PI3P Effektorproteine (wie WIPI2 und DCFP1) Atg16L1, das an der Bildung des dimeren Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplex beteiligt ist (Abada und Elazar 2014). Diesem Schritt geht die Aktivierung von Atg12 durch Atg7 und die anschließende Konjugation an Atg5 durch Atg10 voraus (Hamasaki et al. 2013).

3. Expansion des Phagophors: Mit der Rekrutierung des Atg12-Atg5-Atg16L1-Komplexes beginnt bereits die Ausdehnung der Phagophorenmembran und das Einschließen des intrazellulären Materials (Dikic und Elazar 2018a). Die *Ubiquitin-like* Atg8-Proteine (LC3-Familie) spielen hierbei eine besonders große Rolle (Slobodkin und Elazar 2013). Die humane LC3-Familie besteht aus drei Hauptmitgliedern: LC3A, LC3B und LC3C, wobei vor allem die Detektion der LC3B-Proteine der Autophagie-Nachweismethode dient (Koukourakis et al. 2015). Pro-Atg8/Pro-LC3 wird durch Atg4, eine Cysteinprotease, gespalten. Das entstandene LC3-I-Molekül (*microtubule associated protein 1 light chain 3*) wird durch Atg7 aktiviert und anschließend durch Atg3 über den C-Terminus an membrangebundenes Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert (Hamasaki et al. 2013). Dafür muss Atg3 zuerst spezifisch durch den Atg12-Atg5-Komplex, der zuvor rekrutiert wurde, aktiviert werden. Aus löslichem LC3-I entsteht letztendlich membrangebundenes LC3-II (Dikic und Elazar 2018a). Membrangebundenes LC3-II begünstigt die Expansion des Phagophors und womöglich auch das Schließen des Phagophors. Neben der Beteiligung an der Bildung des Phagophors haben die Proteine der LC3-Familie in der selektiven Autophagie die Funktion spezifisch durch Rezeptoren markiertes Abbaumaterial in das Phagophor einzuschließen. Ein bekannter Rezeptor ist p62/Sequestrom 1 (SQSTM1), der polyubiquitinierte Proteinaggregate bindet und diese zur PAS transportiert (Lamark et al. 2017). Um den Prozess der Expansion zu regulieren, kann Atg4, das zur Entstehung von LC3-I geführt hat, auch das membrangebundene LC3-II wieder von PE abspalten, wodurch der Prozess der Expansion gestoppt wird (Dikic und Elazar 2018a). Dieser Mechanismus wird streng reguliert, um die physiologische Funktion von LC3-II während der gewünschten Expansion nicht zu gefährden, gleichzeitig aber die übermäßige Expansion zu verhindern (Scherz-Shouval et al. 2007). Wie die Funktion von Atg4 reguliert wird, ist unklar. Es besteht die Vermutung, dass Atg4 womöglich durch ULK-1 reguliert wird (Pengo et al. 2017).

4. Reifung des Autophagosoms und Fusion mit dem Lysosom:

Die Expansion des Phagophors endet mit der Fusion der Isolationsmembran. Das Vesikel, das das abzubauen Material enthält, reift, bildet eine doppelte Biomembran aus und wird als Autophagosom bezeichnet (Yin et al. 2016). Vorbereitend für die Fusion mit dem Lysosom müssen zuerst noch an das Autophagosom gebundene Atgs dissoziieren. Es folgt die Rekrutierung von Proteinen, sogenannte *microtubule-based kinesin motors*, die für den Transport und die Fusion mit dem Lysosom notwendig sind. Auf der Autophagosomenmembran finden sich hierfür *syntaxin 17* und SNAP29 (*synaptosomal-associated protein 29*), auf der Lysosomenmembran VAMP8 (*vesicle associated membran*

protein 8) (Diao et al. 2015). Neueste Forschungsergebnisse zeigten, dass die Beteiligung post-translationaler Modifikationen, wie Phosphorylierungen der LC3-Proteine, womöglich ebenfalls eine Rolle bei der Autophagosomen-Reifung und der Fusion mit dem Lysosom spielen könnte (Dikic und Elazar 2018a). Durch die Fusion mit dem Lysosom wird sowohl das abzubauenende Material als auch die Membran durch lysosomale Hydrolasen abgebaut (Yin et al. 2016). Im letzten Schritt des Autophagie-Prozesses werden die lysosomal entstandenen Makromoleküle durch die Aktivität von Permeasen wie Atg22 ins Zytosol freigesetzt (Yang et al. 2006). Die Endprodukte können zur Energieproduktion verwendet werden und das Überleben der Zelle sichern.

2.2.2 Dysfunktion der Autophagie als Ursache verschiedener Pathologien: Schwerpunkt Tumorentstehung und Progression

Die zytoprotektive Funktion der Autophagie besteht vor allem in ihrem Beitrag zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Abada und Elazar 2014). Vor allem die basale Autophagie, also die autophagozytotische Aktivität, die jede Zelle besitzt, ohne dass spezifische Stressestimuli vorliegen, ist von besonderer Bedeutung (Glick et al. 2010). Dies impliziert, dass bei Störungen der Autophagie-Aktivität aufgrund chemischer, genetischer oder altersbedingter Umstände ein Auftreten von diversen Pathologien nicht unwahrscheinlich ist. Nachgewiesen wurde dieses Phänomen unter anderem bei der Entstehung und Progression von neurodegenerativen Erkrankungen (wie z. B. Morbus Alzheimer) und Erkrankungen des Immunsystems (rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus) (Levine und Kroemer 2008). Die Beteiligung an der Entstehung von Tumorerkrankungen rückte in den letzten Jahren immer weiter in den Vordergrund (Wilde et al. 2018). Anlässlich meiner Forschung an AML-Zellen wird dieser Zusammenhang im Folgenden genauer beleuchtet.

Durch die Beseitigung von akkumulierten, aggregierten Proteinen, die beispielsweise als Produkte von Genmutationen entstanden sind, nimmt die Autophagie womöglich eine tumorsuppressive Rolle ein (Wilde et al. 2018). Auch durch die Beseitigung von defekten Mitochondrien, die zu einer massiven intrazellulären Akkumulation von ROS führen können, die wiederum nachgewiesen karzinogen wirken, zeichnet sich die Autophagie als tumorsuppressiver Prozess aus (Chen et al. 2017). In Mausmodellen und Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass bei Ausschalten des BECN1-Gens, das für Beclin 1 codiert, die autophagozytotische Aktivität ab- und die Zellproliferation zunahm, was implizierte, dass es sich bei BECN1 womöglich um ein Tumorsuppressorgen handelt (Qu et al. 2003). Beclin 1 ist mit Vps34 maßgeblich an der Bildung des Phagophors beteiligt. Auch weitere Mutationen, wie beispielsweise Mutationen des Gens für BIF-1, einem Protein, das mit Beclin 1 an der

Phagophoren-Bildung beteiligt ist, wurden untersucht. BIF-1 Knockout-Mäuse zeigten eine gestörte Autophagosomen-Bildung und eine gesteigerte Tumorzinzidenzrate (Takahashi et al. 2007). Mortensen et al. (2011) zeigten, dass aus einer Deletion von Atg7 im hämatopoetischen Kompartiment in Mäusen ein Stillstand der Autophagie in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen resultierte, was durch intrazelluläre Akkumulation geschädigter Mitochondrien, erhöhte ROS-Level und vermehrte DNA-Schädigung nachgewiesen wurde. Die Folge der gestörten Autophagie war neben einer gravierenden Zytopenie und dem Ausbleiben einer physiologischen Hämatopoese vor allem das vermehrte Auftreten von abnormalen myelischen Zellen. Diese Studien zeigen, dass bei ausbleibender oder gestörter Autophagie und dem damit verbundenen Wegfallen des zytoprotektiven Mechanismus das Risiko einer Tumorentstehung stark ansteigt.

Es wurde aber auch gezeigt, dass Tumorzellen erhöht autophagozytotisch aktiv sind (Wilde et al. 2018). Ihre erhöhte Autophagie-Aktivität ermöglicht ihnen, therapieinduziertem Zellstress standzuhalten und bietet die Möglichkeit metabolischer Plastizität bei Nährstoffmangel (beispielsweise durch schnelles Tumorwachstum) (Yun und Lee 2018). In fortgeschrittenen Tumoren, vor allem RAS-mutierten Tumoren (Großteil der Pankreastumore), ist die Autophagie-Aktivität besonders gesteigert und ihre Inhibition in Mausmodellen führte zu einer reduzierten Proliferation und einer nachweisbaren Tumorregression (Perera et al. 2015). Die Idee der Hemmung der Autophagie als möglicher Angriffspunkt in Tumorzellen wurde bestärkt durch die Kenntnis, dass Zytostatika neben der zytotoxischen Wirkung auch oft eine Autophagie-induzierende Wirkung aufwiesen (Gao et al. 2011). Durch zeitgleiche Inhibition könnte eventuell der zytotoxische Effekt des Zytostatikums verstärkt und eine Therapie-Resistenzbildung vermindert werden (Hu et al. 2012). Jedoch besteht auch die Möglichkeit, die Autophagie zu aktivieren, um eine tumorspezifische Immunantwort zu generieren (Galluzzi et al. 2017a). Grundlage hierfür ist die Erkenntnis, dass Zellen, die beim Zelltod autophagozytotisch aktiv waren, vermehrt ATP und *high-mobility group box 1 protein B1* (HMGB1) ins umliegende Tumorgewebe freisetzen und damit vor allem Immun-Effektor-Zellen anlockten (Dikic und Elazar 2018a).

Die Autophagie-Aktivität wirkt sich nicht nur auf die Tumorzelle selbst, sondern auch auf die umliegende Tumormikroumgebung aus (Wilde et al. 2018). Dabei hängt die Autophagie eng mit der Biogenese und Sekretion von Exosomen zusammen. Exosomen transportieren Zellinhalte wie DNA oder non-coding RNAs aus der Zelle und leisten womöglich somit einen Beitrag zu der Entwicklung von Therapieresistenzen, Tumorwachstum und Modifikation der Mikroumgebung (Ruivo et al. 2017). Neben der lokalen Wirkung der Tumorzelle auf die

Umgebung kann die Autophagie-Aktivität einer gesunden Zelle möglicherweise einerseits vor Metastasierung schützen (Catalano et al. 2015), andererseits aber auch durch das Mitwirken beim *remodelling* von fokalen Adhäsionen Metastasierung begünstigen (Mowers et al. 2016). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Zusammenhang zwischen der Autophagie-Aktivität und der Progression und Entstehung von Tumoren als besonders komplex darstellt. Autophagie kann zell- und kontextabhängig sowohl die Tumorprogression verhindern und induzieren als auch Metastasierung positiv und negativ beeinflussen (Dikic und Elazar 2018a). Um gezielt pharmakologisch in die Autophagie-Aktivität einer Zelle einzugreifen, muss die genetische Ausstattung der Tumorzelle, die Art der Tumorzelle, die Tumorumgebung und das Tumorstadium berücksichtigt werden. Ziel ist, den gewünschten Effekt der Autophagie-Modulation zu erzielen, ohne die Krankheit zu verschlimmern.

2.2.3 Pharmakologische Modulation der Autophagie

Durch das zunehmende Verständnis des biochemischen Prozesses der Autophagie und der beteiligten Gene und Proteine rückt die Autophagie als mögliches Therapieziel in den Vordergrund (Galluzzi et al. 2017b). Es wurde in den letzten Jahren viel in die Entwicklung von Autophagie-modulierenden Substanzen investiert. Aufgrund der Komplexität existieren momentan pharmakologische Modulatoren, die meist nicht spezifisch sind (Galluzzi et al. 2017b). Für den Einsatz dieser Substanzen muss deshalb genau investiert werden, in welcher Konzentration, über welchen Zeitraum und unter welchen Umständen der Stoff zu applizieren ist, um *off-target*-Effekte zu vermeiden (Klionsky et al. 2016). Ziel ist es, letztendlich Wirkstoffe herzustellen, die *in vivo* hochspezifisch wirken und dabei nur geringfügige *off-target*-Effekte zeigen.

Die Autophagie als dynamischer mehrstufiger Prozess kann an verschiedenen Punkten gehemmt und aktiviert werden. Beispielhaft werden hier vier Substanzen, die an verschiedenen Punkten wirken und in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, beschrieben.

SRT1720, ein synthetisch hergestellter Sirtuin-1-Aktivator (Villalba und Alcain 2012), wird als Autophagie-Aktivator eingesetzt (Gu et al. 2016, Luo et al. 2019, Lahusen und Deng 2015). Sirt1 (Sirtuin 1) ist eine NAD⁺-abhängige Proteindeacetylase, die maßgeblich an der Regulation der zellulären Lebensdauer beteiligt ist. Hauptsubstrate von Sirt1 sind neben p53, einem bekannten Tumorsuppressor, Histon-Proteine und Transkriptionsfaktoren wie NF-kB, auch Komponenten der Autophagie-Maschinerie (Villalba und Alcain 2012, Lee et al. 2008). Lee et al (2008) beschrieben, dass Sirt1 als NAD-abhängige Deacetylase die Autophagie-relevanten Proteine Atg5, Atg7 und Atg8 direkt deacetylierte und bei Abwesenheit von Sirt1 die Atgs

wiederum vermehrt acetyliert vorlagen (Lee et al. 2008). Bestärkt wurde die Relevanz von Sirt1 in der Regulation der Autophagie durch den Vergleich von Sirt1(-/-)- und Atg5(-/-)-Mausmodellen. Es zeigten sich Gemeinsamkeiten in der Akkumulation von geschädigten Organellen (vor allem Mitochondrien), der perinatalen Mortalität und der gestörten zellulären Energiehomöostase (Lee et al. 2008). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Sirt1 auch in vivo eine wichtige Rolle bei der Regulation der Autophagie spielt. Durch SRT1720 wird die Aktivität von Sirt1 in vitro um circa 750 % gesteigert, es bindet dabei an der gleichen Molekülseite wie Resveratrol, ein in der Natur vorkommender Sirt1-Aktivator, ist dabei aber viel kompetenter (Villalba und Alcain 2012).

Etoposid, die vor allem als zytostatisch wirkend bekannte Substanz, wirkt ebenfalls Autophagie-induzierend (Xie et al. 2011). Etoposid ist ein Topoisomerase-II α (Topo-II α)-Inhibitor (Jacob et al. 2013). Die Topo-II α spielt eine fundamentale Rolle in biologischen Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Transkription, DNA-Reparaturmechanismen und dem Chromatin-Remodelling. Sie ist dafür zuständig, durch physiologisches Einfügen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) anhand zwei nacheinander ablaufender Transesterifikationen die DNA zuerst zu entwinden und aufzulockern und mit der zweiten Esterreaktion wieder zu relegen (Montecucco et al. 2015). Dabei bindet die Topo-II α in der ersten Reaktion als kovalentes Addukt an die Phosphatgruppe des DNA-Rückgrats und bildet einen *topoisomerase-cleaved DNA-Complex*, einen kurzlebigen intermediären Komplex. Etoposid stabilisiert diesen und verhindert die Relegung der davor gespaltenen DNA-Stränge (Montecucco et al. 2015). Dies führt zu toxischen DSB im Erbmateriale der Zelle, wodurch diese im Zellzyklus arretiert. Der Zellzyklusarrest dient der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen; scheitern diese, kommt es p53-vermittelt zum programmierten Zelltod (Woods und Turchi 2013). Der zytotoxische Effekt von Etoposid konnte auch in Zellen, die nicht proliferieren, nachgewiesen werden, wobei *topoisomerase-cleaved DNA-Complex* während der Gentranskription eingriff. Die Zelle wird meist in der S- bzw. G2-Phase des Zellzyklus arretiert (Montecucco et al. 2015). Der Zelltod kann jedoch auch über die Etoposid-aktivierten Autophagie-*pathways* induziert werden. Nicht geklärt werden konnte, ob die Induktion der Autophagie durch Etoposid zum Zelltod beiträgt oder das Überleben der Zelle stärkt. Katayama et al. (2007) beobachteten eine Etoposid-induzierte Autophagiesteigerung mit Anstieg der ATP-Produktion in „Multiple-Gliom“-Zellen. 3-Methyladenin (3-MA) inhibierte die Autophagie-induzierte ATP-Produktion und der nicht-apoptotische Zelltod nahm zu. Dieses Phänomen zeigte sich ebenfalls in HepG2-Zellen (Xie et al. 2011). Dies führte zu der Annahme, dass DNA-schädigende Substanzen wie Etoposid Autophagie-induzierend wirken.

3-Methyladenin, ein PI3K-Inhibitor und unspezifischer Autophagie-Inhibitor, beeinflusst die Initiation der Autophagie (durch Hemmung der Klasse III PI3K) negativ und verhindert die Formation und Degradation der Autolysosomen (Pasquier 2016) (siehe Abbildung 1). Die PI3-Kinasen lassen sich in drei Klassen einteilen. Im Prozess der Autophagie, vor allem bei der Initiation und der Reifung der Autophagosomen, spielt die Klasse III PI3K eine entscheidende Rolle. Jedoch hemmt 3-MA auch die Klasse I PI3K, die physiologisch durch ihre Produkte anti-autophagozytotische Wirkung aufweist (Klionsky et al. 2016). Zudem wurde gezeigt, dass die Klasse I PI3K durch 3-MA langfristig und die Klasse II PI3K nur transient gehemmt wird (Wu et al. 2010). Demnach konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass 3-MA bei langfristiger Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen und suboptimaler Wahl der eingesetzten Konzentrationen einen pro-autophagozytotischen Effekt zeigt und unter nährstoffarmen Bedingungen einen anti-autophagozytotischen Effekt (Wu et al. 2010). 3-MA wird regelmäßig als Autophagie-Inhibitor *in vitro* verwendet. Ziel wäre es, einen Klasse III PI3K-Inhibitor einzusetzen, der möglichst wenige *off-target*-Effekte aufweist. Bei Verwendung von 3-MA müssen die Ergebnisse kritisch, unter Berücksichtigung der Inkubationszeiten und der eingesetzten Konzentrationen, beleuchtet werden (Klionsky et al. 2016).

Chloroquin (CQ), eine lysosomal lokalisierte schwache Base, inhibiert die Autophagie als *postsequestration*-Inhibitor. CQ dringt als ungeladenes Molekül in das Lysosom ein, wird dort protoniert und führt zu einer Alkalisierung des lysosomalen Milieus (Steigerung des pHs) (Pasquier 2016). Damit verliert das Lysosom seine Funktion und der Inhalt des Autolysosoms kann nicht abgebaut werden (Redmann et al. 2017). Die Meinungen differieren, ob durch CQ bereits die Fusion von Autophagosom und Lysosom oder erst die Degradation im Autolysosom gestört ist (Mauthe et al. 2018). *In vitro* führt CQ zur Zunahme der Anzahl an Autophagie-Kompartimenten, also aller Zwischenstufen vom Phagophor bis hin zum Autolysosom (siehe Abbildung 1). Zu beachten ist, dass auch CQ *off-target*-Effekte auf die Zelle hat und deshalb die Ergebnisse in Betracht der Umstände achtsam bewertet werden müssen. CQ wird in der Forschung vor allem zum Nachweis der Wirkung von Autophagie-Modulatoren eingesetzt (Klionsky et al. 2016). Kommt es beim Nachweis von Autophagie-Markern zu einer Steigerung nach Applikation des Modulators, kann das entweder Resultat einer Stimulierung des *autophagic flux* oder Resultat eines gehemmten Autophagosomen-Abbaus sein. Durch simultane Inkubation mit CQ lässt sich eine Autophagie-Aktivierung von einer Inhibition des Degradierungsprozesses diskriminieren. Bei Autophagie-Induktion steigen die Autophagie-Marker unter CQ-Inkubation weiter an. Tun sie das unter CQ-Zugabe nicht, wird durch den

Modulator nicht der *autophagic flux* initiiert, sondern lediglich die Degradation der Autophagosomen blockiert (Klionsky et al. 2016).

2.2.4 Nachweis der Autophagie-Aktivität mittels Cyto-ID Green®

Da es sich bei der Autophagie um einen sehr komplexen mehrstufigen Prozess handelt, müssen verlässliche Nachweisverfahren etabliert werden, die diesen so gut wie möglich darstellen können. Zu den Standardmethoden zählen das Erkennen der Autophagosomen unter dem Elektronenmikroskop und das Einschleusen von transfizierten GFP-fusionierten LC3B-Genen, deren Genprodukt fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann (Klionsky et al. 2016). Ziel ist, den *autophagic flux* zu messen, der Auskunft über die Autophagie-Aktivität gibt. Eine neue Methode ergab sich aus der Entwicklung des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID Green® (im Folgenden Cyto-ID). Dieser amphiphile, kationische Fluoreszenzfarbstoff lagert sich spezifisch in die Autophagosomen und nur minimal in Endosomen und Lysosomen ein (Chan et al. 2012). Guo et al. (2015) zeigte, dass Cyto-ID nicht nur Autophagie-Kompartimente einfärbt, sondern auch eine Abschätzung des *autophagic flux* zulässt. Gezeigt werden konnte dies durch den kombinierten Einsatz von Autophagie-Modulatoren. Dabei wurde die Autophagie in verschiedenen Zelllinien aktiviert und zeitgleich der Abbau der Autophagosomen durch CQ gehemmt. Dies resultierte in einer Zunahme der Cyto-ID-Fluoreszenz und bei zunehmender Inkubationszeit von CQ zeigte sich ebenfalls eine parallele Zunahme der Cyto-ID-Fluoreszenz. Cyto-ID kann Zelllinien-unspezifisch eingesetzt und mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert werden, was eine gleichzeitige Aussage über verschiedene Eigenschaften der Zelle erlaubt. Ein weiterer Vorteil ist, dass jede Zelle als einzelne beurteilbar ist (Guo et al. 2015). In Hinblick auf die Notwendigkeit, die Autophagie-Aktivität zukünftig *in vivo* nachzuweisen, wird dieses Verfahren womöglich eine gesonderte Stellung einnehmen.

2.2.5 Ausblick

Momentan sind keine Autophagie-modulierenden Substanzen für die Therapie am Patienten erhältlich. Die Substanzen, die in klinischen Studien Verwendung finden, beispielsweise CQ (Verbaanderd et al. 2017), wurden zunächst für andere Zwecke entwickelt. Damit verbunden ist, dass die Substanzen nicht spezifisch die Autophagie beeinflussen, sondern auf viele weitere Stoffwechselwege einwirken. Um gezielt die Autophagie für die Behandlung eines Patienten zu beeinflussen, müssen noch einige Hindernisse überwunden werden. Zuallererst muss der Prozess der Autophagie auf genetischer wie auch molekularer Ebene besser verstanden und beschrieben werden. Dies erfordert die Entwicklung von Nachweismethoden, die sowohl in

vitro, aber noch wichtiger in vivo, zum einen die verschiedenen Formen der Autophagie verlässlich diskriminieren und zum anderen den wirklichen *autophagic flux* darstellen können (Galluzzi et al. 2017b). Diese Arbeit soll vor allem der besseren Charakterisierung unterschiedlich autophagozytotisch aktiver Zellen dienen. Hierfür wurden metabolische und molekulare Eigenschaften der AML-Zellen untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Zusammenhang von Zellzyklus und basaler Autophagie liegt.

2.3 Zellzyklus

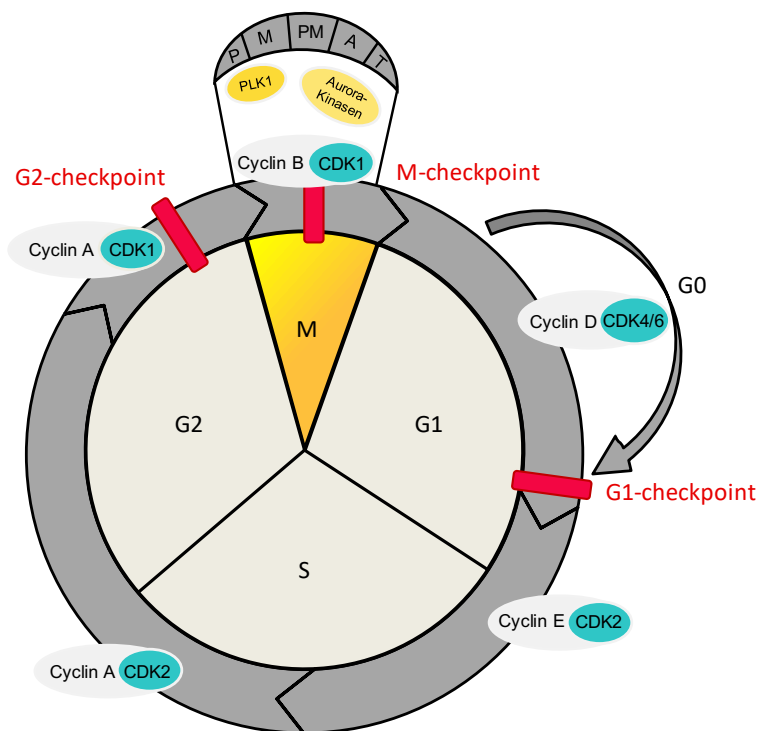


Abbildung 2: Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle.

G0-Phase entspricht Quiescence. G1-, S- und G2-Phase entsprechen der Interphase. M-Phase ist Mitose-Phase, die aus P = Prophase M = Metaphase, PM = Prometaphase, A = Anaphase und T = Telophase besteht.

Damit sich eine Zelle teilen kann, durchläuft sie einen streng regulierten molekularen Prozess, der als Zellzyklus bezeichnet wird. In der Interphase, die aus G1-, Synthese- (S-Phase) und G2-Phase besteht, nimmt die Zelle an Größe zu und dupliziert ihr Erbgut. In der darauffolgenden Mitose-Phase (M-Phase), die aus der Prophase, der Prometaphase, der Metaphase, der Anaphase und der Telophase besteht, findet die gleichmäßige Verteilung des Erbguts und intrazellulärer Bestandteile auf zwei genetisch identische Tochterzellen und die eigentliche Zellteilung (Zytokinese) statt (Mathiassen et al. 2017). Zellen können aus der G1-Phase in eine Ruhephase, G0-Phase (Quiescence), übergehen. Vor allem Zellen des ausdifferenzierten Gewebes befinden sich in dieser Phase (z. B.: Neuronen). Dieser Vorgang ist reversibel und unter wachstumsfördernden Bedingungen kann die Zelle wieder in den

Zellzyklus eintreten (Ingham und Schwartz 2017). Dieser hochkomplexe Prozess muss streng reguliert und kontrolliert ablaufen.

2.3.1 Kontrolle und Regulation des Zellzyklus

Als Antwort auf zellulären Stress bestehen innerhalb der Zelle Kontrollmechanismen in Form von regulatorischen Signalwegen, die als *checkpoints* bezeichnet werden (Barnum und O'Connell 2014). Kommt es in einer der Zellzyklusphasen zu zellulärem Schaden, können die Zellen an diesen Kontrollpunkten im Zellzyklus arretiert werden, um entweder Reparaturprogramme oder Signalwege, die den programmierten Zelltod hervorrufen, zu aktivieren. Diese Kontrollpunkte befinden sich am Ende der G1-Phase, am Übertritt der Zelle der G2- in die M-Phase und in der Metaphase (Sherr und Bartek 2017). Grundsätzlich wird der Zellzyklus vor allem durch unterschiedliche Cyclin-Konzentrationen gesteuert. Cycline regulieren allosterisch die Cyclin-abhängigen-Proteinkinasen (*cyclin-dependent-kinases; CDKs*), Serin/Threonin-Kinasen, die wiederum Schlüsselproteine, die für das Fortschreiten des Zellzyklus entscheidend sind, durch Phosphorylierung regulieren. In der G1-Phase wird durch externe Wachstumsstimulatoren die Ras-abhängige-Kinase-Kaskade aktiviert, die zu einer erhöhten Expression von D-Typ-Cyclinen führt (Foster 2008). Die D-Cycline interagieren mit und aktivieren CDK4/6. Das wichtigste Substrat des funktionellen Holoenzym CDK4/6-Cyclin D ist der Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (Rb) (Satyanarayana und Kaldis 2009). Rb ist das G1-Schlüsselprotein und bildet den Restriktionspunkt (Bartek et al. 1996). Hier wird entschieden, ob die Zelle irreversibel in die S-Phase eintreten wird. Rb bindet im inaktiven Zustand den Transkriptionsfaktor E2F, welcher dadurch inaktiv bleibt und die Zelle in der G1-Phase verweilen lässt. Der Aktivierung von Rb durch CDK4/6-Cyclin D folgt in der späten G1-Phase die Phosphorylierung durch CDK2-Cyclin E, wodurch E2F dissoziiert und die Transkription der Zielgene für die Zellzyklusprogression (z. B.: Cyclin E und A) und die DNA-Synthese induziert und der Übertritt in die S-Phase initiiert werden (Sherr und Bartek 2017). Für den Eintritt und das Durchlaufen der S-Phase sind erhöhte Cyclin A-Spiegel zuständig, die die CDK2 aktivieren und Schlüsselproteine der S-Phase, wie DNA-Replikationsproteine, phosphorylieren. Beim Übertritt der Zelle von der G2- in die M-Phase ist der Cyclin B-CDK1 Komplex, auch Mitose-Promoting-Faktor genannt, von Bedeutung (Foster 2008). Dieser akkumuliert in der G2-Phase im inaktiven Zustand und wird von der CDC25C-Phosphatase durch Entfernung der inhibitorischen Phosphorylierung aktiviert. Nach vollendeter Mitose sinkt die Cyclin B-Konzentration durch proteolytische Degradation mittels des Anaphase-Promoting-Faktors und die CDK1-Aktivität nimmt wieder ab (Stewart et al. 2003).

Serin/Threonin-Kinasen, die Aurora-Kinasen und die Familie der Polo-like-Kinasen (PLKs), haben eine regulatorische Funktion und sind nach Aktivierung vor allem für den Erhalt der Stabilität des Genoms bei der Zellteilung zuständig (Sherr und Bartek 2017). In menschlichen Zellen ist die Expression von fünf PLKs (PLK1-5) bekannt, wobei die PLK1 aufgrund ihres Einflusses auf den Eintritt und die Vollendung der Mitose, wie beispielsweise den Eintritt in die Anaphase oder das Ausrichten des Spindelapparats, eine Sonderrolle einnimmt (Lee et al. 2014).

Die Cyclinkonzentrationen werden durch gesteigerte Neusynthese (beispielsweise durch Wachstumsfaktoren), durch proteolytischen Abbau mittels Ubiquitinierung und laut neusten Forschungsergebnissen teilweise durch selektive Autophagie reguliert (Zheng et al. 2019). Neben den oszillierenden Cyclinkonzentrationen spielen CDK-Inhibitoren (CKIs) eine wichtige Rolle. Diesen gehören zwei Familien an, die INK4-Inhibitoren (p15, p16, p17, p18), die spezifisch CDK4/6 in der G1-Phase hemmen, und die CIP/KIP-Inhibitoren (p21, p27, p57), die CDK-Cyclin-Komplexe in verschiedenen Zellzyklusphasen inhibieren (Stewart et al. 2003). Der Tumorsuppressor p53, der vor allem am G1-*checkpoint* nach DNA-Schädigung zu einem Zellzyklusarrest führt, wirkt unter anderem über die Transkription des CIP-CKIs p21, welches den Cyclin E-CDK2 Komplex hemmt, und über die Transkription von p16, das den Cyclin D-CDK4 Komplex hemmt (Adimoolam et al. 2001).

2.3.2 Dysregulation des Zellzyklus und Tumorgenese

Die Fähigkeit gesunder Zellen, den Zellzyklus nach Auftreten von DNA-Schädigung zu arretieren, ist essentiell, um die Intaktheit des Genoms zu garantieren. Tumorzellen proliferieren charakteristisch unkontrolliert und unabhängig von intra- und extrazellulären Stimuli (Gutschner und Diederichs 2012). Defekte Checkpoint-Signalwege und Störungen in Teilen der Zellzyklus-Maschinerie tragen durch die Dysregulation von Onkogenen (Ras etc.) und Tumorsuppressorgenen (p53, Rb etc.) zur Tumorentstehung oder -progression bei (Foster 2008). Mutationen in Cyclin- oder CDK-Genen führen z. B. zu unphysiologisch erhöhten Cyclin-Konzentrationen und haben eine Umgehung der *checkpoint*-Mechanismen zur Folge. P53 wird als häufigste genetische Mutation in humanen Tumoren detektiert (Stewart et al. 2003). Mutiertes p53 oder Mutationen in Proteinen, die die Expression, Lokalisation oder Aktivität von p53 modulieren, haben zur Folge, dass CKIs wie p21 in ihrer Funktion gestört sind und somit zum Verlust der proapoptotischen Funktion von p53 führen. Da die Zellen nach DNA-Schädigung nicht in der G1-Phase arretiert, repariert oder eliminiert werden, führt dies

zur Akkumulation onkogener Läsionen, die an die Tochterzellen weitergegeben werden (Foster 2008, Stewart et al. 2003)

2.3.3 Zellzyklus und Autophagie

Da es sich bei der Autophagie um einen Prozess handelt, der auf basalem Level in jeder Zelle stattfindet und vor allem durch Zellstress induziert wird, liegt nahe, dass die Zellstress-induzierte Zellzyklusantwort eng mit der Autophagie korreliert (Mathiassen et al. 2017).

In den letzten Jahren schritt die Erforschung des möglichen Zusammenhangs zwischen Autophagie und Zellzyklus immer weiter voran. Grundgedanke ist dabei, dass ein besseres Verständnis des Zusammenhangs vielleicht zur Entwicklung von Anti-Krebstherapien beitragen könnte, die wirksamer und verträglicher für den Patienten sind. Bislang sind die Korrelation zwischen Stress-induzierter Zellzyklusantwort und gleichzeitiger Autophagie-Induktion, meist resultierend in einem G1-Arrest, und die Beteiligung selektiver Autophagie an der Zytokinese gut beschrieben (Mathiassen et al. 2017). Zunächst wurde angenommen, dass vor allem in der G1-/S-Phase die Autophagie erhöht aktiviert sei (Tasdemir et al. 2007). Kaminsky et al. (2011) widerlegten dies und zeigten, dass die Autophagie gleichermaßen in allen Zellzyklusphasen aktiv ist. Die Widersprüchlichkeit basierte womöglich auf stark variierenden experimentellen Ansätzen und auch der methodischen Schwierigkeit, die Autophagie zu messen. Zudem konnte in beiden Fällen methodisch keine Diskriminierung zwischen der G2- und der M-Phase vorgenommen werden. Vor allem in Bezug auf die Autophagie-Aktivität in der M-Phase liegen noch keine einheitlichen Ergebnisse vor. Zuerst vermuteten sowohl Eskelinen et al. (2002) als auch Furuya et al. (2010), dass die Autophagie-Aktivität in der M-Phase abnimmt. Ziyuhan Li et al. (2016) zeigten, dass sich die Autophagie-Aktivität vor allem innerhalb der M-Phase zu verändern schien und in dieser definitiv existierte. Dabei wurden eine Krebszelllinie und drei nicht-maligne Zelllinien mit verschiedensten methodischen Ansätzen untersucht. Höchste Werte im *autophagic flux* wurden der S-Phase und der frühen M-Phase zugeordnet, niedrigere Werte der G1-Phase, der G2-Phase und der späten M-Phase (Li et al. 2016). Bisher ist vor allem der Zusammenhang der Autophagie und der Stress-induzierten Zellzyklusantwort via p53 gut erforscht. Dabei dient eine Aktivierung der Autophagie durch Zellzyklusregulatoren als Antwort auf DNA-Schäden, um zellschädigende Substanzen zu entfernen, energiereiche Substrate zu produzieren und womöglich die Mobilisation und Aktivierung von DNA-Reparatur-Komplexen zu bewerkstelligen (Zheng et al. 2019). Maßgeblich scheint die selektive Autophagie an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und der Signalvermittlung der *DNA-Damage-Response* (DDR), einem

Signalnetzwerk, das unter anderem aus Zellzyklus-*checkpoints*, DNA-Schaden-Reparatur- und Toleranz-Signalwegen besteht, beteiligt zu sein (Zheng et al. 2019). Kenzelmann Broz et al. (2013) zeigten, dass p53 die Transkription einer Vielzahl Autophagie-relevanter Gene, vor allem als Antwort auf DNA-Schädigung, aktiviert. Es liegt nahe, dass Autophagie-Signalwege und p53-vermittelte Signalwege zusammenwirken, um gemeinsam ein möglichst effektives Zellzyklusprogramm als Reaktion auf Stressstimuli ablaufen zu lassen (Matthiasen et al. 2017). Es existieren viele Arbeiten, die die Regulation der Autophagie durch CDKs, CKIs oder *checkpoint*-Kinasen beschreiben, jedoch lässt sich die Vielzahl von Ergebnissen bis dato, aufgrund ihrer Widersprüchlichkeit, kaum zu definitiven Erkenntnissen vereinen (Zheng et al. 2019). Es scheint, als wirkten CDKs und Aurora-Kinasen eher inhibierend auf die Autophagie, und CKIs, die vor allem durch DNA-Schäden oder andere wachstumsinhibierende Signale aktiviert werden und das Fortschreiten des Zellzyklus verlangsamen, eher Autophagie-stimulierend. Zu beachten ist, dass dennoch zu vielen Zellzyklusproteinen, Kinasen oder auch PLKs Forschungsarbeiten existieren, die auch eine Autophagie-aktivierende Wirkung beschreiben (Zheng et al. 2019). Neuere Studien zeigen, dass vor allem die selektive Autophagie das fehlerfreie Ablaufen der DNA-Reparaturmechanismen und damit die Integrität des Erbmaterials sicherstellt, indem sie spezifische Zellzyklusproteine degradiert, bei der Zellteilung Einfluss nimmt und die DDR mit generiert (Zheng et al. 2019). Die Schwierigkeit der Untersuchung dieser Prozesse liegt in ihrer beider Komplexität und zudem in der mangelhaften Methodik, diese beiden Prozesse in Kombination zu betrachten. Ich versuchte erstmalig, unbehandelte MOLM-13-Zellen nach ihrer basalen Autophagie-Aktivität zu sortieren und eine Verbindung zum Zellzyklus herzustellen, ohne dabei die Zellen in irgendeiner Weise zu manipulieren. Zukünftig muss vor allem die Verknüpfung zwischen der Autophagie und dem Zellzyklus auf molekularer Ebene noch besser verstanden werden, sowohl in Tumorzellen als auch in gesundem Gewebe. Resultat wäre, Kombinationstherapien einsetzen zu können, die einerseits den Zellzyklus beeinflussen und andererseits die Autophagie so manipulieren, dass die protektiven anti-apoptotischen Mechanismen der Tumorzellen überwunden werden. Ziel wäre das Spektrum der Therapiestrategien zu erweitern, um Tumorkrankheiten noch effektiver bekämpfen zu können.

3 Zielstellung der Arbeit

Im onkologischen Forschungslabor der Kinderklinik wird seit kurzem der Prozess der Autophagie, besonders in kindlichen Tumoren, erforscht. Dabei wurde Arbeitsgruppen-intern erstmalig die Methode der durchflusszytometrischen Zellsortierung mittels eines Autophagie-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes, nämlich Cyto-ID, entwickelt. Diese ermöglicht, Zellen nach ihrer basalen Autophagie-Aktivität zu sortieren und im Anschluss weiterzuinkubieren und zu analysieren. Ziel meiner Arbeit war es, die basale Autophagie-Aktivität in der AML-Zelllinie MOLM-13 grundlegend zu analysieren und einen möglichen Zusammenhang mit dem Zellzyklus und der Chemosensibilität zu entschlüsseln. Zuerst sollte die Methode der Zellsortierung optimiert werden, indem Einflussgrößen wie die Temperaturempfindlichkeit und Zytotoxizität des Farbstoffs in Vorversuchen geprüft wurden. Anschließend sollte der Expression Autophagie-relevanter Proteine sowohl auf Genexpressionsebene mittels Real-Time RT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie nachgegangen werden. Anhand dessen sollten die Unterschiede der basalen Autophagie-Aktivität der Cyto-ID-sortierten Fraktionen nachgewiesen und damit die Methode der Zellsortierung validiert werden. Würden sich die Zellen auf basalem Niveau in ihrer Autophagie-Aktivität unterscheiden, sollten weitere tumorbiologisch interessante Parameter wie der Zellzyklus, der Energiemetabolismus und der Einfluss auf die Chemosensibilität charakterisiert werden. Zunächst aber sollte in Versuchen an unsortierten MOLM-13-Zellen die Wirkung Autophagie-induzierender (Etoposid und SRT1720) und -inhibierender (3-MA, CQ) Substanzen auf den Zellzyklus getestet werden. Im Anschluss sollte der Zellzyklus der Cyto-ID-sortierten Fraktionen untersucht und die Expression Zellzyklusphasen-relevanter Proteine und Gene nachgewiesen werden. Zuletzt sollte ein potentieller Einfluss unterschiedlicher Autophagie auf die Chemosensibilität anhand der Cyto-ID-sortierten Zellen untersucht werden, indem sie mit Etoposid, Cytarabin, Camptothecin und Vincristin behandelt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit könnte es erstmalig gelingen, die Unterschiede der basalen Autophagie in AML-Zellen zu verdeutlichen und deren Relevanz im Zusammenhang mit tumorbiologischen Parametern wie Zellzyklus, Energiemetabolismus und Chemosensibilität zu hinterfragen. Diese neuen Erkenntnisse in Bezug auf die basale Autophagie-Aktivität in AML-Zellen würden einen erheblichen Beitrag zu dem rapid wachsenden Forschungsfeld der Autophagie leisten. Dabei könnte vor allem die Methode der Autophagie-spezifischen Zellsortierung Grundlage für viele weitere Forschungsarbeiten zur Aufklärung der Bedeutung der basalen Autophagie in Bezug auf diverse zelluläre Mechanismen und in verschiedensten Tumorarten dienen. Mögliche Zusammenhänge des Zellzyklus, Energiemetabolismus oder der

Chemosensibilität mit der basalen Autophagie in AML könnten überdies zukünftig bei der Entwicklung neuer AML-Therapien von Nutzen sein.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Die angeführten Chemikalien wurden von der Universitätsapotheke direkt bezogen.

4.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific
Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Science
AxioCam MR	Carl Zeiss; Leica
AxioImager ApoTome microscope	Carl Zeiss; Leica
BBD 6220 CO2 Brutschrank	Thermo Scientific
BD FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD FACSAria Fusion	BD Biosciences
BD FACSAria III	BD Biosciences
BioPhotometer plus	Eppendorf
Eismaschine	Nordcap
Fast Real-Time PCR System (7900 HT)	Applied Biosystems
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
HERA safe KS 12, Sterilwerkbank	Heraeus Thermo Scientific
Inkubator BBD6220 (37 °C; 5 % CO ₂)	Heraeus Thermo Scientific
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr; Bosch
Mikroskop	Carl Zeiss Jena; Leica
Mikrozentrifuge	Labaratory & Medical Supplies
Multipette® plus	Eppendorf
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany
Pipetten Eppendorf Reference variabel 0,5-10, 10-100, 50-200, 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand
Präzisions-Quarzküvette	Hellma, VWR International

Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml	Eppendorf
Seahorse XF96	Aligent Technologies
Thermal Reactor	Biometra
Tischzentrifuge Universal 16 A	Hettich, B�ch, Schweiz
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., New York
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zellz�hler Counter AC-15	Karl Hecht AG
Zentrifuge Rotanta/TR	Hettich, B�ch, Schweiz
Zen 2.0 lite software	Carl Zeiss
7900 HT Fast RT-PCR System®	Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5ml	BD Biosciences
Cellstar® Zellkulturplatten 6/12 Well	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Kulturflasche 5/20 ml	Greiner bio-One GmbH
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One GmbH
Combitips Plus 1,0/2,5/5,0/10,0/25,0 ml	Eppendorf
Collection Tubes 1,5/2 ml	Quiagen
Deckgläser (plan geschliffen)	Menzel
Kan�len	BD Biosciences
Nitrilhandschuhe	R�sner-Mautby Meditrade
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Pasteur-Plastikpipetten, 3 ml	Greiner Bio One, Ratiolab GmbH
Pipettenspitzen 10/200/1000 µl	Eppendorf
QIAshredderSpin S�ule	Qiagen
RNeasy Mini Spin S�ule	Qiagen

Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml	Eppendorf
Seahorse Zellkulturplatte XF96	Aligent Technologies
Light Protection Tubes, brown	ROTH

Tabelle 2: Verwendetes Material.

4.1.3 Reagenzien, Medien, Puffer und Kits

Chemikalien	Hersteller
Antimycin-A	Sigma Aldrich
BD™Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
Camptothecin	Zytostatika Apotheke FSU Jena
Chloroquin	Enzo Life Science
Cytarabin	Zytostatika Apotheke FSU Jena
Cyto-ID®	Enzolifescience
DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride)	Sigma Aldrich
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
DiIC1(5) (1,1'3,3,3'3'Hexamethylindodicarboxyaniniodid)	Molecular Probes
DiOC6(3) (3'3-Dihexyloxacarboxyaniniodid)	Molecular Probes
D-Glukose	Sigma Aldrich
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA Laboratories
DRAQ-5™	Thermo Scientific
ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence)	Thermo Scientific
Ethanol	Merck
Etoposid	KIM-Zytostatika Apotheke FSU Jena

Farbloses RPMI-1640 (RPMI 1640 ohne Phenolrot, 5 % FKS; Glutamin)	Capricorn Scientific
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen
Mini-Plasco® connect, Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen
Natriumpyruvat	Thermo Scientific
Oligomycin	Abram
Omniscript® RT Kit QIAGEN (10xBuffer-RT, dNTP-Mix, Omniscript-RT)	QIAGEN
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250kDa	Thermo Scientific
PBS (phosphate buffered saline)	PAA Laboratories
pegGOLD DNase I Digest Kit (DNase-Verdau)	Peqlab
Penicillin G/Streptomycin	PAA Laboratories
PI (Propidiumiodid)	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Scientific
PVDF (Polyvinylidenfluorid)	BioRad
Random-Hexamer	Qiagen
RNase A	Roche
RNase-freies Wasser	Qiagen
RNase OUTTM	Invitrogen
RNeasy® Mini Kit (250) (RLT-Lyse-Puffer, RW1-Waschpuffer, RPE-Waschpuffer)	Qiagen
Rotiphorese® SDS-PAGE Puffer	Carl Roth
RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	Capricorn Scientific

Seahorse XF RPMI Medium	Aligent Technologies
SRT1720	Selleckchem
SYTOX™ Blue Nucleic Acid Stain	Thermo Fisher Scientific
TaqMan® Gene Expression Assay (Primer-Sonden-Mix, Universal PCR Master Mix): β2M Hs00187842_m1 Cyclin B1(CCNB1) Hs01030099_m1 MAP1LC3B Hs00797944_s1 ULK1 Hs00177504_m1 PLK1 Hs00983227_m1	Applied Biosystems
Triton X-100	SIGMA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Vincristin	Zytostatika Apotheke der FSU Jena
2,4-Dinitrophenol	Sigma Aldrich
3-Methyladenin	Cayman Chemical Company

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien, Medien, Puffer und Kits.

4.1.4 Zelllinie

Die Zelllinie stammt von der DSMZ, Braunschweig (alle Angaben laut DSMZ).

MOLM-13: humane AML-Zelllinie, 1975 aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Jungen mit Rezidiv, nach initial myelodysplastischem Syndrom, gewonnen; p53 Wild-Typ

Morphologie: runde Suspensionszellen

DSMZ-Nummer: ACC 554

Vollmedium: 500 ml RPMI 1640
100 ml fetales Kälberserum (FKS)
100 Units/ml Penicillin G + 0,1 mg/ml Streptomycin

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Das Arbeiten mit der Zellkultur fand stets unter einer sterilen Werkbank von Thermo Scientific statt. Alle zu benutzenden Geräte und Materialien wurden vorher desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert.

4.2.1.1 Zellkultivierung und Passagieren der Zellen

Das Auftauen der Zelllinie wurde von Frau Sabine Becker übernommen. Die Zellkulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die MOLM-13-Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert, das heißt, in neuem Nährmedium suspendiert. Zuerst wurde die Zellsuspension lichtmikroskopisch nach Zelldichte und Homogenität beurteilt. Anschließend wurde unter der Werkbank der Inhalt der Zellkulturflasche (75 cm²) mit einer serologischen Pipette in ein 50 ml Röhrchen überführt. Um keine Zellen zu verlieren, wurde die Zellkulturflasche mit 10 ml des zellspezifischen Vollmediums, welches zuvor im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt wurde, gespült. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1200 Umdrehungen/min (U/min) wurde der Überstand abgekippt und das Zellsediment mit einer sterilen Pasteurpipette in 20 ml frischen Mediums vereinzelt, bis eine homogene Lösung entstand. Davon wurden 20 µl in ein Zählröhrchen gegeben, um die Zellzählung, wie unter 4.2.1.2 beschrieben, vornehmen zu können. Nach dem Zählen wurde eine neue Zellkulturflasche angelegt, in die die gewünschte Zellzahl eingesät wurde. Eine Zellkulturflasche wurde für maximal zwei aufeinanderfolgende Passagen verwendet. Für die Kultivierung über drei Tage wurden 10 x 10⁶ Zellen und für diejenige über vier Tage 8 x 10⁶ Zellen eingesät.

4.2.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur quantitativen Bestimmung der Zellzahl wurden die entnommenen 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit 0,5%igem Trypanblau in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt, mit einer Pipette homogenisiert und anschließend mit dem Vortexer vermischt. 20 µl davon wurden in die Neubauerzählkammer gegeben. Diese besteht aus vier großen Quadranten (0,1 µl), von denen zwei diagonal liegende, die wiederum aus 16 kleinen Einzelquadranten bestehen, ausgezählt wurden. Dies erfolgte lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme der Zählhilfe „Counter AC-15“.

Der saure Farbstoff Trypanblau lagert sich nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran ein, was zur Identifizierung von blauen toten und ungefärbten lebendigen Zellen führt. Diese

Diskriminierung erlaubt sowohl die Anzahl an vitalen Zellen als auch die Vitalität der gesamten Zellkultur zu errechnen.

$$\text{Vitale Zellen auf 1ml Zellsuspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}}$$

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{vitale Zellzahl} \times 100\%}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

4.2.1.3 Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche

Nach Anlegen der neuen Zellkulturflasche wurden ebenfalls die 12-Wellplatten für die anstehenden funktionellen Experimente angelegt. Die benötigte Menge an Zellsuspension wurde unter Betracht der ausgezählten Zellzahl/Milliliter ermittelt. Für einfache Kombinationsbehandlungen wurden die MOLM-13-Zellen mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen/Well (1 ml Gesamtvolumen) ausgesät. Für die Experimente nach Zellsortierung wurden die Wells mit 100.000 Zellen/Well angelegt. Ermittelt wurde dann die benötigte Menge der Zellsuspension unter Berücksichtigung der ausgezählten Zellzahl/Milliliter. Diese wurde dann in ein 50 ml Röhrchen gegeben, in dem das errechnete Volumen an Vollmedium, um ein Endvolumen von 1 ml/Well zu erreichen, bereits vorgelegt war. Mit einer Multipette wurde je 1 ml der entstandenen Zellsuspension pro Well ausgesät. Das gleiche Prozedere wurde bei den sortierten Zellen durchgeführt, Unterschied war lediglich die Zellzahl pro Well.

4.2.1.4 Wirkstoffapplikation

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration der SL	Konzentrationen	IKZ
Camptothecin	Topoisomerase-I-Hemmstoff	10 mM	0; 5; 10; 20 nM	48 h
Cytarabin	Antimetabolit	2 mM	0; 2; 4; 6 μ M	24 h
Etoposid	Topoisomerase-II-Hemmstoff	50 mM	0; 1; 2; 5 μ M	24 h
Vincristin	Mitosehemmstoff	0,01 mM	0; 5; 10; 20 nM	48 h

Tabelle 4: Eingesetzte Zytostatikakonzentrationen nach der Zellsortierung.

Die Konzentrationen und die Inkubationszeiten wurden durch eigene Konzentrations-Wirkungs-Vorversuche und durch Erfahrungswerte des onkologischen Forschungslabors unter der Leitung von Dr. J. Sonnemann bestimmt, als Verdünnungsmittel eignete sich das MOLM-13-Vollmedium, die Behandlung fand direkt nach Aussäen der sortierten Fraktionen statt, IKZ = Inkubationszeit, SL = Stammlösung.

Die lichtmikroskopische Begutachtung der Zelldichte und Homogenität des Zellrasens stand am Anfang jeder Behandlung. Anschließende Schritte erfolgten stets unter sterilen Bedingungen und bei gedämpftem Licht, da einige Substanzen photosensibel reagieren. Für die Versuche mit unsortierten Zellen wurden die Wells, wie unter 4.2.1.3 beschrieben, angelegt und 24 Stunden später mit den entsprechenden Wirkstoffen behandelt. Die Wirkstoffe, deren eingesetzte Konzentrationen und die jeweilige Inkubationszeit sind sowohl Tabelle 5 zu entnehmen als auch den jeweiligen Legenden im Ergebnisteil. Für das Chemosensibilitätsexperiment an sortierten Zellen wurden diese nach dem Sortiervorgang ausgesät und direkt behandelt und für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Dafür wurde vor der Zellsortierung die Hälfte der Zellen für 24 Stunden mit 5 μ M SRT1720 vorbehandelt, dann dreimalig gewaschen und der Rest der Prozedur gleich den unbehandelten Zellen vorgenommen.

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Konzentration der SL	Behandlung	Konzentrationen	IKZ (h)
SRT1720	Sirtuin-1-Aktivator	5 mM	Vorbehandlung	1, 2, 3, 4, 5, 7,5 μ M	24
Etoposid	Topoisomerase-II-Hemmstoff	50 mM	Behandlung	0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 μ M	2-12 24, 48
3-MA	PI3K-Inhibitor	50 mM	Behandlung	2 mM	48 h
CQ	lysosomaler Inhibitor der Autophagie	25 mM	Behandlung	10 μ M	0-5 h

Tabelle 5: Eingesetzte Autophagie-Aktivatoren (SRT1720, Etoposid) und -Inhibitoren (3-MA, CQ).

Die Konzentrationen und die Inkubationszeiten wurden durch eigene Konzentration-Wirkungsvorversuche und durch Erfahrungswerte des onkologischen Forschungslabors unter der Leitung von Dr. J. Sonnemann bestimmt, SRT1720 wurde in DMSO weiterverdünnt, Etoposid (siehe Tabelle 4) in Vollmedium, SRT1720 wurde nach 24 h drei Mal ausgewaschen, IKZ = Inkubationszeit, SL = Stammlösung.

4.2.2 Funktionelle Methoden

4.2.2.1 Durchflusszytometrische Analyse mittel FACS

Grundlagen: Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch einen oder verschiedene monochromatische Laserstrahlen geführt. Der

einfallende Lichtstrahl wird durch die Zelle abgelenkt, was als Streulicht bezeichnet wird (Tyndall-Effekt). Zu unterscheiden sind das Vorwärtsstreulicht (FSC; forward scatter), das sich proportional zur Zellgröße verhält und das Seitwärtsstreulicht (SSC; sideways scatter), das sich proportional zur Zellgranularität verhält. Zellen können zusätzlich mit einem Fluoreszenzstoff markiert werden und mit dem FACS-System quantitativ analysiert werden. Werden die fluoreszierenden Verbindungen durch den Laserstrahl geführt, absorbieren sie Lichtenergie in einer für den Fluoreszenz-Farbstoff charakteristischen Wellenlänge (= Absorptionsmaximum). Dabei wird ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittiert beim Übergang in den Grundzustand die überschüssige Energie in Form eines Photons (= Fluoreszenz). Diese Lichtsignale werden von Photovervielfältigern empfangen und in elektronische Signale umgewandelt. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge an gebundenen Fluorochromen. Durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Laser unterschiedlicher Wellenlängen lassen sich multiparametrische Korrelationen darstellen.

Durchführung: Für die FACS-Analysen wurden die Wells, wie unter 4.2.1.3. beschrieben, ausgesät. Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, anschließend behandelt und am Tag der Messung geerntet, worunter man die Überführung des Well-Inhalts mit einer Einwegpasteurpipette in das jeweilige FACS-Röhrchen versteht. Gespült wurde jedes Well mit einem Milliliter farblosem Medium (FLM) oder PBS, beides vorgewärmt, welches ebenfalls in das FACS-Röhrchen überführt wurde. Nach Auffüllen der Röhrchen mit 2 ml FLM/PBS, kamen diese für 5 Minuten bei 20 °C und 1800 U/min in die Zentrifuge. Die Inkubation mit den Fluoreszenzfarbstoffen fand je nach Protokoll vor oder nach dem Ernten statt. Grundsätzlich galt, dass die Zellen für die endgültige FACS-Messung in 500 µl resuspendiert werden mussten (außer bei Zellzyklusanalysen). Am Anfang jeder FACS-Messung stand die Kalibrierung des Durchflusszytometers mit Hilfe der BD Cytometer Setup & Tracking Beads™. Beim simultanen Einsatz von mehreren Fluoreszenzfarbstoffen kann es zu einer Interferenz der Wellenlängenbereiche sowie zu einer Signaldetektion im Kanal des anderen Fluorochroms kommen. Um dies zu korrigieren, müssen die Fluoreszenzen der eingesetzten Farbstoffe vor der Messung kompensiert werden. Dafür wurden Zellen (ebenfalls 200.000 Zellen/Well; Beispiel einer Propidiumiodid/DiOC₆(3) Messung: nur PI; nur DiOC₆(3), Negativkontrolle) mitgeführt und simultan mit den anderen geerntet, gewaschen und vorbereitet.

Auswertung: Mit Hilfe der BD FACSDiva-Software wurden die Daten analysiert. Die Erstellung von Histogrammen und Dotplots erleichterte die Darstellung der gemessenen Ereignisse. Grundsätzlich wurde stets ein Dotplot mit dem FSC-Signal auf der X-Achse und

dem SSC-Signal auf der Y-Achse erstellt. Anhand dieses Plots wurde die Population P1, deren Ereignisse anschließend analysiert wurden, eingegrenzt. Besonders interessant war die Gegenüberstellung der Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch sich oft eine Aussage über die Korrelation der Eigenschaften der Zellen ableiten ließ. Die gemessene Ereigniszahl des FSC wurde auf 10.000 begrenzt (bei Zellzyklusanalysen 20.000).

4.2.2.1.1 Zelltodanalyse mittels Propidiumiodid (PI)

Grundlage: Mit dem Tod einer Zelle geht der Verlust der Integrität der Zellmembran einher. So kann das PI-Molekül stöchiometrisch in doppelsträngige DNA interkalieren, was bedeutet, dass PI-positive tote Zellen von PI-negativen vitalen Zellen unterschieden werden können.

Durchführung: Nach Fertigstellung der Proben wird circa 20 Sekunden vor der Messung 1 µl PI zu der Probe (500 µl) gegeben und kurz gevortext.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
PI	540 nm	608 nm	gelb-rot

Tabelle 6: Eigenschaften von Propidiumiodid.

4.2.2.1.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
DiOC ₆ (3) (3'3-Dihexyloxa-carbocyaniniodid)	484 nm	501 nm	grün
DiIC ₁ (5) (1,1'3,3,3'3'Hexa-methylindodicarboxyaniniodid)	638 nm	658 nm	hellrot

Tabelle 7: Eigenschaften von DiOC₆(3) und DiIC₁(5).

Grundlage: Bei intakten Mitochondrien ist das mitochondriale Transmembranpotential ($\Delta\psi_m$) negativ. Durch Zellstress oder drohenden Zelltod jedoch kann die mitochondriale Doppelmembran permeabel werden, wodurch es zum Verlust des Transmembranpotentials kommt. Die Fluoreszenzfarbstoffe DiOC₆(3) und DiIC₁(5) können aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran durchdringen. Bei Konzentrationen unter 100 nM und bestehendem mitochondrialem Transmembranpotential lagern sie sich spezifisch in die Mitochondrien ein. Verlieren die Mitochondrien ihr Membranpotential, wäscht sich der Farbstoff leicht beim Waschvorgang der Zellen aus. Daraus ergeben sich durchflusszytometrisch 2 Populationen: die DiOC₆(3)/DiIC₁(5)-positive Fraktion, die das erhaltene mitochondriale Membranpotential besitzt und die DiOC₆(3)/DiIC₁(5)-negative Fraktion, die das Membranpotential verloren hat.

Durchführung: Die (vor)behandelten Wells werden 45 Minuten vor der Ernte mit 1 µl DiOC/DiIC beimpft und inkubiert. Die Zellen werden anschließend nach Protokoll geerntet, gewaschen und durchflusszytometrisch gemessen.

4.2.2.1.3 Messung der Autophagie mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Cyto-ID

Grundlagen: Cyto-ID ist licht- und temperaturempfindlich, weshalb bei gedämpftem Licht und auf Eis gearbeitet wurde. In der Forschungsgruppe, geleitet von Dr. J. Sonnemann, wurde Cyto-ID für die durchflusszytometrische Messung am FACS-Gerät und am Sortiergerät eingesetzt. Für alle Versuche, bei denen unter anderem die Cyto-ID-Fluoreszenz gemessen wird, wird vom Ernten des Wells, über das Waschen der Wells und der Zellen, bis hin zum Resuspendieren des gefärbten Zellsediments FLM verwendet. Dies geschieht um, zum einen störende Fluoreszenzen während der Messung durch das Phenolrot des Vollmedium zu verhindern, zum anderen den Zustand der Autophagie der Zellen unberührt zu lassen, indem das FLM FKS enthält. Seitens des Herstellers sind die chemische Struktur und auch das Molekulargewicht von Cyto-ID nicht offengelegt.

Durchführung: Für die Experimente wurden die Zellen wie unter, 4.2.1.3 beschrieben, ausgesät, inkubiert und, wenn vorgesehen, behandelt. Die sortierten Zellen wurden direkt nach der Zellsortierung behandelt beziehungsweise gefärbt. Die Wells wurden, wie unter 4.2.2.1 beschrieben, geerntet. Nach vollständigem Dekantieren des Überstands wurde das Zellsediment in 240 µl Cyto-ID-Lösung resuspendiert und vereinzelt. Die Cyto-ID-Lösung wurde in einem verdunkelten 15 ml Röhrchen angesetzt, in dem der Farbstoff Cyto-ID 1:1000 mit FLM verdünnt wurde. Nach 30-minütiger Inkubation der Proben im Brutschrank wurden diese erneut gewaschen und in der vorgekühlten (4 °C) Zentrifuge für 5 Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis statt. Zuletzt wurde das Zellsediment in 500 µl FLM resuspendiert und vereinzelt. Die Proben konnten nach Protokoll im Durchflusszytometer gemessen werden. Die Autophagie wurde in Kombination mit vielen weiteren Fluoreszenz-Farbstoffen gemessen, wobei die Zellen immer zuerst mit Cyto-ID gefärbt wurden. Nur bei simultaner Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Wells zuerst mit DiIC₁(5) gefärbt.

4.2.2.1.4 Zellzyklusanalyse in fixierten Zellen

Grundlage: Während eine Zelle den Zellzyklus durchläuft, verändert sich ihr DNA-Gehalt je nach Zellzyklusphase. In der G₂-Phase besitzt die Zelle doppelt so viel Erbmateriale wie in der G₁-Phase, da sie kurz vor der Teilung steht. Diese Unterschiede im DNA-Gehalt können durch den Einsatz von fluoreszierenden, in die DNA stöchiometrisch interkalierenden Farbstoffen

quantifiziert werden. Je höher der DNA-Gehalt, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Für die Experimente an MOLM-13-Zellen wurde PI eingesetzt. Vitale Zellen transportieren PI nach Eindringen in die Zelle sofort wieder hinaus, weshalb die Zellen zuerst in Ethanol fixiert und permeabilisiert werden müssen. Da PI sich auch in die RNA einlagert, muss diese durch den Einsatz von Ribonuclease-A (RNase A) eliminiert werden.

Durchführung: Die Fraktionen der sortierten Zellen wurden mit gewohnter Zelldichte ausgesät und wie unter 4.2.1.4 behandelt. Die Zellen wurden zu gewünschten Zeitpunkten mit warmen PBS geerntet und gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis. Das Zellsediment wurde unter ständigem Vortexen in 1 ml gekühltem 70%igem Ethanol tropfenweise suspendiert. Es erfolgte anschließend die Zugabe eines weiteren Milliliters unter den gleichen Bedingungen.

Die Proben wurden über Nacht im -20 °C Tiefkühlschrank gelagert und konnten dort bis zu 14 Tage gelagert werden. Am Tag der Messung wurden die Proben 5 Minuten in der vorgekühlten Zentrifuge (4 °C; 1800 U/min) zentrifugiert und das Zellsediment in 500 µl Glucose-PI-Lösung suspendiert. Die Zusammensetzung der Suspension lautet wie folgt (Ansatz für 6 Proben):

3590 µl PBS 20 µl 20%ige Glucose 10 µl RNase 200 µl PI

Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis und unter Lichtschutz im Kühlschrank konnten die Proben durchflusszytometrisch gemessen werden.

Bei den Einstellungen für das FACS-Gerät war zu beachten, dass PI linear und die Probe bei niedriger Flussgeschwindigkeit zu messen war. Außerdem mussten 20.000 Zellen/Probe gemessen werden. Um eine Messung von Zellaggregaten und -Trümmern auszuschließen, wurde FSC-A gegen SSC-A und FSC-A gegen FSC-W aufgetragen. Die Zellzyklusphasen wurden mittels FACSDiva Software quantifiziert.

4.2.2.1.5 Simultane Messung von Autophagie-Aktivität und Zellzyklus in vitalen Zellen

Grundlage: Um dem Zusammenhang zwischen der Autophagie-Aktivität und dem Zellzyklus einer Zelle nachzugehen, musste eine Methode entwickelt werden, die die Vitalität der Zellen garantiert. Benötigt wurde ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit dem Autophagie-Indikator-Farbstoff Cyto-ID kombinierbar ist. Der Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5™ lagert sich ebenfalls stöchiometrisch in die DNA ein und dient der Quantifizierung des DNA-Gehalts. Durch seinen lipophilen Charakter kann er durch die Membranen diffundieren und macht eine Permeabilisierung der Zellen unnötig.

Durchführung: Die MOLM-13-Zellen wurden, wie unter 4.2.1.3 beschrieben, ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Etoposid

behandelt. Etoposid wurde je nach Experiment (siehe Abbildungslegenden) mit einer Endkonzentration von 0,1 μM und 0,5 μM eingesetzt und die Wells zu Zeitpunkt: 12, 10, 8, 6, 4, 2 Stunden behandelt. Für das Experiment zur Untersuchung des Einflusses von 3-MA auf den Zellzyklus wurden die Wells mit 0,1-0,5 μM Etoposid behandelt und für 48 Stunden inkubiert, ein Teil davon zusätzlich mit 2 mM 3-MA. Es müssen genau 100.000 Zellen/Probe gefärbt werden, was ein Auszählen des Wellinhalts erforderte. Das Auszählen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Da DRAQ5TM sich sowohl in tote als auch vitale Zellen einlagert, wurde bei der Gesamtzellzahl nicht zwischen lebend und tot entschieden. Die Zellen wurden dann in die FACS-Röhrchen überführt, in denen je 2 ml farbloses, vorgewärmtes Medium vorgelegt war. Farbloses Medium wurde verwendet, da dieser Versuch gleichzeitig die Autophagie untersuchen sollte. Nach drei-minütiger Zentrifugation bei 1800 U/min wurden die Überstände scharf abgekippt und das Zellsediment in 240 μl Cyto-ID Lösung resuspendiert und dem Protokoll zufolge inkubiert (siehe 3.2.2.1.4). Nach Auswaschen des Cyto-IDs wurde das Zellsediment mit DRAQ5TM gefärbt. Dafür wurde eine Suspension in einem dunklen 15 ml Röhrchen angesetzt, in dem DRAQ5TM 1:500 in FLM verdünnt wurde. Vor Ansetzen der DRAQ5TM-Lösung musste das Aliquot (10 μl) gevortext und anzentrifugiert werden. Das Zellsediment wurde in 250 μl DRAQ5TM-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Proben waren somit fertig vorbereitet und konnten nach abgelaufener Inkubationszeit nach Protokoll durchflusszytometrisch gemessen werden.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emmisionsmaximum	Farbe
DRAQ5 TM (1,5-Bis[[2-(Dimethylamin)Ethyl]amin]4,8Dihydroxyanthracen-9,10-dion	647 nm	681 nm	Rot

Tabelle 8: Eigenschaften von DRAQ5.

4.2.2.2 Zellsortierung von MOLM-13-Zellen nach ihrer Autophagie-Aktivität

Grundlage: Die Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Sonnemann erstmalig etabliert. Durch eigene Vorversuche zu Cyto-ID wurde die Methode weiter optimiert. Grundsätzlich besteht die Idee darin, eine zelllinienunspezifische, schnelle und unkomplizierte Methode zu entwickeln, um reine Zellfraktionen mit unterschiedlichem Autophagieniveau zu erhalten. Neben der eigentlichen Sortierung nach der Fluoreszenzintensität ist vor allem von Vorteil, dass die Zellen anschließend weiterkultiviert, behandelt und untersucht werden können. Der Mechanismus der

Zellsortierung basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie (4.2.2.1). Die zu untersuchende Einzelzellsuspension wird ebenfalls im laminaren Strom durch eine Quarz-Küvette geführt, von monochromatischen Laserstrahlen bestrahlt und im SSC und FSC registriert. Je nach eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen werden die Zellen durch die spezifischen Laserstrahlen geführt. In diesem Fall kam PI zur Detektion des Zelltodes und Cyto-ID zur Detektion der Autophagie-Aktivität zum Einsatz. Je nach detektierter Cyto-ID-Fluoreszenz wurde der am Ende der Küvette liegende Ring spezifisch geladen. Durch einen vibrierenden Mechanismus wird die soeben gemessene Zelle vom Flüssigkeitsstrom getrennt und durchläuft in einem einzigen Tropfen verpackt diesen Ring. Hier wird der Tropfen dann gegensätzlich zur Ladung des Rings positiv bzw. negativ geladen. Beim Durchlaufen des anschließenden elektrostatischen Feldes wird dieser abgelenkt und in das entsprechend definierte Röhrchen sortiert. Die Röhrchen sollten letztendlich eine homogene Population an Zellen mit niedriger, mittlerer und hoher Autophagie enthalten.

Die Zellsortierung wurde, in Kooperation mit dem Fritz-Lipmann-Institut (FLI) in Jena, freundlicherweise von Katrin Schubert übernommen. Die Probenvor- und -nachbereitung fand im onkologischen Forschungszentrum der Kinderklinik statt.

Durchführung: Vorbereitend wurde eine MOLM-13-Zellkulturflasche (75 cm²) mit 15 x 10⁶ Zellen/20 ml angelegt. Bei Experimenten mit vorbehandelten MOLM-13-Zellen wurde zwei Stunden nach Anlegen der Zellkulturflasche diese mit einer Endkonzentration von 5 µM SRT1720 behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen geerntet (3.2.2.1), zweimal mit FLM gewaschen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dann in 10 ml FLM in einem 15 ml Röhrchen resuspendiert und bei 37 °C in einer Styropor-Box zum FLI transportiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren der Zellsuspension bei 250 g und 20 °C wurde das Zellsediment in der Cyto-ID-Lösung resuspendiert (5 ml FLM : 5 µl Cyto-ID) und für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde 1 ml Vollmedium in jedes FACS-Röhrchen vorgelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen. Das Zellsediment wurde in einem Milliliter FLM vereinzelt und direkt auf Eis und unter Lichtschutz zur FACS-Facility des FLIs gebracht. Dort wurde die Zellsuspension gefiltert in ein FACS-Röhrchen gegeben und kurz vor dem Sortiervorgang mit 1 µM Sytox BlueTM, Lebend-Tot-Farbstoff, der bei 450 nm gemessen wird, gefärbt. Die Zellen wurden mittels des BD FACSAria III oder BD FACS Fusion, die auf eine Temperatur von 4 °C eingestellt wurden, mit einem Druck von 310 kPa unter Verwendung einer 85 µM Düse sortiert.

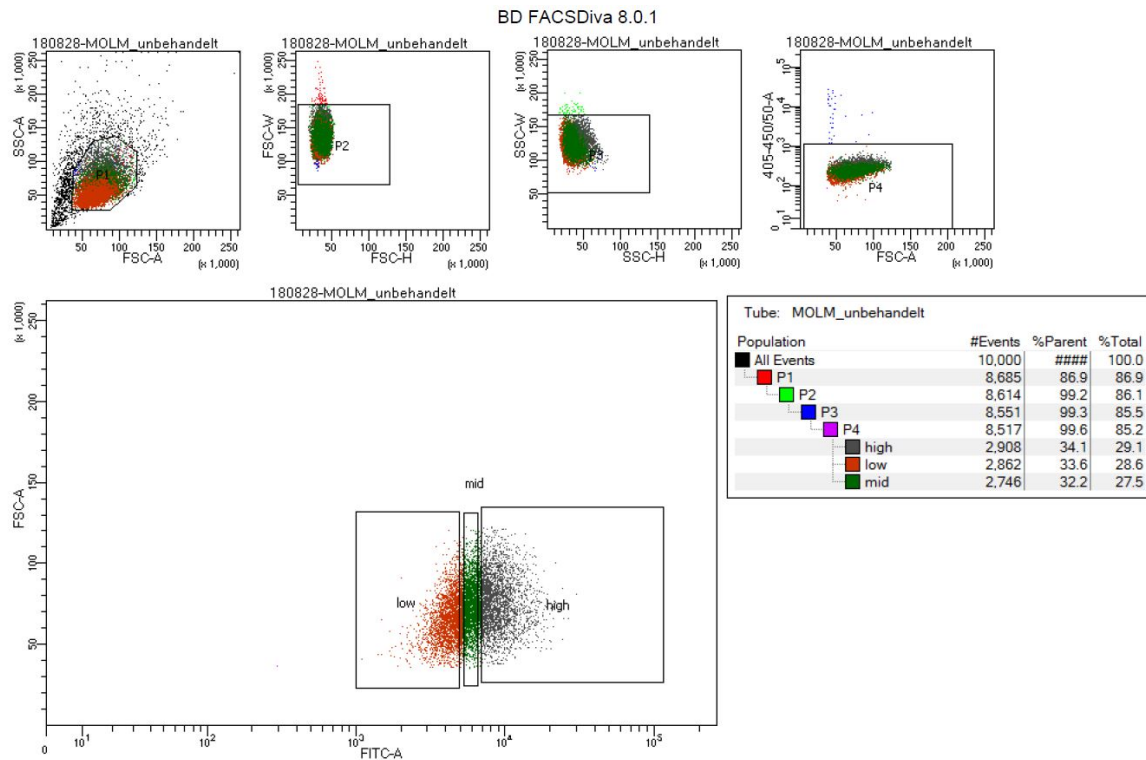


Abbildung 3: Ausschnitt aus BD-Software des Sortiergeräts.

Links oben wird im SSC und FSC Dot-Plot auf die vitalen Zellen gegatet (P1). Diese Population wird durch FSC/SSC-H/W weiter optimiert und anschließend werden nur die vitalen Zellen sortiert (P4). Der untere Dotplot zeigt den FITC-Kanal, in dem die Cyto-ID-Fluoreszenz gemessen wird. Es werden die drei Fraktionen so eingegrenzt, dass jede circa 33 % der Zellen enthält. Dabei entspricht low Aut^{LO} , mid Aut^{ME} und high Aut^{HI} in den anschließenden Versuchen.

Dabei entstanden 3 gleichgroße Zellpopulationen unterschiedlicher Cyto-ID-Fluoreszenz: niedriger, mittlerer und hoher Cyto-ID-Fluoreszenz. Zelltrümmer und einzelne Zellbestandteile wurden sequentiell ausgeschnitten, indem FSC-A gegen SSC-A, FSH-H (Höhe) gegen FSC-W und SSC-H gegen SSC-W aufgetragen wurden. Tote Zellen wurden durch das gezielte *gating* (selektives Eingrenzen) von Sytox Blue-negativen Zellen ausgeschlossen. Jede Fraktion enthielt letztendlich 1,5 Millionen Zellen in 4 ml Medium/Spülflüssigkeit. Der Sortiervorgang dauerte im Schnitt circa 35 Minuten. Unter sterilen Bedingungen wurde jede Fraktion in ein 15 ml Röhrchen überführt und das FACS-Röhrchen mit 3 ml FLM gespült. Nach Zentrifugieren der Proben wurde das Zellsediment in 15 ml Vollmedium resuspendiert und die Proben gewärmt zurück in das Forschungszentrum transportiert. Je nach anstehenden Versuchen wurden sortierte Zellen am FLI an Dr. Marx (Kooperationspartner) für weitere Versuche übergeben. Im Forschungszentrum der Kinderklinik wurden die sortierten Zellen unter sterilen Bedingungen in 12-Wellplatten mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/Well (1 ml) ausgesät.

4.2.2.3 Immunoblotting

Um der Zellsortierung weitere Proteinanalysen anzuschließen, wurden Western Blots gefertigt. Unter *blotting* versteht man allgemein die Übertragung von Proteingemischen von einem Gel auf eine Membran und deren anschließende Detektion auf der Membran. Hier wurde Immunoblotting, das heißt die anschließende Markierung der Proteine mittels spezifischer Antikörper, als Methode gewählt. Die starke Antikörper-Antigen-Bindung ermöglicht es, ein spezifisches Protein inmitten eines Proteingemisches zu identifizieren. Es lässt sich demnach eine qualitative, semi-quantitative Aussage tätigen. Der Versuch schloss sich direkt der Zellsortierung an und wurde freundlicherweise von Dr. Marx durchgeführt.

4.2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Es wurden 700.000 Zellen/sortierter Fraktion zur Herstellung von Proteinlysaten verwendet, davon wurden 350.000 für 1 Stunde mit 25 µM CQ vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 250 g und 4 °C zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 60 µl RIPA-Zellysereagenz resuspendiert. Durch Ultraschall wurden die Proben dann lysiert, mit 6x Lämmli-puffer versetzt und abschließend, vor und nach dem 7-minütigen Erhitzen (95 °C) der Lysate, im Vortexer vermischt. Nun sollten alle enthaltenen Proteine denaturiert vorliegen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind Tabelle 9 zu entnehmen.

RIPA-Lyse-Puffer	6x Lämmli-puffer
150 mM Natriumchlorid (NaCl)	35 % β-Mercaptoethanol
1 mM EDTA	350 mM Tris/HCl (pH 6,8)
1 % Triton X-100	30 % Glycerin
1 % Natriumdesoxycholat	10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,25 % Bromphenolblau
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)	
<u>frisch hinzugegeben:</u>	
PhosphoStop®	
Proteaseinhibitor-Cocktail	

Tabelle 9: Zusammensetzungen der für die Herstellung der Proteinlysate verwendeten Pufferlösungen.

4.2.2.3.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

	7 % Trenngel	12 % Trenngel	15 % Trenngel
--	--------------	---------------	---------------

Endvolumen	8 ml	8 ml	8 ml
ddH ₂ O	2,95 ml	2,15 ml	1,65 ml
30 % Acrylamid	1,85 ml	2,65 ml	3,2 ml
1 M Tris, pH 8,8	3 ml	3 ml	3 ml
10 % SDS	80 µl	80 µl	80 µl
10 % APS	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Trenngele.

Die Auftrennung der Proteinlysate erfolgte mithilfe eines Polyacrylamidgels. Dazu wurden Stufengele aus 7-, 12- und 15%igem Trenngel verwendet, um eine optimale Auftrennung der unterschiedlich großen Proteine zu gewährleisten. Das Sammelgel enthielt in beiden Fällen 4 % Polyacrylamid. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Trenngele und die des Sammelgels sind in Tabelle 11 enthalten. Alle Angaben gelten für die Herstellung von zwei Gelen, bei denen TEMED erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzugegeben wird. 25 µl der Proben wurden jeweils mit 5 µl des Markers PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa aufgetragen. Dieser Marker dient als Größenstandard, der mitläuft. Die Elektrophorese, also die eigentliche Auftrennung der Proteinlysate nach Größe, fand bei konstant 130 V statt. Als Laufpuffer wurde 1x konzentrierter Rotiphorese® SDS-PAGE-Puffer verwendet.

	4 % Sammelgel
Endvolumen	10 ml
ddH ₂ O	7,25 ml
30 % Acrylamid	1,33 ml
1 M Tris, pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 11: Zusammensetzung des für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Sammelgels.

4.2.2.3.3 Western Blot und Immunodetektion der Proteine

Die in der SDS-PAGE getrennten Proteinlysate wurden durch Western Blots auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert. Als Transferpuffer wurde der SDS-PAGE Laufpuffer, dem 20 % Ethanol beigelegt wurde, verwendet. Der Transfer erfolgte über Nacht

bei einer Stromstärke von 20 mA pro Membran bei Raumtemperatur (RT). Die noch freien Bindestellen der Membran wurden anschließend durch eine Blockierungslösung (5 % Magermilch, 0,05 % Tween-20 in TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween20*), pH 7,25) für 1 Stunde bei RT inkubiert und blockiert. In Tabelle 12 sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnungen aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in 2,5 % Magermilch in TBS-T mit 0,02 % Natriumazid verdünnt. Die Membran wurde über Nacht und bei 4 °C auf einem Rollmischgerät in der primären Antikörper-Lösung inkubiert und dann dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde sie bei RT für 1 Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden in 2,5 % Magermilch in TBS-T verdünnt und waren HRP-konjugiert (*Horseradish Peroxidase*). Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Abschließend wurde die Membran für 1 Minute in ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) inkubiert und die Expression der Proteine an einem Amersham Imager 600 detektiert. Die Expressionslevel wurden mittels ImageJ quantifiziert

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Cyclin B1	BD Biosciences	1:1000
LC3B	Cell Signaling Technologies	1:1000
p62	MBL International	1:2500
phospho Histon H3 (Ser10)	Millipore (Merck)	1:1000
Vinculin	Santa Cruz Biotechnologies	1:5000
β-Aktin	Sigma Aldrich (Merck)	1:10000
Sekundäre Antikörper		
Anti-Maus	SeraCare	1:10000
Anti-Kaninchen	SeraCare	1:5000

Tabelle 12: Auflistung aller verwendeter primären und sekundären Antikörper, deren Hersteller und eingesetzte Verdünnung.

4.2.2.4 Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs und der Laktatsekretion

Grundlagen: Während der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) werden die elektronenübertragenden Produkte des Zitratzyklus (NADH und FADH₂) von den Multienzymkomplexen I und II in die Atmungskette transportiert und schließlich in Komplex IV auf Sauerstoff unter der Bildung von Wasser übertragen. Dabei bauen die Atmungskettenkomplexe I, III und IV einen Protonengradienten auf, indem Protonen von der mitochondrialen Matrix in den

Intermembranraum gepumpt werden. Dieser elektrochemische Gradient treibt die ATP-Synthase an, indem die Protonen vom Intermembranraum zurück in die Matrix fließen und dabei die Synthese von ATP antreiben. Ein Teil der Protonen fließt aber auch über porenbildende Proteine (in der inneren Membran) zurück, ohne an der ATP-Produktion beteiligt zu sein. Sofern der Protonengradient nicht abgebaut wird, fließen keine weiteren Elektronen über die Atmungsketten und es wird kein weiterer Sauerstoff oxidiert.

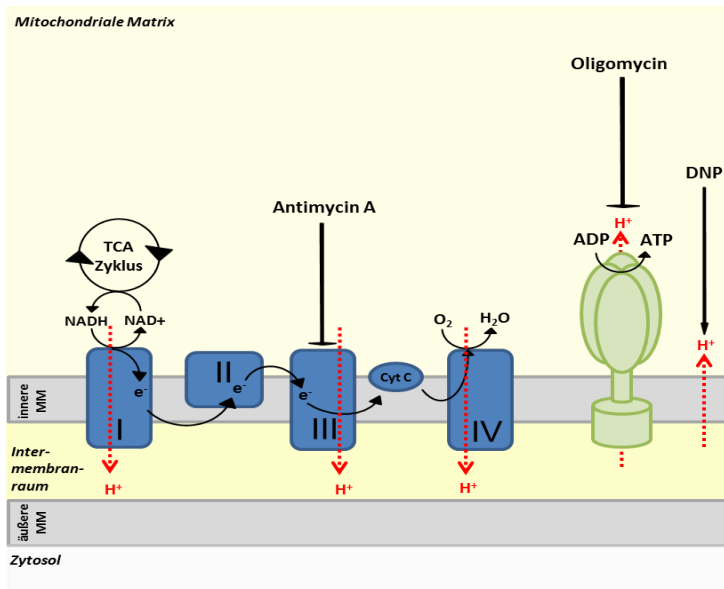


Abbildung 4: Wirkung der applizierten Substanzen auf die OXPHOS.

Abbildung modifiziert nach van der Windt et al. (2016).

Mithilfe eines Seahorse XF96 Analysers werden nichtinvasiv und parallel zwei Hauptenergiegewinnungswege einer Zelle gemessen. Die mitochondriale Atmung wird dabei mittels der Sauerstoffverbrauchsrate OCR (*oxygen consumption rate*) und die Glykolyserate mittels der Ansäuerung des Mediums durch Laktatsekretion der Zellen (ECAR, *extracellular acidification rate*) ermittelt. Hierfür ist die Seahorse-Sensorplatte mit zwei fluoreszierenden Biosensoren ausgestattet, die zum einen den O_2 -Partialdruck und zum anderen den pH-Wert bzw. die freien Protonen im Medium bestimmen können. Biochemische Grundlage ist für die Bestimmung der mitochondrialen Atmung mittels der OCR, dass im Zuge der OXPHOS O_2 verbraucht wird und somit der O_2 -Gehalt im Medium, das über der Monolayer der Zellen liegt, abnimmt. Um von der ermittelten ECAR, also dem pH im extrazellulären Medium, auf die glykolytische Aktivität der Zelle Rückschlüsse zu ziehen, muss daran erinnert werden, dass beim Transport des glykolytischen Endprodukts Laktat aus der Zelle heraus stets im Symport auch Protonen heraustransportiert werden. Um zusätzliche Informationen über den metabolischen Zustand der Zelle zu generieren, gibt es die Möglichkeit pharmakologische Inhibitoren des Zellstoffwechsels während der Messung einzusetzen.

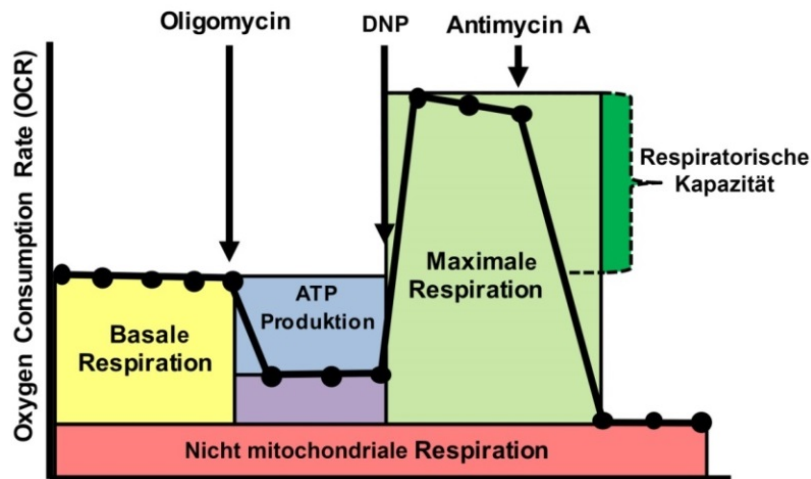


Abbildung 5: Systematische Darstellung einer Seahorse-Messung.

Die y-Achse zeigt die gemessene OCR, woraus sich weitere Parameter, durch Applikation der inhibitorischen Pharmaka, berechnen lassen. DNP ist 2,4-Dinitrophenol. Abbildung modifiziert nach Nicholas et al. (2017).

Hierzu werden in einem sogenannten Cell Mito Stress Test Oligomycin, 2,4-Dinitrophenol und Antimycin-A sequenziell zugegeben, nachdem der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen bestimmt wurde. Zuerst wird Oligomycin, das die ATP-Synthase der Atmungskette inhibiert, hinzugeben. Damit baut sich der Protonengradient nicht mehr über die ATP-Synthase ab und der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wird blockiert. Daher fällt an diesem Punkt die OCR ab und ECAR nimmt zu. Die verbleibende OCR ist größtenteils auf Sauerstoff-konsumierende nicht-mitochondriale Enzymreaktionen im Zytosol der Zelle zurückzuführen. Es folgt die Zugabe von 2,4-Dinitrophenol, welches sich als Ionophor in die innere Membran der Mitochondrien einlagert und den Protonengradient abbaut. Damit kann der Elektronenfluss zwischen den Komplexen I-IV ungehindert stattfinden und die Aktivität der Komplexe I-IV auf einen maximalen Wert gesteigert werden. Somit steigen an diesem Punkt sowohl OCR als auch ECAR an. Zuletzt wird Antimycin-A, als Inhibitor des Komplexes III, appliziert. Es kommt zu einem kompletten Erliegen der OXPHOS. Daraus ergibt sich die nicht-mitochondriale Atmung, die auf dem Sauerstoffverbrauch einiger zellulärer Enzyme basiert. Die Werte der ECAR bleiben an diesem Punkt stabil oder steigen an, um die fehlende Energiebereitstellung durch die OXPHOS-Hemmung zu kompensieren. Mehr Informationen zur genauen Methodik der Seahorse-Analysen finden sich unter Ferrick et al. (2008).

Durchführung: Die Seahorse-Analysen wurden freundlicherweise in Kooperation von Dr. Christian Marx durchgeführt. Zu Beginn der Analyse wurden 70.000 Zellen/Fraktion in 180 µl Seahorse XF RPMI Medium (pH 7,4) pro Well in eine Seahorse XF96 Zellkulturplatte ausgesät und für 1 Stunde bei 37 °C im CO₂-freien Inkubator inkubiert. Die Analyse der Zellen begann mit der Messung des basalen Stoffwechsels. Danach wurden während der Messung Oligomycin

(Endkonzentration 2 μM), 2,4-Dinitrophenol (Endkonzentration 15 μM) und Antimycin A (Endkonzentration 2 μM) injiziert und die jeweiligen Veränderungen des Stoffwechsels aufgezeichnet. Die OCR (pmol/min) wurde aus der Steigung der Kurve des O_2 -Partialdrucks (mmHg) gegen die Zeit (min) aufgetragen und berechnet. ECAR (mpH/min) ergab sich aus der Steigung der pH-Kurve gegen die Zeit (min). Jeder Abschnitt wurde in je drei Zyklen gemessen. Dieser bestand aus drei Minuten Durchmischung und drei Minuten Messung bei 37 °C. Die Daten wurden mittels Wave Software (Agilent Technologies) ausgewertet.

Seahorse XF RPMI Medium: *180 μl farbloses RPMI*
 10 % FKS
 10 mM D-Glukose
 2 mM L-Glutamin
 1 mM Natriumpyruvat

4.2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
LC3-B	Cell Signaling Technologies	1:250
p-62	MBL international	1:500
Sekundäre Antikörper		
AlexaFluor555-conjugated anti-rabbit	Abcam	1:500

Tabelle 13: Verwendete Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde freundlicherweise in Kooperation von Dr. Christian Marx durchgeführt. Nach der Zellsortierung wurden 300.000 Zellen/Fraktion in eine 24-Well-Platte, die zuvor mit poly-L-Lysin überzogen worden war, eingesät, anschließend für 2 Minuten bei 250 g zentrifugiert und für weitere 4 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch alleinige Zugabe von 37%iger Formaldehyd-Lösung (Endkonzentration von 4 %) zum Medium-Überstand und 30-minütiger Inkubation bei RT fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde in *blocking solution* bei RT inkubiert. Über Nacht folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 °C. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und für 2 Stunden bei RT mit dem sekundären Antikörper in *blocking solution* inkubiert. Die Deckgläser wurden mit PBS gewaschen, 10 Minuten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (in PBS) bei RT inkubiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit ProLong Gold Antifade Mountant befestigt wurden. Die Auswertung der Bilder fand mittels des Zeiss AxioImager ApoTome Mikroskop (strukturierte

Beleuchtung) und AxioCam MR Kamera statt. Die Aufnahmen wurden mit der Zen 2.0 lite software von Carl Zeiss analysiert.

Blocking solution: 1 % BSA 0,4 % Triton X-100 in PBS (pH 7,25)

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Isolierung und Arbeiten mit RNA

Untersucht wurden Zellen mit unterschiedlicher autophagozytischer Aktivität und deren Expression von Zellzyklusgenen und Autophagie-Genen. Dafür wurden, wie in 4.2.1.3 beschrieben, die MOLM-13-Zellen ausgesät, mit Cyto-ID gefärbt und anhand ihrer Cyto-ID-Fluoreszenzintensität in die drei Fraktionen: niedrige (Aut^{LO}), mittlere (Aut^{ME}) und hohe (Aut^{HI}) Autophagie-Aktivität sortiert. Die Untersuchung der RNA erfordert stets sehr sauberes Arbeiten, um den Abbau der RNA durch RNasen zu vermeiden. Das Tragen von Einmalhandschuhen aus Nitril, sterile wattierte Pipettenspitzen, sterile Reaktionsgefäße, RNase-freies Wasser und das ständige Desinfizieren der Pipette bildeten hierfür die Grundlage. Es wurde von 500.000 Zellen die RNA isoliert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem PegGOLD-Total-RNA-Kit®.

1. Homogenisieren und Zellyse: Zuerst wurden die Zellen mit vorgewärmten (37 °C) PBS bei 4 °C und 1800 U/min für 5 Minuten in der Zentrifuge gewaschen. Die Proben standen stets auf Eis. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Zellsediment in 400 µl Lyse-Puffer vereinzelt, homogenisiert und auf eine DNA-Removing-Säule gegeben, welche in 2 ml Collection-Röhrchen steckte, und für 2 Minuten bei 13000 U/min in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

2. Bindung der RNA: Die DNA-Removing-Säulen konnten verworfen werden, da ab jetzt mit dem Unterstand, welcher die RNA enthält, weitergearbeitet wurde. Dieser wurde in 400 µl 70%igem Ethanol homogenisiert und als Ganzes auf die PerfectBind-RNA-Säule gegeben, welche ebenfalls auf einem 2 ml Collection-Röhrchen steckte. Während der 1-minütigen Zentrifugation konnte die RNA an die Silikamembran binden. Der Unterstand wurde verworfen.

3. Waschvorgang: Auf jede PerfectBind-RNA-Säule wurden 500 µl des RNA-Washbuffer-I gegeben. Nach Ablauf der 5-minütigen Einwirkzeit wurden die Proben 15 Sekunden lang zentrifugiert, der Unterstand verworfen und die Säule auf ein neues Collection-Röhrchen gesetzt. Um überschüssige Reste der DNA zu entfernen, wurde jede Probe mit 75 µl des DNase-Verdau behandelt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die PerfectBind-

RNA-Säule mit 350 µl Washbuffer-I und zweimal mit 500 µl Washbuffer-II gewaschen und zentrifugiert. Der Unterstand wurde nach jeder Zentrifugation verworfen.

4. *Trocknen*: Beim letzten Waschschrift wurde die Säule für 2 Minuten zentrifugiert und damit vollständig getrocknet. Nach Verwerfen des Unterstands wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gesetzt.

5. *Elution*: Mit 35 µl RNase-freiem-Wasser wurde die RNA aus der Säule, unter 1-minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation, gewaschen. Die Eppendorf-Röhrchen, die nun die gelöste RNA enthielten, wurden weiterhin auf Eis bearbeitet.

DNase I Reaktionsmix von peqGold Total RNA Kit (1 Probe):

73,5 µl DNase I Digestionspuffer *1,5 µl RNase-freie DNase*

4.2.3.2 Photometrische Quantifizierung der RNA

Vorbereitend wurden 4 µl der soeben isolierten RNA in 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen, in die bereits 76 µl RNase-freies-Wasser vorgelegt wurden, pipettiert. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des BioPhotometers plus von Eppendorf photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zuerst musste das Gerät mit 80 µl RNase-freiem Wasser, welches in die Quarzküvette pipettiert wurde, kalibriert werden. Anschließend wurden 80 µl jeder RNA-Probe gemessen und ihre Reinheit über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt. Dieses sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, spricht es für eine Verunreinigung der Proben.

Die RNA-Konzentration (µg/µl) berechnete sich wie folgt:

$$= \frac{\text{Absorption}(260\text{nm}) \times 40 \mu\text{g} \frac{\text{RNA}}{\text{ml}} (\text{Absorptionseinheit für RNA}) \times 20 (\text{Verdünnungsfaktor})}{1000 (\text{Umrechnung von ml in } \mu\text{l})}$$

Die isolierte RNA wurde entweder direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -20 °C eingefroren.

4.2.3.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Es wurden 0,5 µg RNA jeder Probe in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Aufgrund der Quantifizierung des RNA-Gehalts jeder Probe, die mittels photometrischer Messung stattfand, konnte das Volumen, das 0,5 µg RNA enthält, berechnet werden. Dieses wurde in 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert, in dem bereits das probenspezifische Volumen an RNase-freiem Wasser, welches ein Endvolumen von 13 µl ergab, vorgelegt wurde. Durch Zugabe von 7 µl des „Reverse Transkriptase“-Mix wurde das Endvolumen von 20 µl erreicht,

welches für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion notwendig war. „Reverse Transkriptase-Mix“ (1 Probe):

2 µl 10xBuffer-Reverse Transkriptase

2 µl dNTP-Mix

2 µl Random-Hexamer

0,25 µl RNase-Out

1 µl Omniscript-Reverse Transkriptase

Die Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. In dieser Zeit fand die reverse Transkription statt, bei welcher die isolierte RNA durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase in komplementäre DNA ungeschrieben wurde. Die entstandene cDNA wurde 1:2 mit RNase-freiem-Wasser verdünnt, auf zwei 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und bei -20 °C eingefroren. Vorbereitend für die Real Time RT-PCR wurde in eines der Röhrchen 60 µl destilliertes Wasser hinzugegeben.

4.2.3.4 Real-Time RT-PCR mittels TaqMan® Technologie

Grundlage: Die 1983 entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zählt heute zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie. Sie erlaubt die Amplifikation gewünschter DNA-Abschnitte in vitro mittels Einsatz von genspezifischen Primer. Auf dieser Methode beruht die Real-Time Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), die neben der Amplifikation den relativen Mengenvergleich der entstandenen Amplifikate mit einem Referenzgen (in diesem Fall beta-2-M) mittels Fluoreszenzmessung in Echtzeit ermöglicht. Eine genspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde, welche aus einem sequenzspezifischen Oligonukleotid besteht, hybridisiert in jedem PCR-Zyklus mit der vorhandenen amplifizierten DNA-Sequenz und wird durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase hydrolytisch gespalten. Hierbei werden der am 5'-Ende sitzende Fluoreszenzreporterfarbstoff (z. B. FAM = 6-Carboxy-Fluorescein) und der am 3'-Ende sitzende Quencherfarbstoff (z. B. TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) der TaqMan-Sonde getrennt und die Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung unterdrückt. Dadurch kommt es zum Anstieg der sequenzspezifischen Reporterfluoreszenz, die in Echtzeit nach jedem Amplifikationszyklus bei spezifischer Wellenlänge gemessen wird. Dieser Anstieg verhält sich stets proportional zur Menge der entstandenen Amplifikate.

Durchführung: Alle Proben und Reagenzien wurden nach dem Auftauen oder nach dem Pipettieren gevortext und anzentrifugiert. Für jedes zu untersuchende Gen wurde zuerst der

spezifische Sondenmix (Endvolumen von 25 μl /Probe) in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wie folgt hergestellt und gevortext:

Reagenz	Volumen
Destilliertes Wasser	11,25 μl
Universal PCR Mastermix	12,5 μl
Primer-Sonden-Mix	1,25 μl

Tabelle 14: PCR Reagenzien pro Probe.

Im Mastermix ist die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase enthalten, der Primer-Sonden-Mix enthält die genspezifischen Primer und die zugehörige fluoreszenzmarkierte Sonde.

Pro Probe wurden 50 μl des spezifischen Mastermix in ein 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 2 μl der entsprechenden cDNA hinzupipettiert, die Proben gevortext und auf die 96-Spitzwell-Platte verteilt, wobei jede Probe doppelbestimmt wurde (25 μl /Well). Die Negativkontrolle enthielt nur 50 μl des genspezifischen Mastermix und wurde ebenfalls doppelbestimmt. Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte die quantitative Real Time RT-PCR mit dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystem und mit Hilfe der Software SDS 2.4.

Auswertung: Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (ΔRN) werden mittels der SDS 2.4 Software im Amplifikationsplot auf der y-Achse gegen die Zyklusanzahl aufgetragen. Um den signifikanten Unterschied der Fluoreszenzintensität, im linearen Anstieg, gegenüber der Hintergrundfluoreszenz darzustellen, wird eine Schwelle (engl.: *threshold*) bei etwa zehnfachem Signalniveau gegenüber der Hintergrundfluoreszenz (engl.: *baseline*) festgelegt. Als *Cycle-threshold*(ct)-Wert wird der Schnittpunkt des Amplifikationsgraphen mit dieser Schwelle bezeichnet. Er markiert den dazugehörigen x-Wert, der die Zyklusanzahl, bei der die Fluoreszenzintensität das erste Mal über den Schwellenwert gestiegen ist, angibt. Je niedriger der ct-Wert, desto höher ist die mRNA-Expression in der entsprechenden Ausgangsprobe. Um Schwankungen, die durch Unterschiede im RNA-Gehalt der einzelnen Proben entstehen können, zu kontrollieren, wird zusätzlich immer die Expression eines Referenzgenes (engl.: *house keeping gene*) bestimmt. Für die MOLM-13-Zellen wurde hierfür die Expression des Polypeptids β 2-Mikroglobulin bestimmt. Der Δct -Wert des Zielgens ergibt sich aus der Differenz der ct-Werte des Ziel- und des Referenzgens. Gleiches Procedere gilt für die Berechnung des Δct -Wert der Kontrollprobe. Normalisiert wurden die Δct -Werte der Zielgene auf die Δct -Werte der Fraktion mit niedriger Autophagie, wodurch sich der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert ergab.

Die relative Genexpression wurde dann durch Einsetzen der Werte in die Formel $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ermittelt und ließ eine Aussage über die Expressionsunterschiede zwischen der jeweiligen Fraktion und der mit niedriger Autophagie treffen (Schmittgen und Livak 2008).

4.2.4 Statistische Auswertung

Statistische p-Werte wurden mittels des ungepaarten, zweiseitigen *t*-Tests berechnet. Alle Statistiken basieren auf biologischen Replikaten unabhängiger Experimente und sind keine technischen Replikate. 1 * steht für ein $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin auf den Etoposid-induzierten Zellzyklusarrest in MOLM-13-Zellen

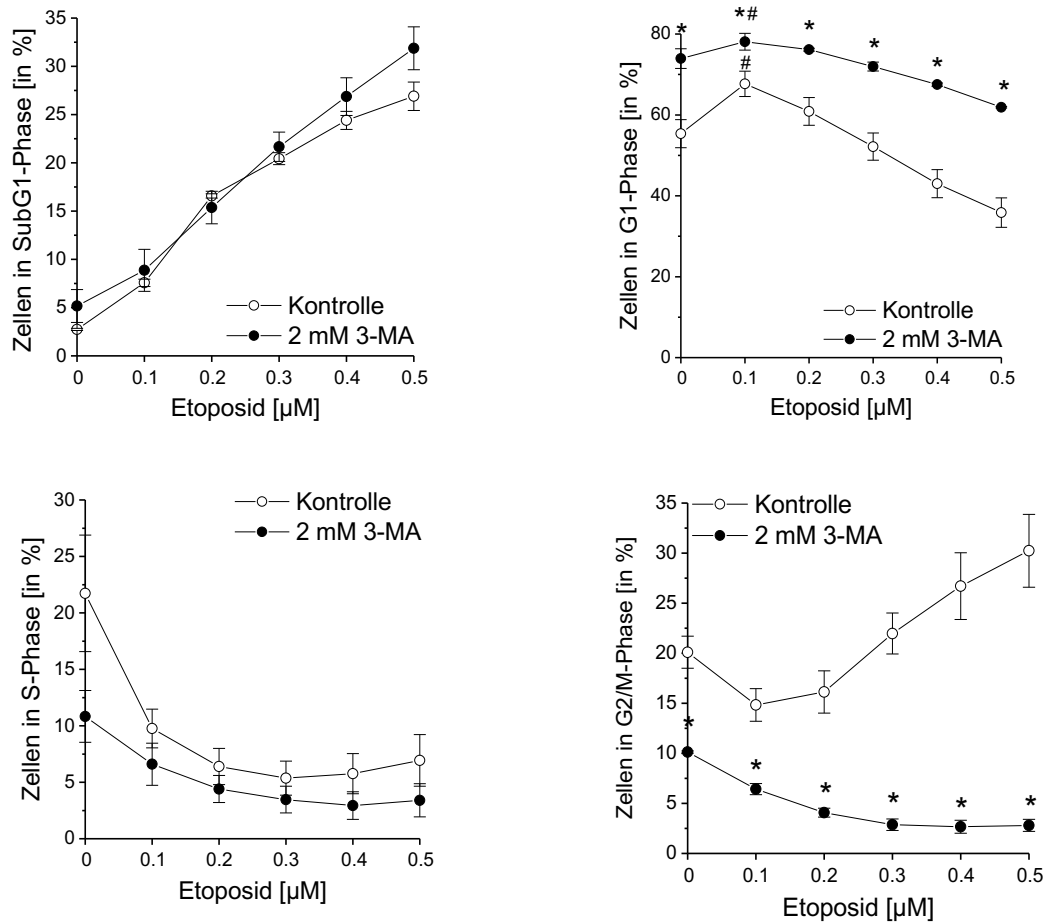


Abbildung 6: Einfluss von Etoposid und 3-MA auf den Zellzyklus.

Die Zellen wurden 48 h entweder mit Etoposid (Kontrolle) oder Etoposid + 3-MA inkubiert. Die Zellzyklusanalyse erfolgte durchflusszytometrisch an ethanolfixierten und PI-eingefärbten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten (für Zellen in der G1- bzw. G2/M-Phase gilt: 3-MA vs. Kontrolle: * $p < 0,05$; x µM Etoposid vs. kein Etoposid: # $p < 0,05$).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Autophagie und dem Zellzyklus zu untersuchen wurden MOLM-13-Zellen vergleichend zum einen nur mit Etoposid und zum anderen mit Etoposid in Kombination mit dem Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin (3-MA) behandelt. Etoposid ist ein Zytostatikum, das zu einem G2/M-Arrest der Zelle führt (Clifford et al. 2003, Maskey et al. 2013). Die Abbildung 6 zeigt, dass die Wirkung von Etoposid auf MOLM-13-Zellen biphasisch verlief. Bei einer niedrigen Konzentration von 0,1 µM stellte sich in der Kontrollgruppe eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase ein. Bei steigenden Konzentrationen hingegen akkumulierten die Zellen in der G2/M-Phase. Bei der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit 3-MA prägte sich der G1-Arrest der Zellen weitaus schwächer aus

und der G2/M-Arrest blieb komplett aus. Auf den zytotoxischen Effekt von Etoposid, hier dargestellt als Zellen in der sub-G1-Phase, hatte 3-MA hingegen keine nennenswerte Wirkung. In Vorversuchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass 2 mM 3-MA bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden nicht toxisch war. Die Ergebnisse dieses Versuchs gaben Anlass dazu, den Einfluss der Autophagie auf den Zellzyklus in MOLM-13-Zellen genauer zu analysieren. Zudem sollte der beschriebene Versuch erneut durchgeführt und dabei simultan zum Zellzyklus auch die Autophagie gemessen werden.

5.1.1 Autophagie-Aktivierung durch Etoposid in MOLM-13-Zellen

Zunächst wurde Etoposid als potentieller Autophagie-Aktivator getestet. Ziel war es, eine Etoposid-Konzentration zu finden, die die Autophagie in MOLM-13-Zellen ausreichend induziert und dabei wenig toxisch wirkt. Mittels der simultanen durchflusszytometrischen Messung der Cyto-ID-Fluoreszenz und der PI-Fluoreszenz konnte eine passende Konzentrationsreihe ermittelt werden. Durch die Zugabe von CQ (10 μ M) konnte der Nachweis für eine effektive Aktivierung der Autophagie durch Etoposid erbracht werden (siehe Einleitung 2.2.5).

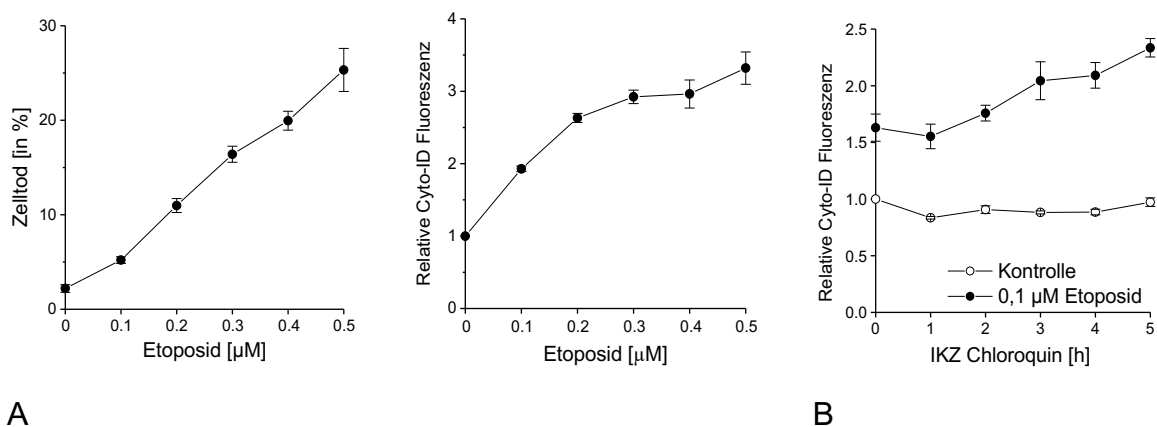


Abbildung 7: Nachweis der Zytotoxizität und der Autophagie-Aktivierung durch Etoposid.
 A: Die Zellen wurden 48 h mit Etoposid behandelt. Der Zelltod und die Autophagie wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. B: Die Zellen wurden 24 h mit Etoposid behandelt; 10 μ M CQ wurde 1-5 h vor Ernte der Zellen hinzugegeben. Die relative Cyto-ID-Fluoreszenz stellt das Verhältnis von behandelten zu unbehandelten Zellen dar. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Zellzyklusphasen-abhängige Autophagie-Aktivität in Etoposid-behandelten MOLM-13-Zellen

Um die Autophagie und den Zellzyklus parallel zu messen, eignete sich die oben verwendete Methode mittels Zellfixierung und Permeabilisierung nicht. Die Zellen müssen zur Messung der autophagozytotischen Aktivität vital sein, weshalb für dieses Experiment der Lebendfarbstoff DRAQ5TM (siehe 4.2.2.1.5) eingesetzt wurde. Auch hierfür wurden die

MOLM-13-Zellen vergleichend zum einen mit Etoposid und zum anderen mit Etoposid in Kombination mit 3-MA behandelt. Für die Auswertung der Autophagie wurden die Zellen anhand der DRAQ5TM-Fluoreszenz in die verschiedenen Zellzyklusphasen eingeteilt. So ergab sich für jede Etoposid-Konzentration, je nach Zellzyklusphase einer Zelle, die korrelierende autophagozytotische Aktivität (Abbildung 8C).

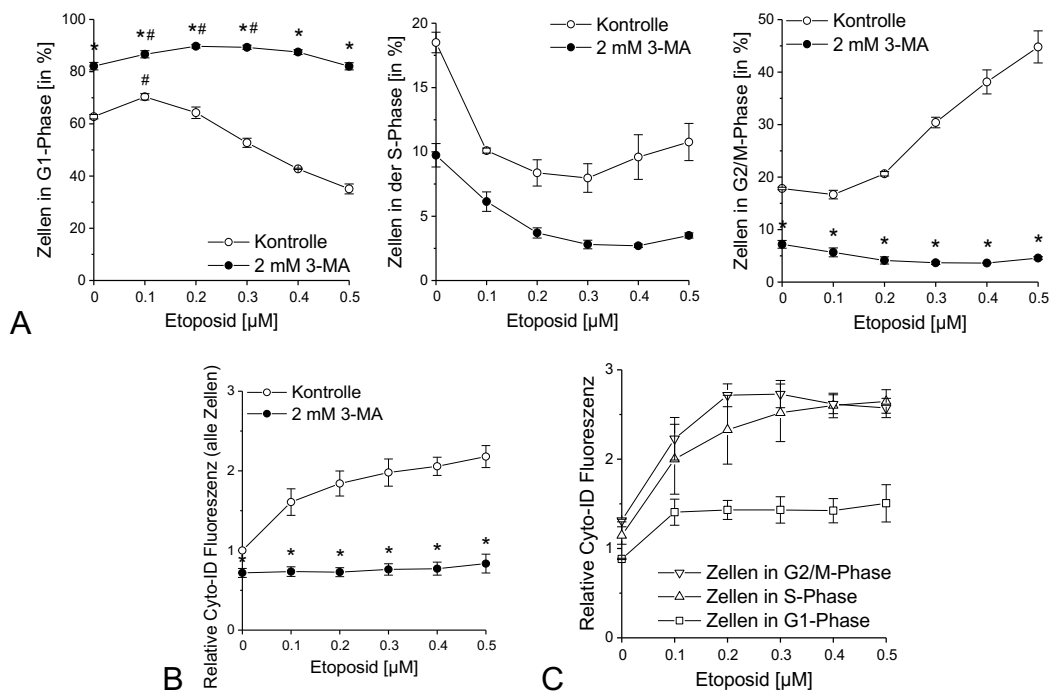


Abbildung 8: Einfluss von Etoposid und 3-MA auf den Zellzyklus und die Autophagie-Aktivität.

A: Die Zellen wurden 48 h entweder mit Etoposid (Kontrolle) oder Etoposid + 3-MA inkubiert. Die Zellzyklusanalyse erfolgte durchflusszytometrisch mittels DRAQ5TM. B: Behandlung der Zellen gleichermaßen wie bei A, Auswertung der Autophagie durch durchflusszytometrische Analyse der Cyto-ID-Einfärbung. C: Die Zellen wurden 48 h mit Etoposid behandelt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte durchflusszytometrisch mittels DRAQ5TM bei simultaner durchflusszytometrischer Analyse der Autophagie mittels Cyto-ID-Einfärbung. In B und C wird die Cyto-ID-Fluoreszenz als Vielfaches des Wertes der Nullprobe angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. Für Zellen in der G1- bzw. G2/M-Phase gilt: 3-MA vs. Kontrolle: * $p < 0,05$; x μM Etoposid vs. kein Etoposid: # $p < 0,05$.

Die biphasischen Effekte von Etoposid auf den Zellzyklus zeigten sich wie unter 5.1.1 beschrieben (Abbildung 8A). Abbildung 8B zeigt, dass die Cyto-ID-Fluoreszenz aller Zellen der Kontrollgruppe mit steigender Etoposid-Konzentration zunahm und bei der höchsten Konzentration (0,5 μM) nahezu eine Verdopplung der Cyto-ID-Intensität zu vermerken war. In den Zellen, die zusätzlich mit dem Autophagie-Inhibitor 3-MA behandelt wurden, blieb eine Steigerung der Autophagie-Aktivität ganz aus (Abbildung 8B). Betrachtet man zusätzlich die Cyto-ID-Fluoreszenz in den verschiedenen Zellzyklusphasen, zeigten sich deutliche Unterschiede (Abbildung 8C). In unbehandelten Zellen (Startwert) ergab sich dabei folgende

Abstufung der autophagozytotischen Aktivität für die jeweilige Zellzyklusphase: $G1 < S < G2/M$. Die Stimulierung mit Etoposid induzierte dann die Autophagie vor allem in Zellen, die sich in der S- und der G2/M-Phase befanden. G1-Phase-Zellen zeigten einen leichten Anstieg der Cyto-ID-Fluoreszenz mit einer Sättigung schon ab der niedrigsten Etoposid-Konzentration.

5.1.3 Kinetik des Etoposid-Effekts auf Autophagie und Zellzyklusarrest in MOLM-13-Zellen

Um die Beobachtungen des Versuchs mit 3-MA und Etoposid zu ergänzen, wurde die Wirkung von Etoposid sowohl auf die Autophagie als auch auf den Zellzyklus genauer untersucht. Dafür wurden die Zellen mit $0,5 \mu\text{M}$ Etoposid in Abständen von zwei Stunden über einen Zeitraum von 12 Stunden behandelt und anschließend die Autophagie-Aktivität und der Zellzyklus durchflusszytometrisch gemessen.

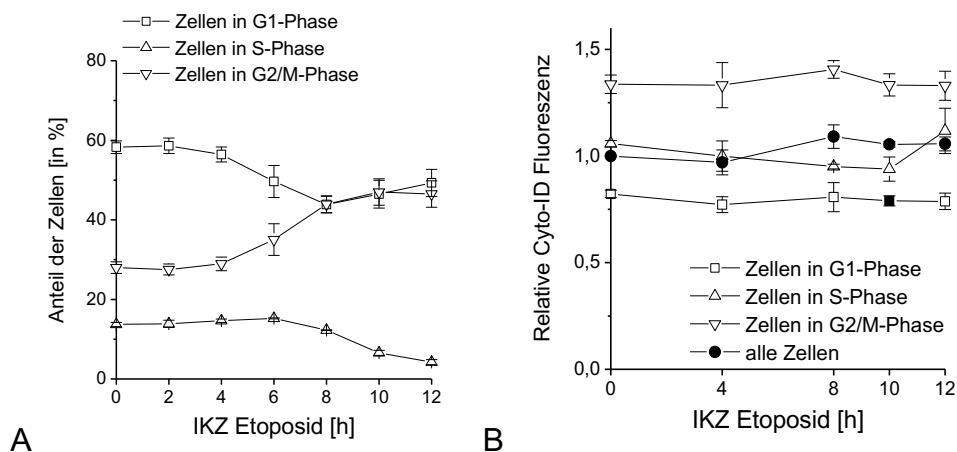


Abbildung 9: Abhängigkeit des Zellzyklusarrest und der Autophagie-Aktivierung von der Inkubationszeit mit Etoposid.

A: Die Zellen wurden für 2-12 h mit $0,5 \mu\text{M}$ Etoposid behandelt. Die Zellzyklusanalyse wurde durchflusszytometrisch mittels DRAQ5TM-Einfärbung vorgenommen. B: Die Zellen wurden wie unter A beschrieben behandelt und simultan durchflusszytometrisch mittels DRAQ5TM-Einfärbung der Zellzyklus und mittels Cyto-ID-Einfärbung die Autophagie gemessen. C: Darstellung der Autophagie der nach der Cyto-ID-Fluoreszenz separierten Fraktionen (LOW-HIGH), wie unter 5.1.4 beschrieben, abhängig von der Inkubationszeit von Etoposid. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung 9A zeigt, dass der von $0,5 \mu\text{M}$ Etoposid hervorgerufene G2/M-Arrest nach 6 Stunden einzusetzen begann. Die Autophagie wurde bei 12-stündiger Behandlung mit Etoposid nicht signifikant aktiviert (Abbildung 9B). Dies deckt sich mit Vorversuchen, bei denen eine sichtbare Steigerung der Autophagie durch $0,5 \mu\text{M}$ Etoposid erst nach 24 Stunden Inkubationszeit zu vermerken war.

5.1.4 Autophagie-abhängige Verteilung der MOLM-13-Zellen im Zellzyklus

Um diesen Zusammenhang darzustellen, wurden die Messwerte des unter 5.1.3 beschriebenen Versuchs auf eine andere Weise dargestellt. Dafür wurden die Zellen anhand ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz in fünf gleichgroße Fraktionen eingeteilt und die korrelierenden Zellzyklusprofile analysiert.

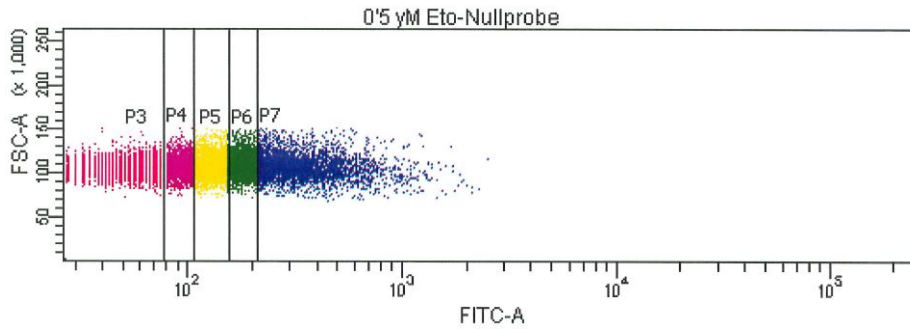
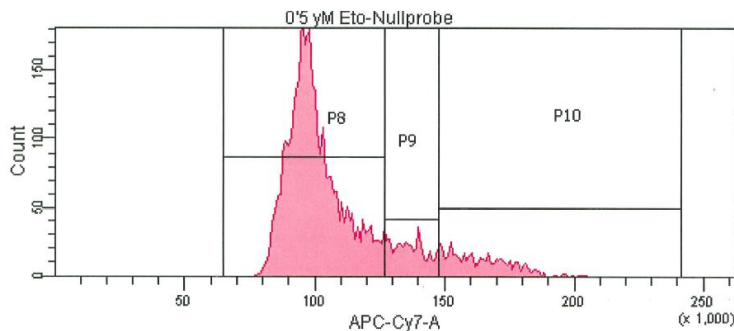
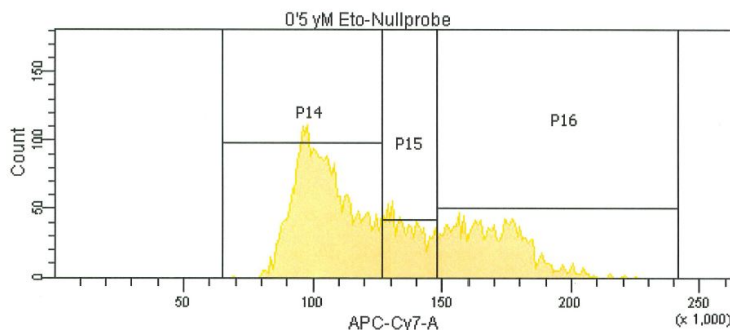


Abbildung 10: Darstellung der durchflusszytometrischen Einteilung der 5 Cyto-ID Fraktionen. Es handelt sich um unbehandelte Zellen, deren Autophagie mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt wurde. Die X-Achse zeigt den FITC-Kanal, in dem die Cyto-ID-Fluoreszenzen detektiert werden. Manuell wurden die vitale Zellpopulation nach ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz in 5 gleichgroße Fraktionen à 20 % unterteilt (P3-P7), wobei galt: P3=LOW, P4=LOW-MEDIUM, P5=MEDIUM, P6=MEDIUM-HIGH, P7=HIGH. Gezeigt wird stellvertretend der FACS-Dot-Plot der Nullprobe des im Folgenden beschriebenen Versuchs.



LOW



MEDIUM

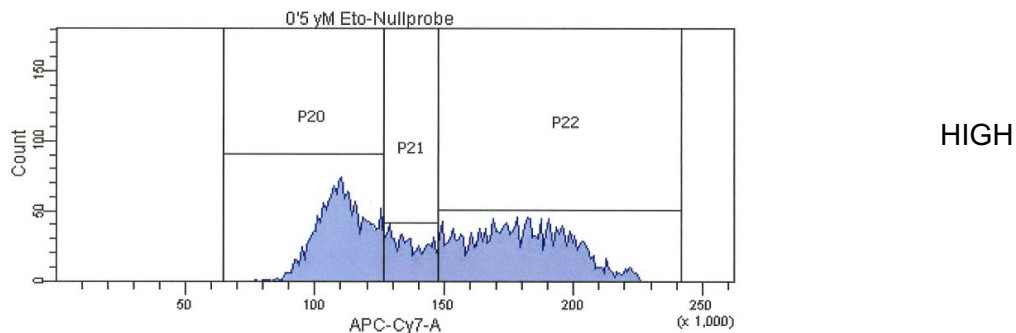


Abbildung 11: Darstellung der Zellzyklusprofile von LOW, MEDIUM und HIGH der 5 Cyto-ID-Fraktionen.

Es handelt sich um unbehandelte Zellen, deren Autophagie und Zellzyklus mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung und der DRAQ5TM-Einfärbung bestimmt wurde. Gezeigt sind exemplarisch die FACS-Abbildungen von LOW, MEDIUM und HIGH der 5 Cyto-ID-Fraktionen aus Abbildung 10. Dabei gilt für LOW: P8 = G1-Zellen, P9 = S-Zellen, P10 = G2/M-Zellen; für MEDIUM: P14 = G1-Zellen, P15 = S-Zellen und P16 = G2/M-Zellen; für HIGH: P20 = G1-Zellen, P21 = S-Zellen, P22 = G2/M-Zellen. Die Fraktionen LOW-MEDIUM (Abbildung 12, P4) und MEDIUM-HIGH (Abbildung 12, P6) sind nicht gesondert abgebildet, stellen aber durchflusszytometrisch genau die Transition zwischen LOW und MEDIUM bzw. MEDIUM und HIGH dar. Gezeigt sind stellvertretend die FACS-Histogramme eines von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 12 zeigt, dass Zellen, die sich in ihrer Autophagie-Aktivität unterschieden, unterschiedlich weit im Zellzyklus fortgeschritten waren. Betrachtet man die unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 0, so befanden sich circa 80 % der Zellen der Fraktion LOW (Zellen mit niedriger Autophagie-Aktivität) in der G1-Phase und 11 % dieser Zellen in der G2/M-Phase. Von den Zellen, die hohe Autophagie-Aktivität zeigten (HIGH), befanden sich lediglich 40 % in der G1-Phase, dafür aber 45 % in der G2/M-Phase. Dieses Phänomen der unterschiedlichen Verteilung der Zellen im Zellzyklus, abhängig von ihrer Autophagie-Aktivität, zeigte sich sowohl in unbehandelten als auch in Etoposid-behandelten Zellen: Stets fand sich der Großteil der Zellen mit niedriger Autophagie-Aktivität in der G1-Phase und solche mit hoher Autophagie-Aktivität größtenteils in der G2/M-Phase. Auch hier war der Etoposid-induzierte G2/M-Arrest in allen Fraktionen gleichermaßen mit steigender Inkubationszeit festzustellen.

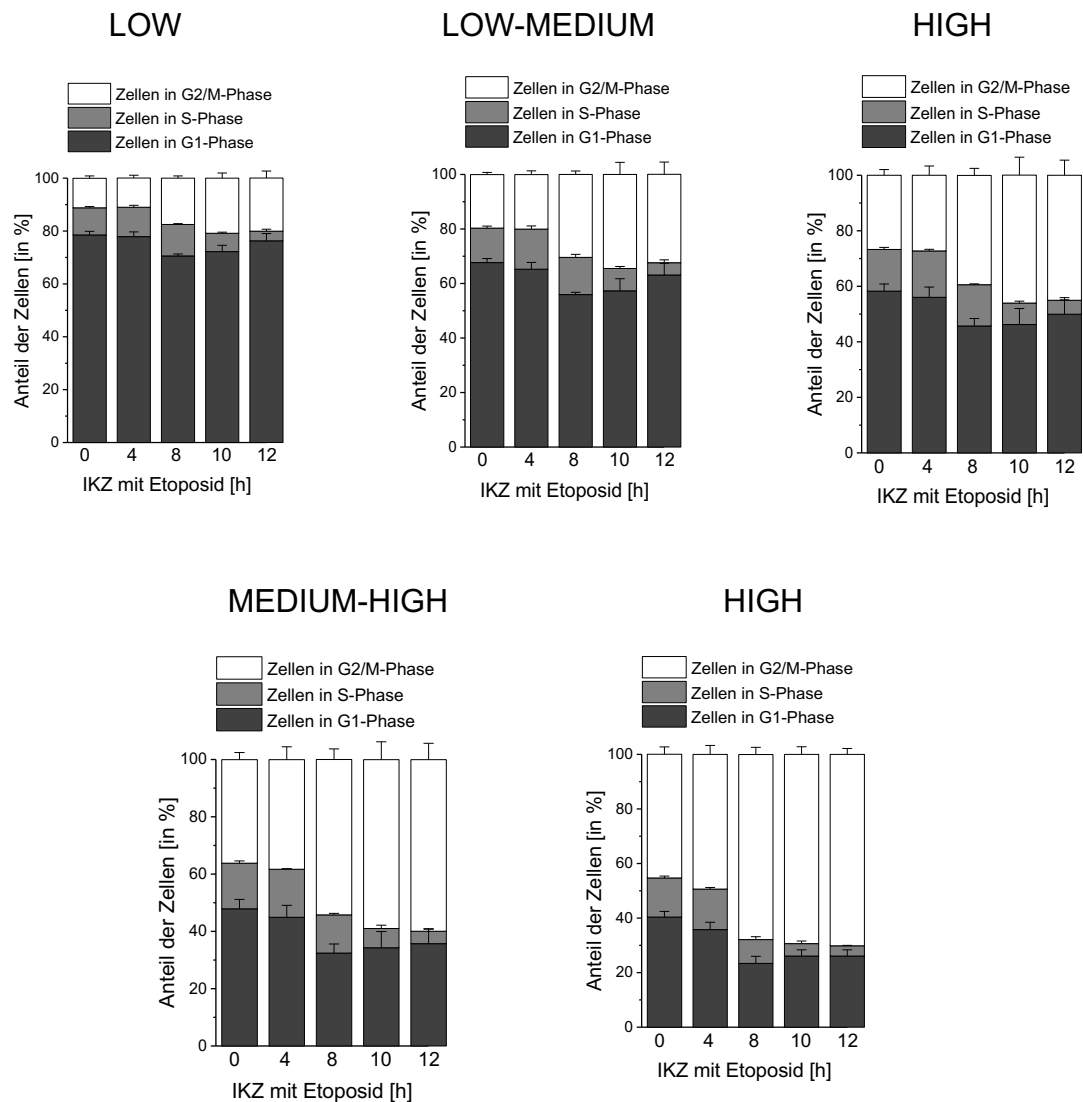


Abbildung 12: Darstellung der 5 Cyto-ID Fraktionen und deren Zellzyklusprofile mit steigender Inkubationszeit von 0,5 µM Etoposid.

Die Zellen wurden für 4-12 h mit Etoposid behandelt und anschließend durchflusszytometrisch der Zellzyklus mittels DRAQ5TM und die Autophagie-Aktivität mittels Cyto-ID-Einfärbung gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

5.2 Optimierung der Methode der Autophagie-spezifischen Zellsortierung mittels Cyto-ID

Da die vorherigen Ergebnisse eindeutig ergaben, dass Zellen, die niedrigere Cyto-ID-Fluoreszenz aufwiesen, sich anders im Zellzyklus verhielten als diejenigen mit höherer Cyto-ID-Fluoreszenz, bestand besonderes Interesse, diesem Zusammenhang nachzugehen. Dafür sollte die Methode der Zellsortierung am FACS-Sortiergerät genutzt werden, die in der Arbeitsgruppe erst kürzlich entwickelt, aber noch nicht zur Gänze optimiert worden war. Dafür wurden MOLM-13-Zellen mit Cyto-ID eingefärbt und anschließend durchflusszytometrisch in drei gleich große Fraktionen aufgetrennt (siehe 4.2.2.2). So erhielt man drei Zellfraktionen, die sich in ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz deutlich unterschieden und wie folgt benannt wurden: Aut^{LO},

Aut^{ME}, Aut^{HI}. An die Zellsortierung wurden die folgenden Versuche angeschlossen, um Zellen mit unterschiedlicher basaler Autophagie-Aktivität besser zu charakterisieren.

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz

Vorbereitend für die Zellsortierung musste die Methode zunächst optimiert werden. Dafür wurde sowohl die Temperatursensibilität als auch die Zytotoxizität des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID auf die MOLM-13-Zellen genauer geprüft

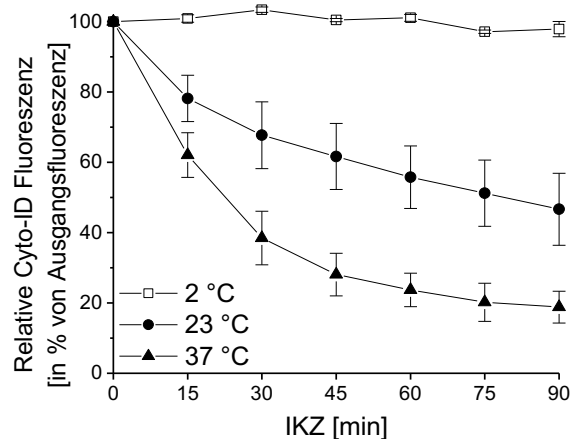


Abbildung 13: Einfluss der Umgebungstemperatur und der Inkubationszeit auf die Cyto-ID-Fluoreszenz der gefärbten Zellen.

Die Zellen wurden nach Protokoll (siehe 4.2.2.1.3) und bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 15-90 Minuten lichtgeschützt mit Cyto-ID inkubiert. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Fluoreszenzintensität des Startwertes wurde als 100 % definiert. Die Cyto-ID-Werte über die Zeit wurden als Anteile des Startwerts in Prozent angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 13 zeigt, dass die gemessenen Cyto-ID-Fluoreszenzwerte eindeutig von den Inkubationsbedingungen und der Inkubationszeit abhängen. Je niedriger die Inkubationstemperatur gewählt wurde, desto stabiler waren die Cyto-ID-Fluoreszenzwerte. Bei Inkubation der Zellen auf Eis blieb die Fluoreszenz auf dem Ausgangsniveau mit lediglich geringen Schwankungen über 90 Minuten stabil. Bei 37 °C hingegen wurde nach 15 Minuten Inkubation eine Cyto-ID-Fluoreszenz von 62 % des Ausgangswertes und nach 90 Minuten nur noch 20 % der Ausgangsfluoreszenz gemessen. Folglich wurde der FACS-Cellsorter auf 4 °C eingestellt. Zudem wurde mit Cyto-ID-gefärbten Proben stets auf Eis gearbeitet.

5.2.2 Zytotoxizität von Cyto-ID in MOLM-13-Zellen

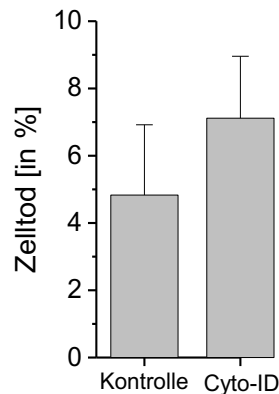


Abbildung 14: Zytotoxizität von Cyto-ID in MOLM-13-Zellen.

Die Zellen wurden für 24 h mit der üblichen Konzentration von Cyto-ID (1:1000 verdünnt) behandelt und unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Der Zelltod wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Das Protokoll der Anwendung von Cyto-ID beinhaltet eine Inkubationszeit von 30 Minuten mit der angesetzten Cyto-ID-Verdünnung. Abbildung 14 zeigt, dass auch bei einer Inkubation von 24 Stunden der Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID nur geringfügig zytotoxisch wirkte. Dies erlaubte mir das Sortieren der Zellen und die damit verbundene anschließende Kultivierung durchführen zu können, ohne einen toxischen Einfluss des Cyto-IDs befürchten zu müssen. Die Waschvorgänge vor und nach der Zellsortierung sollten zusätzlich zellprotektiv wirken.

5.2.3 Autophagie-Aktivierung durch SRT1720 in MOLM-13-Zellen

Für die Versuche, die nicht der Zellsortierung folgten, wurde Etoposid als Autophagie-Aktivator eingesetzt. Da aber anschließend an die Zellsortierung die Analyse des Zellzyklus und der Chemosensibilität an möglichst unbeeinflussten Zellen stattfinden sollte, musste nach einer Alternative zu Etoposid gesucht werden. Grund dafür war der Etoposid-induzierte G2/M-Arrest, der eine reine Beurteilung der Zellzyklusprofile der sortierten Zellen erschwert hätte. Für die Untersuchung der Chemosensibilität sollte ebenfalls keine Vorbehandlung der Zellen mit einem Zytostatikum stattgefunden haben. Zum Einsatz kam stattdessen der Sirt-1-Aktivator SRT1720, da dieser eine geringe Zytotoxizität bei stark autophagozytotisch-induzierender Konzentration aufwies.

Abbildung 15A zeigt, dass die Cyto-ID-Fluoreszenz und somit die zelluläre Autophagie-Aktivität mit steigenden Konzentrationen von SRT1720 zunahm. Abbildung 15C zeigt die Cyto-ID-Fluoreszenz un behandelter MOLM-13-Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit 5 μ M SRT1720 (Abbildung 15D) für 24 Stunden ließ sich eindeutig eine Verschiebung der

Zellen auf der Y-Achse nach oben erkennen und damit eine deutliche Aktivierung der Autophagie. Abbildung 15B zeigt, dass auch der Zelltod mit steigenden Konzentrationen zunahm. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung bei einer Konzentration von 7,5 μM wurde der Autophagie-Aktivator mit einer Endkonzentration von 5 μM eingesetzt. Bei diesem Wert zeigt SRT1720 geringe Zytotoxizität und eine Verdopplung der autophagozytotischen Aktivität in MOLM-13-Zellen.

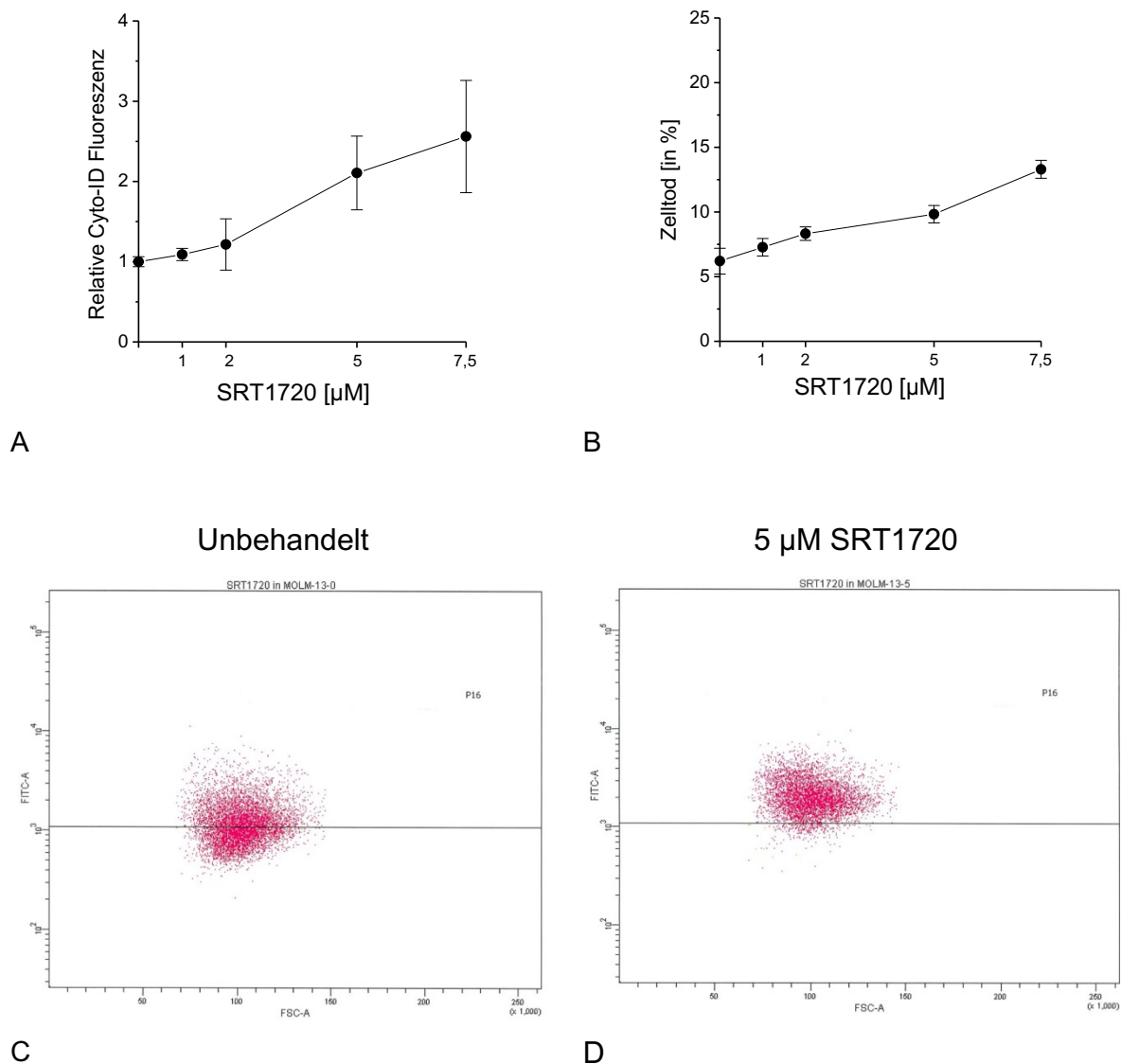


Abbildung 15: Nachweis der Zytotoxizität und der Autophagie-Aktivierung durch SRT1720.

A: Die Zellen wurden 24 h mit SRT1720 behandelt. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Autophagie mittels Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Die Cyto-ID Werte sind als Vielfache des Ausgangswertes (Nullprobe) angegeben. B: Die Zellen wurden ebenfalls für 24 h mit SRT1720 behandelt und der Zelltod durchflusszytometrisch mittels PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. C: Die Zellen wurden wie unter A beschrieben behandelt und analysiert. Gezeigt wird die durchflusszytometrische Darstellung der Cyto-ID-Fluoreszenz (Y-Achse) von unbehandelten Zellen im Vergleich zu behandelten (mit 5 μM SRT1720) Zellen. Anhand der willkürlich gesetzten Linie lässt sich eindeutig die Verschiebung der Population nach oben auf der Y-Achse beobachten. Gezeigt sind exemplarisch die FACS-Dot-Plots von unbehandelten und behandelten Zellen, stellvertretend für zwei unabhängige Experimente.

Zudem wurde auch der Einfluss von SRT1720 auf den Zellzyklus geprüft. Da vorherige Experimente zeigten, dass Autophagie-induzierende Substanzen wie Etoposid einen starken Einfluss auf den Zellzyklus haben können, sollte dies für SRT1720 ausgeschlossen werden.

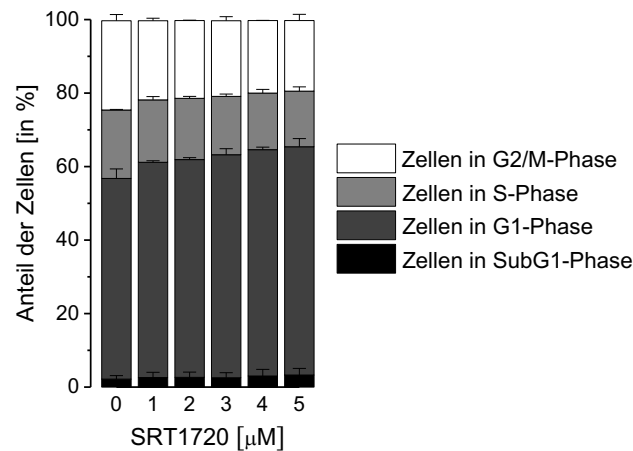


Abbildung 16: Einfluss von SRT1720 auf den Zellzyklus.

Die Zellen wurden für 24 h mit SRT1720 behandelt und der Zellzyklus durchflusszytometrisch mittels PI-Einfärbung nach Fixierung der Zellen in Ethanol bestimmt. Die Sub-G1-Zellen spiegeln den Anteil an toten Zellen wider. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 16 zeigt, dass die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen durch die Behandlung mit SRT1720 nicht nennenswert beeinflusst wurde. Der Anteil an Sub-G1-Zellen nahm geringfügig zu, was die geringe Zytotoxizität von SRT1720 in Abbildung 15B bestätigt. SRT1720 eignete sich in niedrigen Konzentrationen durch die gemessene Verdopplung der Cyto-ID-Fluoreszenz und die geringe Zytotoxizität als Autophagie-Aktivator. Zudem griff es nicht in den Zellzyklus ein, was für die Anschlussexperimente der Zellsortierung von großer Bedeutung war.

5.3 Unterschiede in der basalen Autophagie-Aktivität der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

5.3.1 Autophagie-Kinetik der sortierten Fraktionen

Zunächst interessierte, wie sich die Autophagie-Aktivität der sortierten Zellen nach Abschluss der Zellsortierung über einen längeren Zeitraum verhielt. Abbildung 17 zeigt, dass zwischen den unbehandelten und den vorbehandelten sortierten Zellen kein nennenswerter Unterschied im Verlauf der basalen Autophagie-Aktivität zu vermerken war. Sowohl die vorbehandelten als auch die unbehandelten Fraktionen unterschieden sich in ihren Cyto-ID-Intensitäten eindeutig. Dabei betrug die Cyto-ID Fluoreszenz von Aut^{HI} anfangs mehr als das Doppelte der Cyto-ID-Fluoreszenz von Aut^{LO}, was für eine erfolgreiche Trennung der unterschiedlichen Fraktionen sprach. Auch die Autophagie-Induktion mittels SRT1720 konnte durch diesen Versuch

bestätigt werden, was aus Tabelle 15 hervorgeht. Im zeitlichen Verlauf näherten sich beide Fraktionen der mittleren Fraktion Aut^{ME} an. Nach 23 Stunden unterschieden sich die Fraktionen noch immer in ihrer Autophagie-Aktivität. Hierbei war der Unterschied zwischen Aut^{HI} und Aut^{ME} weitaus prägnanter als zwischen Aut^{LO} und Aut^{ME} . Um den molekularbiologischen Mechanismus, der ursächlich für die Unterschiede in der basalen Autophagie zwischen den Zellfraktionen sein könnte, besser zu verstehen, wurden die sortierten MOLM-13-Zellen in weiteren Versuchen genauer charakterisiert.

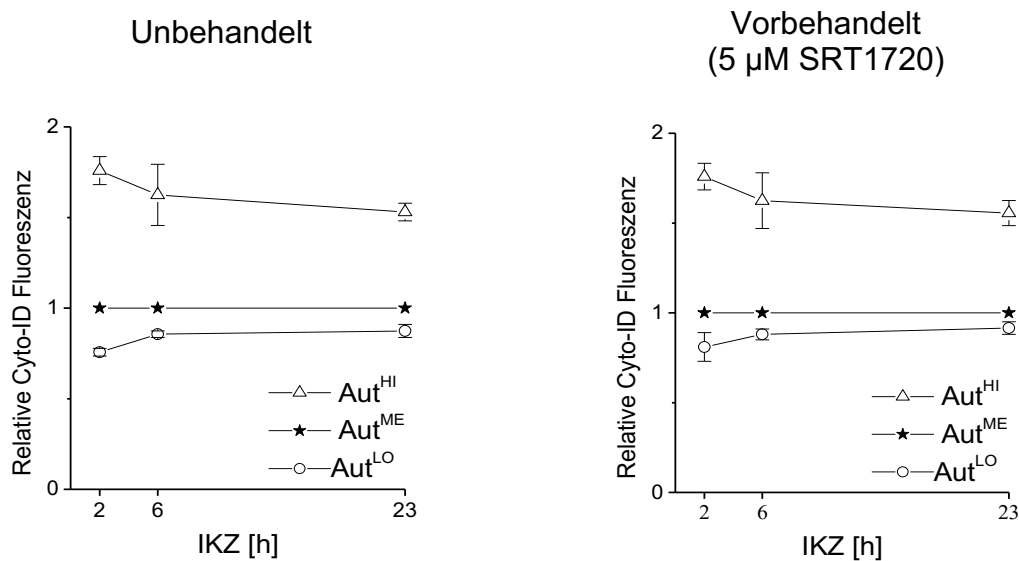


Abbildung 17: Messung des zeitlichen Verlaufs der Cyto-ID-Fluoreszenz nach Zellsortierung von unbehandelten und vorbehandelten Zellen.

A: Ein Teil der Zellen wurde 24 h mit SRT1720 vorbehandelt, gewaschen und anschließend zeitgleich mit den unbehandelten Zellen sortiert. Die Cyto-ID-Fluoreszenzen von Aut^{HI} und Aut^{LO} sind auf die jeweiligen zeitlich korrespondierenden Werte von Aut^{ME} normalisiert und als Vielfache davon angegeben. IKZ = Inkubationszeit. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

	Unbehandelt	Vorbehandelt (5 μM SRT1720)
Aut^{LO}	899	1320
Aut^{ME}	1188	1633
Aut^{HI}	2087	2881

Tabelle 15: Darstellung der absoluten Cyto-ID-Fluoreszenzwerte behandelter und unbehandelter sortierter Zellen 2 h nach Zellsortierung.

Gezeigt sind tabellarisch die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

5.3.2 Expressionsmuster Autophagie-relevanter Gene in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Da die Unterschiede der sortierten Fraktionen in ihrer Autophagie-Aktivität noch 23 Stunden nach der Zellsortierung bestanden, wurde das Expressionsmuster ausgewählter Autophagie-relevanter Gene in den sortierten Zellen untersucht.

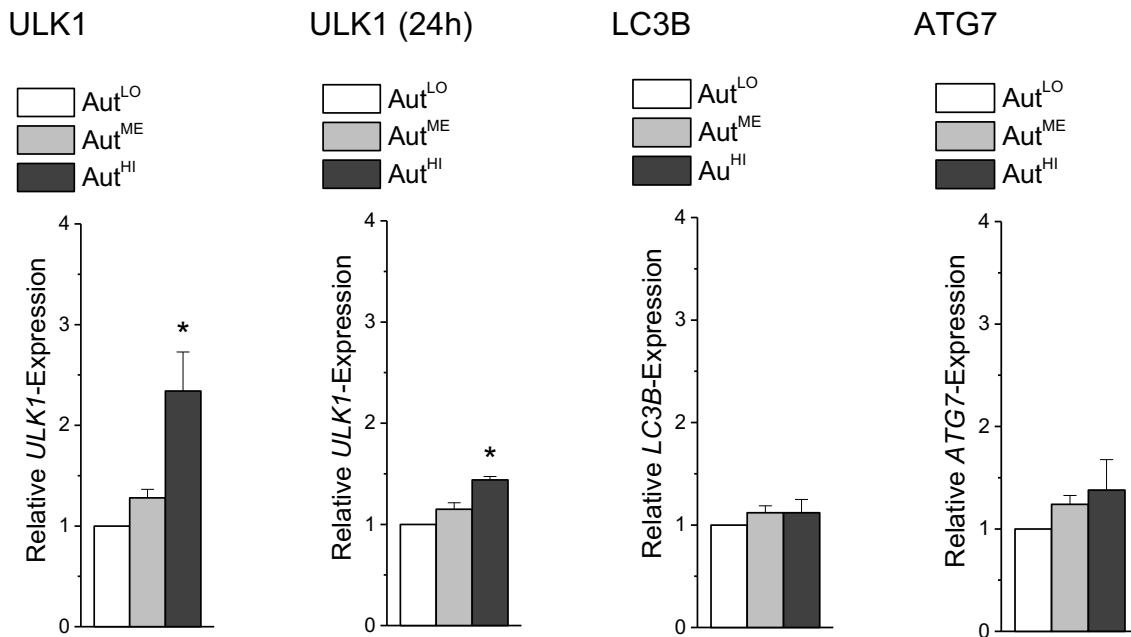


Abbildung 18: Relative Expression der ULK1-mRNA, der LC3B-mRNA und ATG7-mRNA direkt nach Zellsortierung und der ULK1-mRNA 24 h nach Zellsortierung.

Die RNA der sortierten Zellen wurden direkt nach Zellsortierung bzw. nach 24-stündiger Inkubation isoliert und die Genexpressionsmuster mittels Real Time RT-PCR ermittelt. Die Expressionsraten von Aut^{ME} und Aut^{HI} wurden als Vielfache des Expressionsmusters von Aut^{LO} angegeben. Als Referenzgen diente die Expression des Polypeptids β 2-Mikroglobulin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Für Aut^{HI} vs. Aut^{LO} gilt $*p < 0,05$.

ULK1: Die Serin/Threonin-Kinase ULK1 ist für die Initiation der Autophagie essentiell. Je nach Energiestatus und Nährstoffangebot wird dabei ULK1 über Phosphorylierung durch mTOR und die AMP-Kinase reguliert. In Abbildung 18 wird deutlich, dass direkt nach der Zellsortierung *ULK1* in Zellen mit hoher Autophagie signifikant höher exprimiert war als in Zellen mit niedriger Autophagie. Auch 24 Stunden nach der Zellsortierung ließ sich noch immer ein signifikanter Unterschied zwischen der *ULK1*-Expression in Aut^{HI}-Zellen und Aut^{LO}-Zellen vermerken.

LC3B: LC3B ist ein Strukturprotein, dessen PE-konjugierte Form, LC3B-II, sich innen und außen in der Autophagosomen-Membran befindet. Auf Transkriptionsebene ließen sich keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von *LC3B* in den sortierten Fraktionen nachweisen. Da die Entstehung von LC3B-I und die Konjugation zu LC3B-II posttranslational stattfinden, wurde im Anschluss die Proteinausstattung der sortierten Fraktionen untersucht.

Atg7: Atg7 ist eine Kinase, die im Autophagie-Prozess unter anderem Atg12 und LC3B-I aktiviert und damit an der Phagophorenbildung und –Expansion beteiligt ist. Es zeigt sich eine Tendenz zur erhöhten Atg7-Expression von Aut^{LO} nach Aut^{HI}.

5.3.3 Nachweis der Expression Autophagie-relevanter Proteine in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Da es sich bei der Autophagie um einen sehr dynamischen Prozess handelt, war es von besonderem Interesse, neben der Genexpression auch die Expression Autophagie-relevanter Proteine zu analysieren. Durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung wird die Autophagie-Aktivität einer Zelle maßgeblich reguliert.

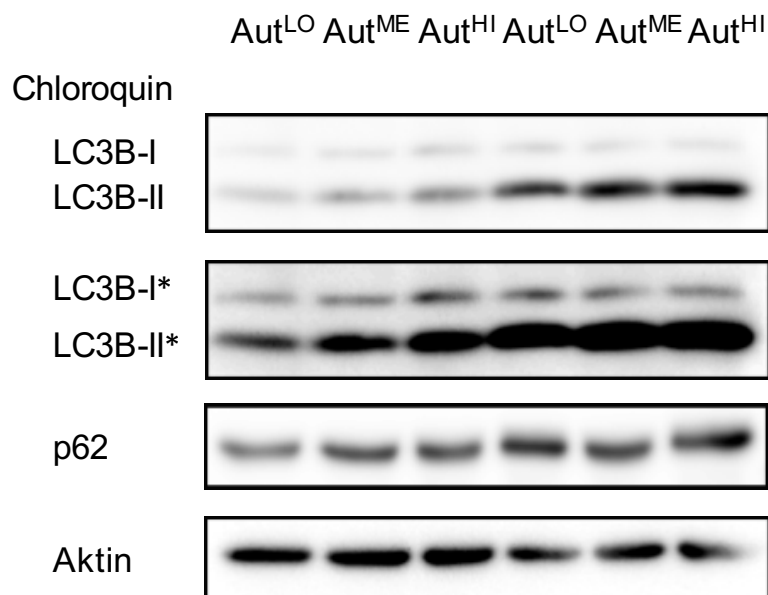


Abbildung 19: Nachweis der Expression Autophagie-relevanter Proteine in den Cyto-ID-sortierten Fraktionen mittels Western Blot.

Die Lysate der Zellen wurden direkt nach der Zellsortierung bzw. nach 1-stündiger Inkubation mit 10 μ M CQ hergestellt. „Aut^{LO}, Aut^{ME} und Aut^{HI}“ kennzeichnen die sortierten Fraktionen. LC3B-I* und LC3B-II* zeigen eine längere Exposition desselben Blots. Aktin dient als „House keeping Protein“ (HKP). Gezeigt ist ein Western Blot stellvertretend für vier unabhängige Western Blots.

p62: Abbildung 19 zeigt, dass sich die sortierten Fraktionen in der p62/SQSTM1-Expression nicht augenscheinlich unterscheiden. An p62 gebundene polyubiquitinierte Proteine werden zum Phagophor transportiert, an LC3B-II gebunden und abschließend im Autolysosom degradiert (selektive Autophagie). Die Inhibition der Autophagie korreliert mit erhöhten p62-Banden im Western Blot (Klionsky et al. 2016), was sich auch im gezeigten Western Blot bei Inkubation mit CQ andeutete (Abbildung 19), vergleicht man beispielsweise Aut^{LO} und Aut^{LO}+CQ. Pharmakologische Autophagie-Aktivierung kann aufgrund der rapiden Umsetzung der Autophagosomen und dem damit verbundenen Abbau von p62 zur Abnahme des p62-

Levels führen. Bei der Sortierung der Zellen nach ihrer basalen Autophagie-Aktivität konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden.

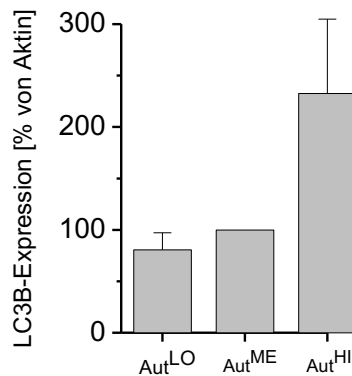


Abbildung 20: Expression von LC3B in den Cyto-ID-sortierten Zellen.

Mittels ImageJ wurde densitometrisch die LC3B-Proteinexpression der sortierten Zellen in Relation zu der Aktin-Proteinexpression, die als HKP diente, analysiert. Aut^{LO} und Aut^{HI} werden als Vielfache von Aut^{ME} angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten.

LC3B: Eine Standardmethode zum Nachweis der Autophagie-Aktivität ist die quantitative Proteinbestimmung von LC3B-I und dessen Konjugat mit PE, dem hydrophoberen LC3B-II (Klionsky et al. 2016). Die Menge an intrazellulärem LC3B-II ist proportional zur Menge an Autophagosomen. Abbildung 19 zeigt, dass die Banden von LC3B-II von Aut^{LO} bis Aut^{HI} deutlich an Intensität zunahmten. Densitometrisch verdeutlicht Abbildung 20, dass die LC3B-Proteine in Aut^{HI} deutlich höher exprimiert waren als in Aut^{LO} (im Vergleich zu Aktin als HKP). Um Unterschiede im *autophagic flux* der Zellen nachzuweisen, wurden, wie unter 2.2.4 erläutert, die Zellen 1 Stunde mit CQ vor Anfertigung der Lysate inkubiert. Bei Inkubation mit CQ nahmen durch die Inhibition des Abbaus der Autophagosomen die zellulären Mengen an LC3B-II in Aut^{LO} und Aut^{ME} und Aut^{HI} ungefähr gleichermaßen zu. Dieser Anstieg war in allen Fraktionen ähnlich stark vorhanden. Zusätzlich konnte mittels der Western Blots die Methode der Zellsortierung durch Cyto-ID verifiziert werden, indem gezeigt werden konnte, dass es sich in den verschiedenen Fraktionen wirklich um Zellen mit unterschiedlicher basaler Autophagie-Aktivität handelte.

5.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von LC3B- und p62-Puncta in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Um die intrazelluläre Verteilung von Autophagie-relevanten Proteinen und womöglich Unterschiede zwischen den sortierten Fraktionen zu betrachten, wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt. Hierfür wurden LC3B- und p62-Antikörper eingesetzt. Der Zellkern wurde mittels DAPI eingefärbt.

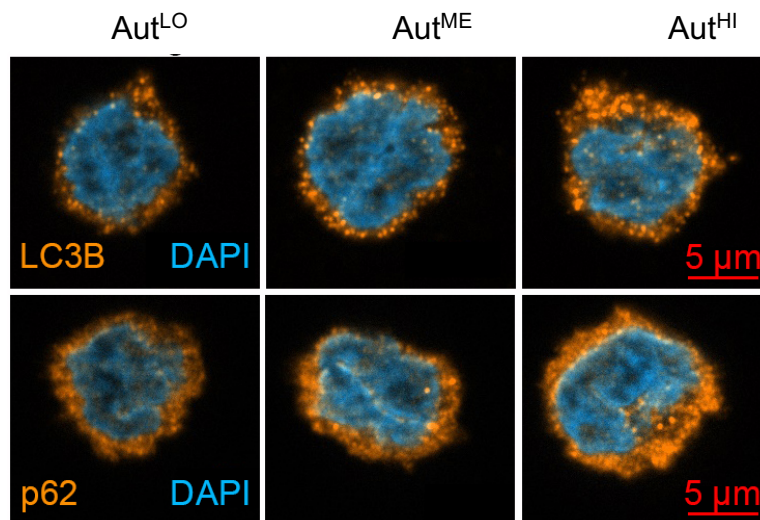


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von LC3B- und p62-Puncta in den Cyto-ID-sortierten Zellen.

Die Zellen wurden direkt nach Zellsortierung wie unter 4.2.2.5 beschrieben für die Anfertigung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder bearbeitet und anschließend mittels des Zeiss Axio Imager ApoTome Mikroskop analysiert. Gezeigt wird stellvertretend für drei unabhängige Experimente eine Zelle pro Fraktion und Antikörper.

Abbildung 21 zeigt stellvertretend eine Zelle jeder Fraktion pro eingesetzten Antikörper. Der Antikörper färbt sowohl zytosolisches LC3B-I als auch in Autophagosomen gebundenes LC3B-II an. Auffällig ist eine Zunahme des LC3B-Antikörper-Signals von Aut^{LO} zu Aut^{HI}. Zudem nimmt auch die Anzahl der punktuellen LC3B-Antikörper-Signale zu.

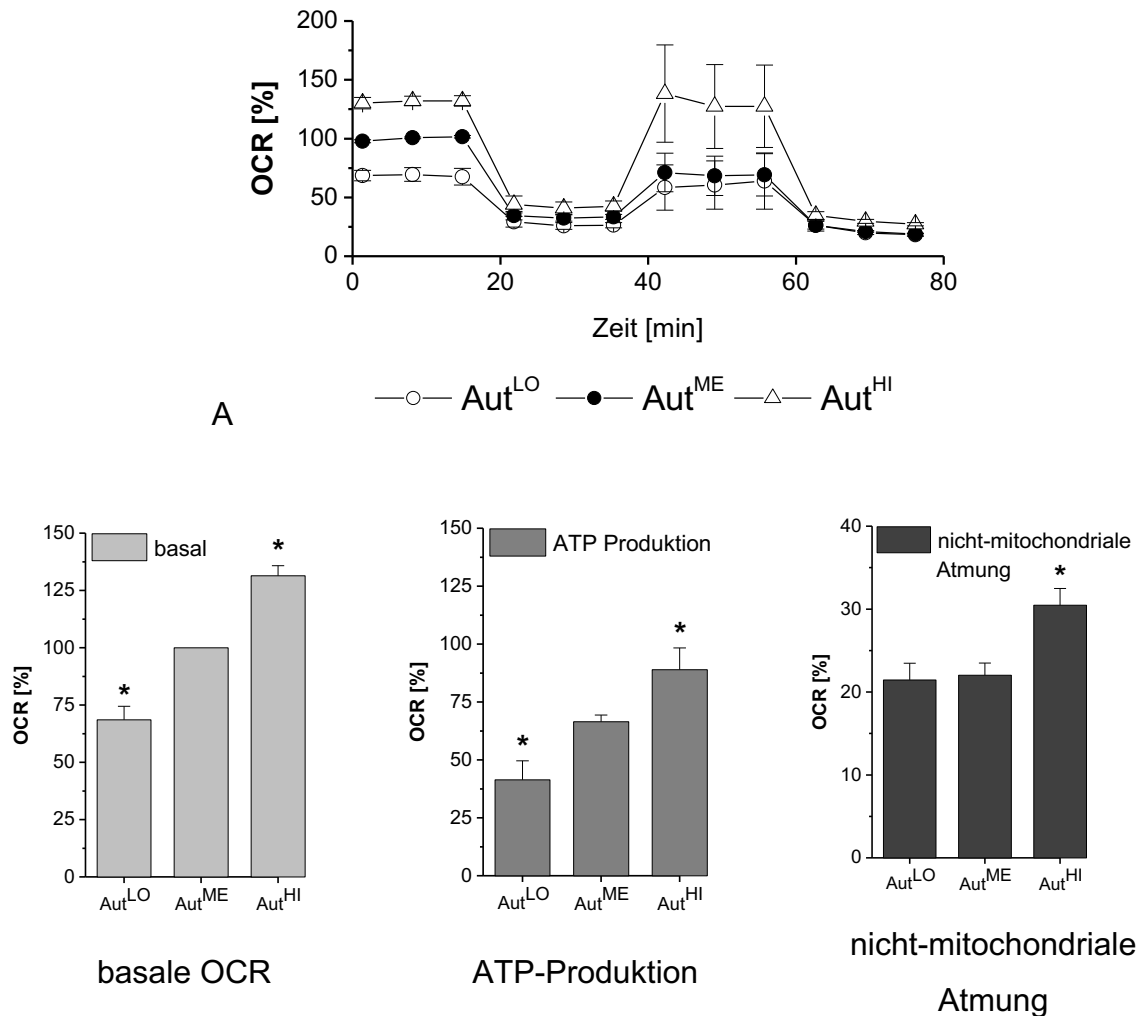
Die Aufnahmen der Zellen, die mit dem p62-Antikörper inkubiert wurden deuten auch auf eine Zunahme des p62-Fluoreszenzsignals hin. Bei der Verteilung zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede. Es zeigte sich ebenso, dass in Aut^{HI} überdurchschnittlich viele Zellteilungsfiguren im Vergleich zu Aut^{LO} und Aut^{ME} zu sehen waren (hier nicht gesondert gezeigt) und dass das DAPI-Signal an Intensität zunahm.

5.4 Analyse des Energiestoffwechsels der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Nachdem in den sortierten Fraktionen Unterschiede in ihrer basalen Autophagie-Aktivität nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob die Fraktionen sich auch in ihrem Energieprofil unterschieden. Dass es einen Zusammenhang zwischen der basalen Autophagie und dem zellulären Metabolismus gibt, war anzunehmen.

Mittels des Seahorse XF96 können simultan zwei Hauptenergiegewinnungswege einer Zelle gemessen werden. Die glykolytische Aktivität wird mittels der Ansäuerung des Mediums (ECAR) und die mitochondriale Atmung mittels der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) im Medium bestimmt. Zum besseren Verständnis der Methode und der Ergebnisse wird auf 4.2.2.4 verwiesen.

5.4.1 Zunahme des mitochondrialen Metabolismus mit steigender basaler Autophagie



B

Abbildung 22: Analyse des mitochondrialen Metabolismus und Bestimmung spezifischer Parameter (ATP-Produktion und nicht-mitochondriale Atmung) der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.

Die Zellen wurden nach der Zellsortierung dem Cell Mito Stress Test ausgesetzt und anschließend mittels Seahorse XF96-Analyser analysiert. Der Cell Mito Stress Test wurde wie folgt durchgeführt: die Zugabe von Oligomycin ($2\ \mu\text{M}$) erfolgte nach 20 Minuten, von 2,4-Dinitrophenol ($15\ \mu\text{M}$) nach 40 Minuten und von Antimycin A ($2\ \mu\text{M}$) nach 60 Minuten. Die Werte von Aut^{HI} und Aut^{LO} sind auf die Werte der mittleren Fraktion (Aut^{ME}) normalisiert, dabei wurden die Werte der mittleren Fraktion gleich 100 % gesetzt (Abbildung 22B: basale OCR). Aut^{HI}, Aut^{ME} und Aut^{LO} für die Berechnung der ATP-Produktion und nicht-mitochondriale Atmung sind auf die basale OCR von Aut^{ME} normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Für B gilt: Aut^{HI} und Aut^{LO} vs. Aut^{ME} * entspricht $p < 0,05$.

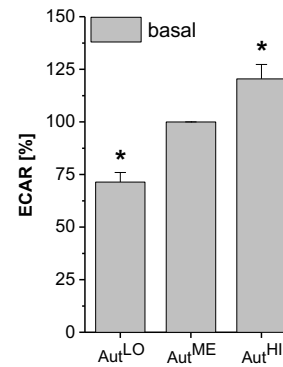
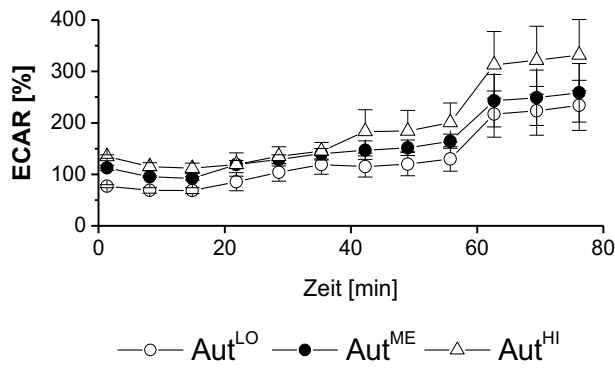
Die sortierten Fraktionen unterschieden sich nennenswert in ihrer basalen OCR. Dies sprach für eine unterschiedlich aktivierte OXPHOS und damit mitochondriale Aktivität (Abbildung 22B). Nach Zugabe von Oligomycin, einem ATP-Synthase-Inhibitor, kam es in allen drei Fraktionen zur Inhibition der mitochondrialen Atmung (Abbildung 22A). Aus der Differenz der basalen OCR und den OCR-Werten nach Zugabe von Oligomycin errechnete sich die ATP-Produktion der einzelnen Fraktionen. Zellen mit hoher und mittlerer Autophagie-Aktivität

zeigten eine gesteigerte ATP-Produktion (Abbildung 22B). Danach wurde 2,4-Dinitrophenol (DNP) appliziert, ein Ionophor, das die OXPHOS entkoppelte und diese dadurch auf maximalem Niveau arbeiten ließ. Der sich daraus ergebende Wert wird als maximale respiratorische Kapazität bezeichnet, die immer im Vergleich zur basalen OCR betrachtet wird. Diese war von Aut^{HI} höher als die basale OCR (Abbildung 22A). Die OXPHOS der Zellen von Aut^{HI} besaßen eine Reserve-Kapazität, die bei erhöhtem Bedarf ausgeschöpft werden konnte. Aut^{ME} und Aut^{LO} zeigten dieses Phänomen nicht. Zuletzt wurde Antimycin A, das den Komplex III der OXPHOS hemmt, appliziert, wodurch die mitochondriale Atmung zum Erliegen gebracht wurde. Durch die Zugabe von Antimycin A ergibt sich aus dem gemessenen OCR-Wert die nicht-mitochondriale Atmung, welche in Abbildung 22B dargestellt wird. Die nicht-mitochondriale Atmung, die auf dem Sauerstoffverbrauch zellulärer Enzyme basiert, war bei Aut^{HI} gegenüber den anderen zwei Fraktionen leicht erhöht.

5.4.2 Zunahme der glykolytischen Aktivität mit steigender basaler Autophagie

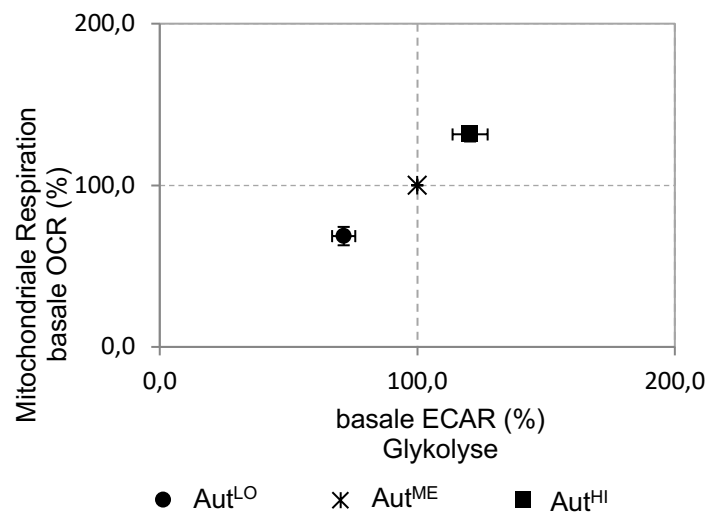
Die MOLM-13-Zellen zeigten ein sehr glykolytisches Energieprofil, was charakteristisch für Tumorzellen ist. Proportional zu den basalen Werten der OCR galt auch für die ECAR-Werte: Aut^{HI} > Aut^{ME} > Aut^{LO} (Abbildung 23B). Dabei zeigten vor allem Zellen in Aut^{HI} einen sehr hohen glykolytischen Stoffwechsel. Auffällig ist die immense Steigerung der ECAR-Werte aller Fraktionen nach Applikation von DNP und Antimycin A, wobei sich auch hier Aut^{HI} > Aut^{ME} > Aut^{LO} einstellte. Nachdem durch Antimycin A die OXPHOS der Zellen vollkommen gehemmt wurde, steigerten diese ihren Glucose-Stoffwechsel nennenswert, um die Energiebereitstellung bei ausgefallener Atmungskette zu sichern.

Der mitochondriale Metabolismus (Aut^{HI} gegenüber Aut^{ME} + 31 %) wie auch die Glykolyse (Aut^{HI} gegenüber Aut^{ME} + 20 %) waren zum Zeitpunkt nach der Zellsortierung in den Zellen mit hoher Autophagie-Aktivität vermehrt aktiv (siehe Abbildung 23C). Die Zellen mit niedriger Autophagie zeigten eine basale OCR von 67 % und basale ECAR-Werte von 71 %, was für eine geringere Energiebereitstellung und somit für einen verminderten Energiebedarf sprach. Je höher also die Cyto-ID-Fluoreszenz einer Zelle ist, desto mehr basale mitochondriale Respiration wie auch basaler Glucose-Stoffwechsel waren messbar.



A

B



C

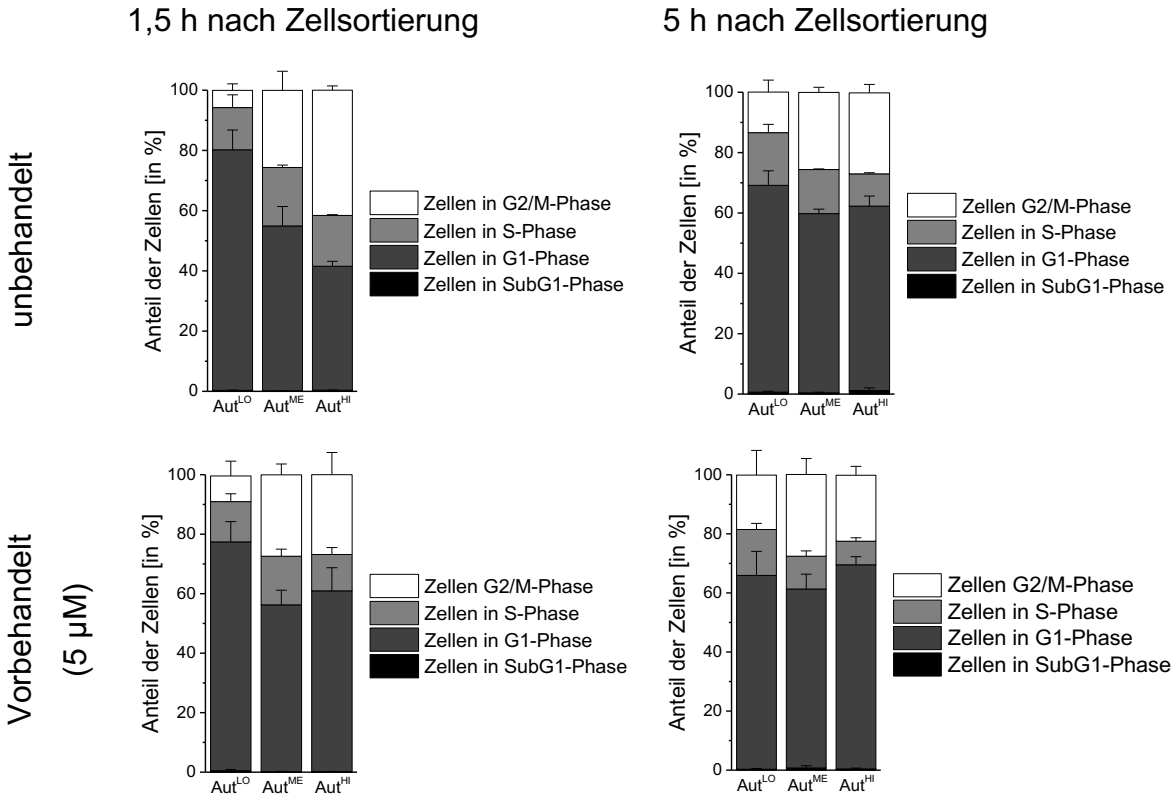
Abbildung 23: Analyse der glykolytischen Aktivität (A+B) und Darstellung von basaler OCR und ECAR (C) der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.

A: Die Zellen wurden wie unter Abbildung 22 beschrieben behandelt. Die ECAR wurde ebenfalls mittels des Seahorse XF96 simultan zur OCR gemessen. B zeigt gesondert die basalen Werte der ECAR. C zeigt sowohl basale ECAR als auch OCR für die sortierten Fraktionen. Die Werte von Aut^{HI} und Aut^{LO} sind auf die Werte der mittleren Fraktion (Aut^{ME}) normalisiert, dabei wurden die Werte der mittleren Fraktion gleich 100 % gesetzt.

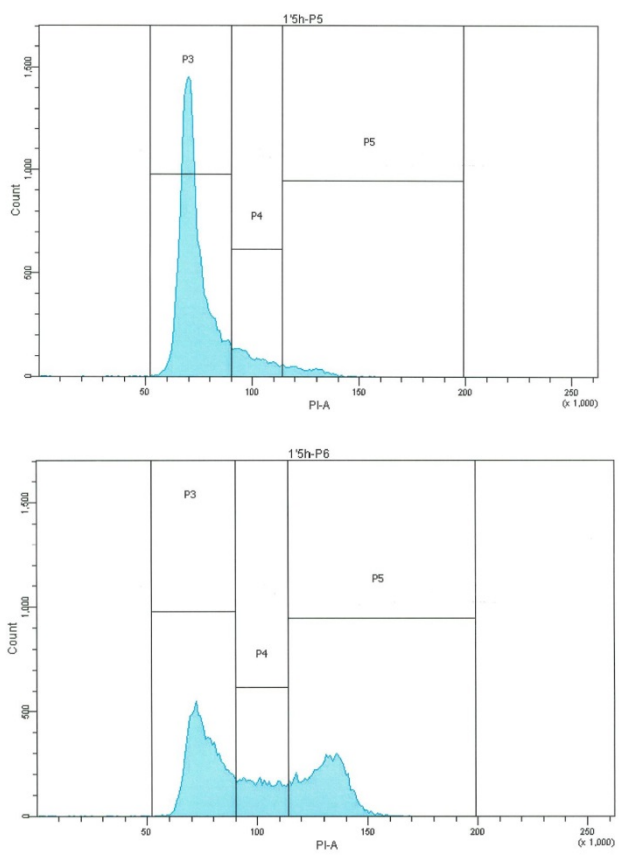
5.5 Analyse des Zellzyklus der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

5.5.1 Unterschiede im Zellzyklusprofil zwischen den Cyto-ID-sortierten Fraktionen

Da anfängliche Versuche ergaben (Abbildung 12), dass sich Zellen mit hoher Cyto-ID-Fluoreszenz vermehrt in der G2/M-Phase befanden, sollte dies anhand der Cyto-ID-sortierten Zellen verifiziert werden. Für die Zellzyklusanalysen wurden die Zellen nach der Zellsortierung mit Ethanol fixiert und anschließend PI-gefärbt durchflusszytometrisch gemessen.

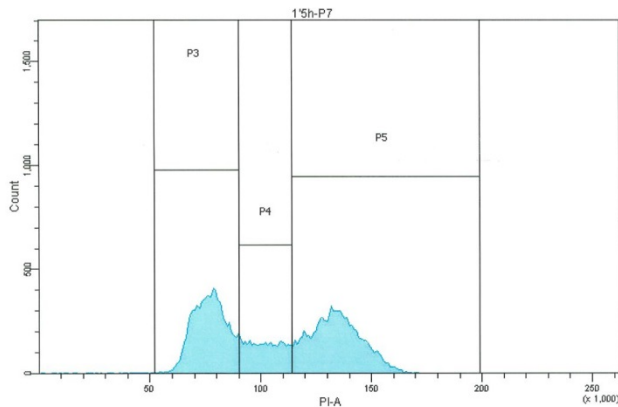


A



Aut^{LO}

Aut^{ME}



Aut^{HI}

B

Abbildung 24: Zellzyklusanalyse der Cyto-ID-sortierten unbehandelten und behandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.

A: Die Zellen wurden unbehandelt bzw. nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 5 μ M SRT1720 nach ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz durchflusszytometrisch sortiert. Die sortierten Fraktionen wurden entweder direkt oder 5 Stunden nach Zellsortierung in Ethanol fixiert. Der Zellzyklus wurde durchflusszytometrisch nach PI-Aufnahme analysiert. Die Sub-G1-Zellen entsprechen dem prozentualen Zelltod. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. B: Gezeigt sind die durchflusszytometrischen Darstellungen der Zellzyklusanalysen von unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt direkt nach Zellsortierung. Dabei entspricht P3 den G1-Zellen, P4 den S-Phase-Zellen, P5 den G2/M-Zellen. Gezeigt ist exemplarisch jeweils eine Aufnahme von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 24 zeigt, dass sich die Zellen der sortierten Fraktionen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen verteilen. Auffällig war, dass sich in Aut^{LO} circa 80 % der Zellen in der G1-Phase befanden und nur 6 % in der G2/M-Phase. Im Gegenzug dazu befanden sich die Zellen von Aut^{HI} nur zu 42 % in der G1-Phase, dafür aber zu ebenfalls 42 % in der G2/M-Phase. Diese Ergebnisse bestätigten sich eindeutig in drei unabhängigen Experimenten und untermauerten die Hypothese, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle befindet, und der dazugehörigen basalen Autophagie-Aktivität gab. Auffällig war, dass das Zellzyklusprofil von Aut^{ME} genau dem von unbehandelten, unsortierten Zellen gleich (Tabelle 16). Die sortierten Zellen wurden über 48 Stunden kultiviert und ihr Zellzyklus in regelmäßigen Abständen analysiert. Es zeigte sich, dass sich die Verteilung der Zellen im Zellzyklus 5 Stunden nach der Zellsortierung bereits veränderte (Abbildung 24A).

		G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
1,5 h nach Zellsortierung unbehandelt	Aut ^{LO}	80 %	14 %	6 %
	Aut ^{ME}	55 %	19 %	26 %
	Aut ^{HI}	41 %	17 %	42 %

unsortiert		G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
unbehandelt		55 %	19 %	24 %

Tabelle 16: Zellzyklusanalysen von Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen und unsortierten MOLM-13-Zellen (1,5 h nach Zellsortierung).

Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der sortierten Zellen mittels PI-Einfärbung ethanolfixierter Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Die Tabelle der Zellzyklusanalyse unsortierter MOLM-13-Zelle enthält aus Übersichtsgründen nicht die Angaben zur SubG1-Fraktion (2 %). Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

5.5.2 Expressionsmuster Zellzyklus-relevanter Gene in den Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

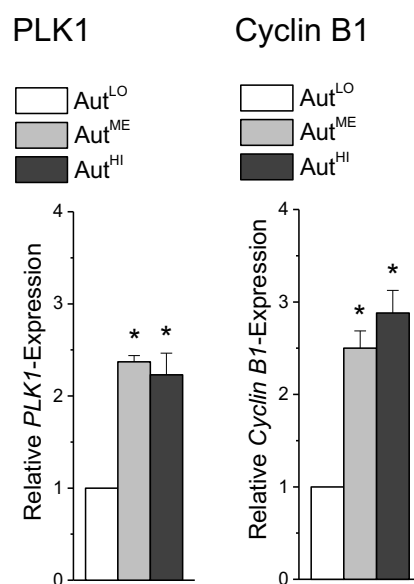


Abbildung 25: Expression der Polo-Like-Kinase-1-mRNA und Cyclin-B1-mRNA in Cyto-ID-sortierten Zellen.

Die RNA der sortierten Zellen wurde direkt nach Zellsortierung isoliert und die Genexpressionsmuster mittels Real Time RT-PCR ermittelt. Die Expressionsraten von Aut^{ME} und Aut^{HI} wurden als Vielfache des Expressionsmusters von Aut^{LO} angegeben. Als Referenzgen diente die Expression des Polypeptids β 2-Mikroglobulin. Für Aut^{HI} vs. Aut^{LO} und Aut^{ME} vs. Aut^{LO} gilt $*p < 0,05$.

Um diesen Zusammenhang von Autophagie und Zellzyklusphase auf dem Niveau der Genexpression zu prüfen, wurden zwei Zellzyklus-abhängig exprimierte Gene mittels Real Time RT-PCR auf ihre Expression in den drei Fraktionen Aut^{LO}, Aut^{ME} und Aut^{HI} untersucht. Die **PLK1** ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in der Mitose-Phase aktiv ist. Durch ihre aktivierende Phosphorylierung der Cyclin-abhängigen Phosphatase CDC25 wird durch diese der CDK1-Cyclin B-Komplex (Mitose-Promoting-Factor) aktiviert und somit die Mitosephase eingeleitet. *PLK1* war sowohl in Aut^{ME} als auch in Aut^{HI} signifikant erhöht exprimiert. Dies passte zu den Ergebnissen der Zellzyklusanalysen nach Zellsortierung, in denen von Aut^{LO} nach

Aut^{HI} der Anteil an Zellen, die sich in der G2/M-Phase befanden, um ein Vielfaches zunahm (Tabelle 16).

Cyclin B1 ist an der Transition der Zelle von der G2-Phase zur M-Phase beteiligt. Es kommt in erhöhten Konzentrationen während der G2-Phase vor, erreicht sein Maximum in der M-Phase und wird dann rasch abgebaut, bevor die Zelle den Zellzyklus vollständig durchlaufen hat. Die sortierten Fraktionen unterschieden sich deutlich in ihrer *Cyclin B1*-Expression. *Cyclin B1* war in Aut^{ME} und Aut^{HI} signifikant erhöht gegenüber Aut^{LO} exprimiert.

Die erhöhte Expression von *PLK1* und *Cyclin B1* in Aut^{HI} und Aut^{ME} unterstreicht die Vermutung des Zusammenhangs der Zellzyklusphase einer Zelle und ihrer Autophagie-Aktivität, spezifisch in der G2/M-Phase.

5.5.3 Nachweis der Expression Zellzyklus-relevanter-Proteine in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

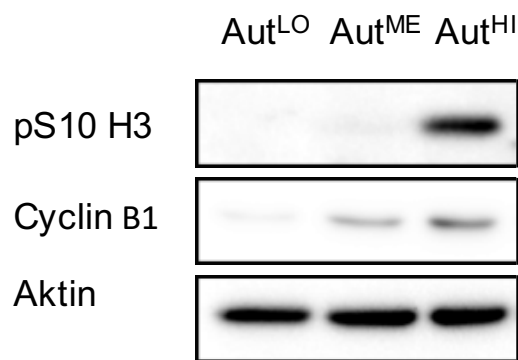


Abbildung 26: Nachweis der Expression Zellzyklus-relevanter Proteine in den Cyto-ID-sortierten Zellen.

Die Lysate der Zellen wurden direkt nach der Zellsortierung hergestellt. Aktin dient als HKP. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Western Blots von Abbildung 19. Gezeigt wird jeweils ein Western Blot stellvertretend für vier unabhängige Western Blots.

Cyclin B1: Im Western Blot wurden die sortierten Fraktionen neben der Expression Autophagie-relevanter Proteine (Abbildung 19) auch auf die Expression zellzyklusspezifischer Proteine untersucht. Gezeigt werden konnte, dass das Protein Cyclin B1, dessen erhöhte Expression auf Transkriptionsebene in Aut^{ME} und Aut^{HI} bereits nachgewiesen wurde (Abbildung 25), auch vermehrt in den Zellen mit mittlerer und am meisten in den Zellen mit hoher Autophagie vorlag (Abbildung 26A). Durch seine überlebensnotwendige Funktion in der G2/M-Phase der Zelle bestätigt dies erneut, dass ein Zusammenhang zwischen hoher Autophagie-Aktivität und G2/M-Phase besteht.

ps10H3: Zudem wurde auch ein Antikörper für an Serin 10 phosphoryliertes Histon 3 eingesetzt, der spezifisch Zellen, die sich in der M-Phase befinden, markiert. Das Nukleosom

besteht aus der DNA, die sich um acht *core* Histonproteine windet. Posttranslationale Modifikationen der *core*-Proteine regulieren vor allem die Zugänglichkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren und beeinflussen somit entscheidend die Genexpression. Die Phosphorylierung des Histons H3 an Serin 10 beispielsweise ist entscheidend für die Kondensation der Chromosomen während der Mitose. In den sortierten Fraktionen ließen sich hier enorme Unterschiede in der zellulären Ausstattung mit phosphoryliertem Histon H3 finden. Je höher die Autophagie-Aktivität, desto mehr Histon H3 lag phosphoryliert an Serin 10 vor.

5.6 Chemosensibilität der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Da eine Vielzahl von Studien nahelegt, dass die Autophagie das Ansprechen von Tumorzellen auf Chemotherapeutika beeinflusst, wurde die Sensibilität der sortierten Zellen auf unterschiedliche Zytostatika vergleichend untersucht. Dabei sollte überprüft werden, ob bereits Unterschiede in der basalen Autophagie-Aktivität die Wirkung von Zytostatika moduliert. Eingesetzt wurden vier unterschiedlich wirkende Zytostatika: Etoposid, Cytarabin, Vincristin und Camptothecin. Der Wirkmechanismus von Etoposid wurde bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 2.2.4).

Cytarabin (Ara-C) ist ein Nukleosidanalogon, bei dem Cytosin an eine Furanose geknüpft ist. Intrazellulär wird Ara-C (Cytosind-Arabinosid) dann zu Ara-CTP (Cytidintriphosphat) umgewandelt und kann als „falsches Nukleosid“ DNA-Polymerasen hemmen und durch den Einbau in DNA-Stränge zu DNA-Fragmentierung und Kettenabbrüchen führen. Letztendlich folgt aufgrund der immensen DNA-Schäden der Zelltod (Grant 1998).

Vincristin ist ein Zytostatikum, das in die Mikrotubuli-Dynamik eingreift. Es fördert die Depolymerisation der Mikrotubuli und wirkt vor allem in der M-Phase durch Destabilisierung der mitotischen Spindel, die für die Chromosomen-Anordnung verantwortlich ist. Durch eine meist verlängerte Periode der Zelle am Mitose-*checkpoint* kommt es zur Aktivierung von Apoptose-Mechanismen und folglich zum Zelltod (Kothari et al. 2016).

Camptothecin ist ein Zytostatikum, das die Dissoziation der DNA-Topoisomerase-I hemmt und damit die eigentlich transient bestehenden Einzelstrangbrüche stabilisiert. Diese werden durch das Aufeinandertreffen der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie zu toxischen DSB umgebaut und leiten darüber Apoptosemechanismen ein (Martinez-Cruzado et al. 2017). Zudem sollte verglichen werden, ob Zellen mit induzierter Autophagie womöglich weniger sensibel auf die Zytostatika reagieren. Dafür wurde ein Teil der Zellen vor der Zellsortierung

für 24 Stunden mit 5 μM SRT1720 behandelt. Die einzusetzenden Konzentrationen wurden durch eigene Vorversuche ermittelt und unterschieden sich je nach Inkubationszeit.

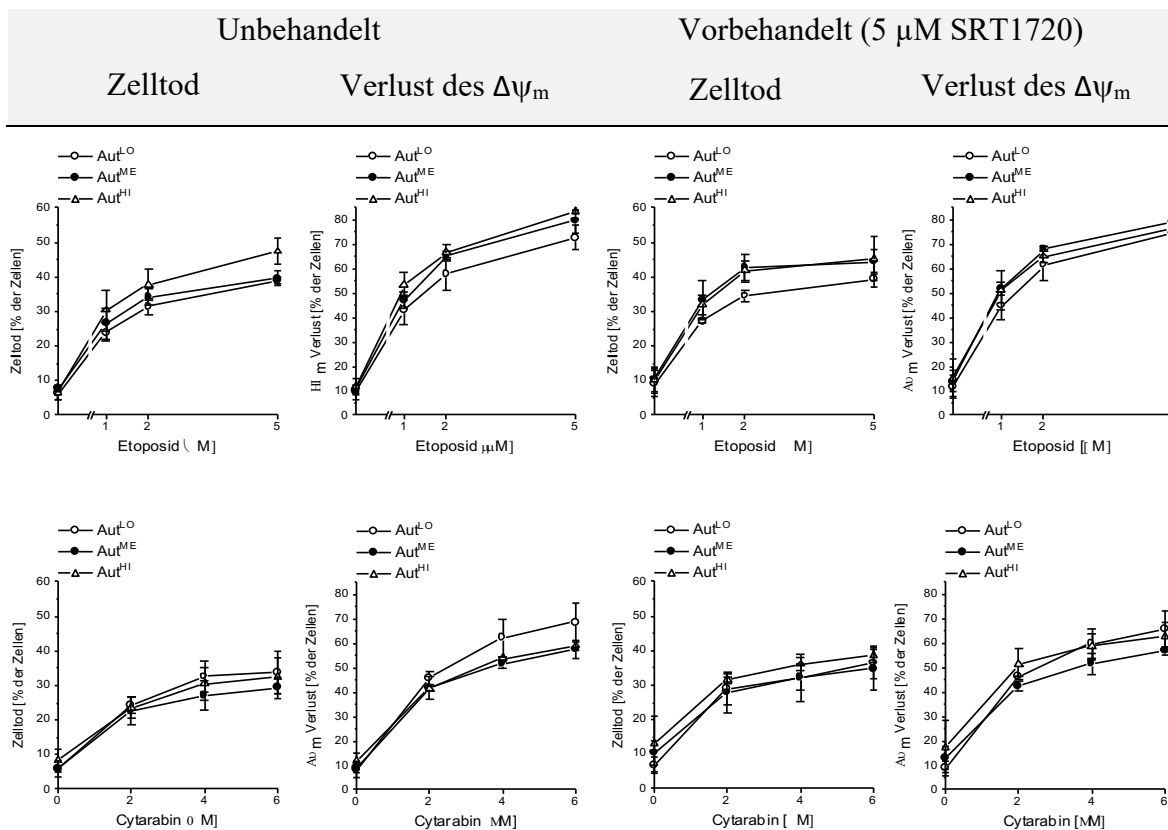


Abbildung 27: Wirkung von Etoposid und Cytarabin auf den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und den Zelltod in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.

Die Zellen wurden mit Etoposid und Cytarabin für 24 h behandelt und der Zelltod anschließend durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung und der Verlust des MMPS mittels DiOC₆(3)-Färbung analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 27 zeigt, gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Sensibilität der verschiedenen Fraktionen gegenüber den Zytostatika. Auch zwischen den vorbehandelten und den unbehandelten Zellen zeigten sich keine Unterschiede im Zelltod oder dem Verlust des $\Delta\psi_m$. Da die Vermutung nahelag, dass eine Inkubationszeit von 24 Stunden zu kurz gewesen sein könnte, um signifikante Unterschiede im Zelltod zu erfassen, wurde die Inkubationszeit auf 48 Stunden verlängert. Grund der Annahme war, dass der Verlust des $\Delta\psi_m$, der als Zeichen einer beginnenden Apoptose gilt, höhere Werte aufwies als die Werte für den Zelltod. Diese Unterschiede konnten in allgemeinere Aussage über den möglichen Einfluss der basalen Autophagie auf die Chemosensibilität treffen zu können, wurden außer der Verlängerung der Inkubationszeit zwei weitere Zytostatika eingesetzt. Auch bei einer Behandlung der sortierten Zellen mit Camptothecin und Vincristin über 48 Stunden zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Fraktionen und auch nicht zwischen unbehandelten und

vorbehandelten Zellen. Mit den vier verschiedenen Zytostatika wurden verschiedene zytotoxisch wirkende Substanzen eingesetzt, worauf jedoch alle Zellfraktionen ähnlich reagierten.

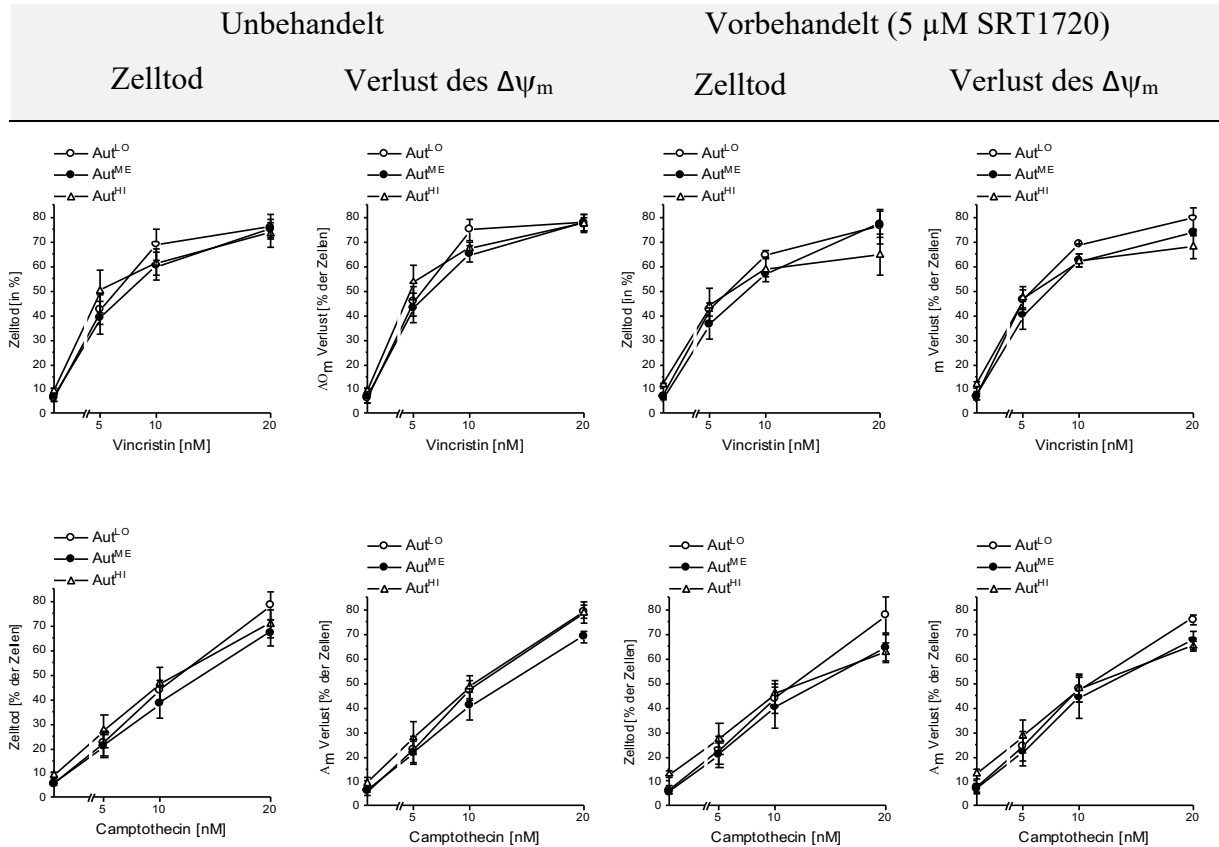


Abbildung 28: Wirkung von Vincristin und Camptothecin auf den Verlust des $\Delta\psi_m$ und den Zelltod in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.

Die Zellen wurden mit Vincristin und Camptothecin für 48 h behandelt und der Zelltod anschließend durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung und der Verlust des $\Delta\psi_m$ mittels DiOC₆(3)-Färbung analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

6 Diskussion

In den letzten Jahren rückte die Autophagie, bekannt geworden als zytoprotektiver Recycling-Mechanismus, immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung der Zellbiologie. Dabei wurde ersichtlich, dass die Dysfunktion der Autophagie unter anderem immensen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Krebserkrankungen hat, weshalb insbesondere in der Tumorbilogie eine massive Zunahme an Forschungsarbeiten diesbezüglich zu vermerken ist (Mowers et al. 2016, Dikic und Elazar 2018b, Wilde et al. 2018). Im Rahmen meiner Arbeit sollte in diesem Zusammenhang erstmalig die konstitutive Autophagie-Aktivität anhand einer AML-Zelllinie, MOLM-13, analysiert und unter Betrachtung zellbiologischer Aspekte genauer charakterisiert werden. Zunächst wurde die vor Kurzem in der Arbeitsgruppe entwickelte Methode der Zellsortierung mittels des Autophagie-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID optimiert, um im Anschluss den Zellzyklus, den Energiemetabolismus mittels Seahorse XF96 und die Chemosensibilität der nach ihrer konstitutiven Autophagie-Aktivität in Aut^{LO}, Aut^{ME} und Aut^{HI} sortierten MOLM-13-Zellen zu analysieren. Sowohl auf Transkriptionsebene (*ULK1*) als auch auf Proteinebene (LC3B-II), konnte die Methode der Autophagie-spezifischen Zellsortierung mittels Real-Time RT-PCR und Western Blot validiert werden. Es konnten signifikante Unterschiede in der konstitutiven Autophagie-Aktivität innerhalb einer unbehandelten Zellpopulation nachgewiesen werden. Die MOLM-13-Zellen wiesen außerdem mit zunehmender konstitutiver Autophagie-Aktivität eine signifikante Zunahme des mitochondrialen Metabolismus und der Glykolyse auf. Im Mittelpunkt der Dissertation stand die Erforschung des Zusammenhangs der konstitutiven Autophagie und des Zellzyklus. In Versuchen, unabhängig von der Zellsortierung, konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen, die sich in der G2/M-Phase befanden, eine höhere Cyto-ID-Fluoreszenz zeigten als die in der G1-Phase und sich vice versa in einer Population mit hoher Cyto-ID-Fluoreszenz anteilig weitaus mehr Zellen in der G2/M-Phase befanden. Nach Zellsortierung konnte dies sowohl auf Transkriptionsebene (*Cyclin B1*, *PLK1*) als auch auf Proteinebene (Cyclin B1 und pS10-H3) bestätigt werden, wobei die Expressionsmuster von Aut^{LO} nach Aut^{HI} signifikant zunahmen und eine differentielle Regulation der konstitutiven Autophagie im Zellzyklus vermuten lassen. Zuletzt wurde geprüft, ob Unterschiede in der konstitutiven Autophagie-Aktivität einen Einfluss auf die Wirkung von Zytostatika in MOLM-13-Zellen haben. Dabei zeigte sich keinerlei Modulation der Reaktion auf die Zytostatika, auch nicht, nachdem die Autophagie vor Behandlung durch SRT1720 stark induziert wurde. Die Erkenntnisse dieser Arbeit, die sich vor allem mit der Grundlagenforschung der konstitutiven Autophagie beschäftigte, berührt damit

ein bislang wenig erforschtes Gebiet und leistet ihren Beitrag zum rapid wachsenden Forschungsfeld der Autophagie.

6.1 Einfluss der Autophagie-Modulatoren 3-Methyladenin und Etoposid auf den Zellzyklus und die Autophagie in MOLM-13-Zellen

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Etoposid die Autophagie in MOLM-13-Zellen aktivierte. Den Nachweis des gesteigerten *autophagic flux* lieferte die Inkubation von Etoposid-behandelten Zellen (exemplarisch mit 0,1 μM) und einer Kontrollgruppe mit zunehmender Inkubationszeit von CQ. Dabei nahmen die Cyto-ID-Fluoreszenz und damit der *autophagic flux* der Etoposid-behandelten Zellen mit steigender Inkubationszeit von CQ, im Gegensatz zu der unstimulierten Kontrollgruppe zu. Gao et al. (2011) zeigten, dass subletale Konzentrationen (5 μM) von Etoposid und Camptothecin (0,5 μM) die Autophagie ebenfalls in humanen Osteosarcoma U2OS-Zellen aktivierten. Auch Kaizuka et al. (2016) und Shimizu et al. (2004) zeigten eine Autophagie-Aktivierung durch Etoposid. Die Autophagie-Aktivierung durch Camptothecin war Resultat der durch DNA-Schädigung induzierten p53-vermittelten Antwort, die die direkte Transkription von ULK1 und ULK2 beinhaltet. Auch die Behandlung mit Etoposid führte zu einer gesteigerten Expression von ULK1 im Western Blot (Gao et al. 2011). Mit Etoposid behandelte MOLM-13-Zellen zeigten neben einer Autophagie-Aktivierung auch einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. Die Arretierung im Zellzyklus ist das Resultat der *DDR*, die als Antwort auf den Etoposid-induzierten Einbau von DSB generiert wird (Montecucco et al. 2015). In MOLM-13-Zellen ging der Etoposid-induzierte G2/M-Arrest der Autophagie-Aktivierung voraus, was Ausdruck einer Autophagie-Aktivierung als Antwort auf DNA-Schädigung ist und damit die Beobachtungen von Gao et al. (2011) stützt. Bei einer Etoposid-Konzentration von 0,1 μM zeigte sich reproduzierbar ein G1-Phase-Zellzyklusarrest. Die Ursache dafür konnte nicht eindeutig geklärt werden, stellt aber eine interessante Fragestellung dar. Eine Überlegung war, dass niedrige Konzentrationen von Etoposid, womöglich p53-vermittelt, zum G1-Arrest führen (MOLM-13: p53-Wildtyp). Lee et al. (2012) zeigten, dass p53 Atg7-abhängig über die Expression von p21 zum Zellzyklusarrest führte. Dabei wird die Zelle via p53 - p21 hauptsächlich in der G1-Phase arretiert (Abbas und Dutta 2009). So blieb dieser G1-Peak in Jurkat-Zellen, einer p53-mutierten ALL-Zelllinie, bei 0,1 μM reproduzierbar aus (persönliche Mitteilung: Dr. Jürgen Sonnemann).

Eine zusätzliche Inkubation der Etoposid-behandelten MOLM-13-Zellen mit 3-MA führte neben der Inhibition der Autophagie zu einem Ausbleiben des G2/M-Arrests. 3-MA, ein PI3-Kinasen-Inhibitor, entfacht seine Autophagie-inhibierende Wirkung über die Hemmung der Klasse III PI3-K, die normalerweise die Initiation der Autophagie und die Phagophorenbildung

vermittelt. Die Autophagie-inhibierende Wirkung zeigte sich bereits in der Nullprobe und auch bei Autophagie-induzierenden Konzentrationen von Etoposid. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Gao et al. (2011), die in humanen Osteosarcoma U2OS-Zellen zeigten, dass durch 3-MA die Autophagie-aktivierende Wirkung von Etoposid stark gedämpft wurde. Der Einfluss von 3-MA auf den Zellzyklus äußerte sich bereits im Vergleich zu unbehandelten MOLM-13-Zellen in einer Verschiebung der Zellen in Richtung der G1-Phase (+20 % gegenüber der Nullprobe), kombiniert mit einer Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase (-10 %) und der G2/M-Phase (-12 %). Der Zelltod blieb unverändert (nicht gesondert dargestellt), auch beim Ausbleiben des G2/M-Arrests durch 3-MA. Vorversuche zeigten, dass 2 mM 3-MA über 48 Stunden nur gering toxisch auf MOLM-13-Zellen wirkten und folglich der Zelltod vermutlich Etoposid-vermittelt stattfand. Montecucco et al. (2015) beschrieben, dass Etoposid auch in nicht-proliferierenden Zellen zytotoxisch wirkte, was unsere Beobachtungen bestätigt. 3-MA verhinderte sowohl das Auftreten des Etoposid-induzierten G1-Peaks als auch die Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Yu et al. (2018), die durch 3-MA ebenfalls ein Ausbleiben eines Wirkstoff-induzierten G1-Arrests in verschiedenen Kolonkrebs-Zelllinien beschrieben, Filippi-Chiela et al. (2011), die durch die Zugabe von 3-MA das Ausbleiben eines Wirkstoff-induzierten G2/M-Arrests in humanen Glioblastom-Zelllinien beschrieben und Pathania et al. (2016), die durch Bafilomycin und CQ, zwei Autophagie-Inhibitoren, das Ausbleiben eines Wirkstoff-induzierten G2/M-Arrests in PANC-1-Zellen beobachteten. Diesbezüglich wurden maßgeblich zwei Überlegungen angestellt: Einerseits könnte 3-MA einen von der Autophagie unabhängigen Einfluss auf den Zellzyklus haben, andererseits könnte diese Beobachtung darauf hinweisen, dass die konstitutive Autophagie-Aktivität, die durch 3-MA in ihren ersten Schritten gehemmt wurde, essentiell für das Fortschreiten der AML-Zelle im Zellzyklus bzw. für den Eintritt des Zellzyklusarrests war.

Zunehmende Diskussionen lassen vermuten, dass 3-MA auch Autophagie-unabhängig inhibierend auf verschiedene zelluläre Prozesse wie den Glykogenmetabolismus, die Endozytose oder auch die lysosomale Ansäuerung wirken könnte (Mizushima et al. 2010), wobei jedoch bislang keine Autophagie-unabhängige Wirkung von 3-MA auf den Zellzyklus beobachtet wurde. Was Liu et al. (2014) aber zeigen konnten, war, dass in MDA-MB-231 humanen Brustkrebs-Zellen die Wirkung einer 3-MA-Behandlung dem Knockout von Atg7, einem an der Phagophorenbildung und -expansion beteiligten Protein, ähnelte und in einem G0/1-Arrest der Zelle und einer Abnahme an Zellen in der S-Phase resultierte. Sie zeigten somit, dass das Zellzyklusprofil einer Autophagie-defizienten Zelle dem einer 3-MA-

behandelten Zelle annähernd gleich. Dies zeigten auch Yu et al. (2018), die das Ausbleiben eines Wirkstoff-induzierten G1-Arrests sowohl durch den Einsatz von 3-MA als auch Inhibition der Autophagie auf Transkriptionsebene (LC3B-siRNA) beobachteten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zellzyklus-beeinflussende Wirkung von 3-MA vor allem über die Inhibition der Autophagie vermittelt werden könnte. Daraufhin stellte sich die Frage, ob womöglich das Fehlen des intrazellulären Recycling-Mechanismus per se ursächlich dafür ist, oder ob eine Hemmung der Initiation der Autophagie zu einer fehlenden Aktivierung von *downstream*-Atgs führt, die wiederum Zellzyklus-beeinflussende Wirkung besitzen. Betrachtet man die Wirkung von CQ, das als bekannter Autophagie-Inhibitor die Fusion von Autophagosom und Lysosom und damit den letzten Schritt des Autophagie-Prozesses, verhindert auf den Zellzyklus, so erscheint erstere Erklärung weniger wahrscheinlich. Es wird vermutet, dass auch nach Zugabe von CQ die ersten Schritte des Autophagie-Prozesses ungehindert stattfinden könnten (Mizushima et al. 2010). Auf den Zellzyklus zeigt CQ keine einheitliche, je nach Art des Tumors variierende, Wirkung und damit auch keinen reproduzierbaren G0/G1-Zellzyklusarrest (Liu et al. 2018). Die Gemeinsamkeit der beiden Autophagie-Modulatoren ist also, dass der *autophagic flux* gestört ist. Der Unterschied jedoch ist, dass 3-MA den Prozess bereits in der Initiation hemmt und CQ ihn erst zu einem späteren Zeitpunkt. Dies bestärkt die Annahme, dass die Wirkung von 3-MA auf den Zellzyklus durch die fehlende Aktivierung verschiedener *downstream*-Atgs zurückzuführen sein könnte. Inwiefern also der Zeitpunkt der Inhibition im Autophagie-Prozess auf den Zellzyklus wirkt, sollte in zukünftigen Forschungsarbeiten untersucht und verstanden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von MOLM-13-Zellen gezeigt werden, dass die Autophagie-induzierende Wirkung von Etoposid erst nach dem Etoposid-induzierten Zellzyklusarrest der Zellen in der G2/M-Phase einsetzte. Dieser G2/M-Arrest blieb jedoch aus, sobald die Autophagie bereits in ihrer Initiation mittels 3-MA inhibiert wurde. Zusätzlich arretierten die Zellen durch die Autophagie-Inhibition vermehrt in der G1-Phase. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen der intakten Autophagie-Aktivität einer Zelle und deren Fortschreiten im Zellzyklus und bildeten die Grundlage für die vorliegende Forschungsarbeit, die unter anderem diesen Zusammenhang anhand von MOLM-13-Zellen genauer beleuchtet.

6.2 Interaktion zwischen konstitutiver Autophagie und Zellzyklus in MOLM-13-Zellen

Die ersten Experimente zur Erforschung des Zusammenhangs von Zellzyklus und Autophagie lieferten zwei Ergebnisse in MOLM-13-Zellen: Die Inhibition der Autophagie durch 3-MA

verhindert das Eintreten des Etoposid-induzierten G2/M-Arrests und Zellen, die sich in der G2/M- und S-Phase befanden, zeigten eine höhere konstitutive Autophagie-Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die sich in der G1-Phase befanden (+66,67 % Cyto-ID-Fluoreszenz). Dieses Phänomen nahm mit steigenden Etoposid-Konzentrationen zu. Diese Ergebnisse erhielten wir durch den Einsatz der simultanen durchflusszytometrischen Messung der Autophagie mittels Cyto-ID und des Zellzyklus mittels DRAQ5™, eines lipophilen Fluoreszenzfarbstoffes, der für Zellzyklusanalysen an vitalen Zellen eingesetzt wird und stöchiometrisch in die DNA interkaliert. Im Umkehrschluss konnte in einem unabhängigen Experiment bewiesen werden, dass die Zellen, die hohe Cyto-ID-Fluoreszenzwerte zeigten, sich vermehrt in der G2/M-Phase befanden. Dafür wurden die Zellen mittels manuellem *gating* in fünf getrennte Cyto-ID-Populationen mit aufsteigender Fluoreszenz eingeteilt (siehe Abbildung 10). Bereits Zellen, die keinerlei Behandlung erfuhren, unterschieden sich maßgeblich in ihrem Zellzyklusprofil abhängig von der Cyto-ID-Fluoreszenz. Dabei befanden sich die mit niedriger Cyto-ID-Fluoreszenz beispielsweise zu 11 % in der G2/M-Phase, die mit hoher Cyto-ID-Fluoreszenz, also hoher Autophagie-Aktivität, hingegen zu 42 % in der G2/M-Phase.

Die nachfolgend beschriebene Methode der Zellsortierung sollte vor allem die spezifische Erforschung dieses Zusammenhangs sowie eine Weiterkultivierung und Charakterisierung der Autophagie-sortierten Zellfraktionen ermöglichen. Zuerst erfolgte die Optimierung der vor kurzem in der Arbeitsgruppe etablierten Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID nach der konstitutiven Autophagie-Aktivität der Zellen. Gump et al. (2014) sortierte erstmalig BJAB Lymphoma- und Jurkat-Zellen nach ihrer konstitutiven Autophagie in *low flux* und *high flux*. Methodisch wurde dabei mCherry-EGFP-LC3 als Reporter für den *autophagic flux* eingesetzt, wofür beide Zelllinien transfiziert werden mussten. Via Immunoblots von LC3 und p62 und Fluoreszenzmikroskopie wiesen sie Unterschiede des konstitutiven *autophagic flux* in den sortierten Fraktionen nach. Da anschließend an die Zellsortierung der MOLM-13-Zellen unter anderem der Zellzyklus und die Chemosensibilität untersucht werden sollten, wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht, die Autophagie nachzuweisen, ohne die Zellen dafür genetisch manipulieren zu müssen. Guo et al. (2015) untersuchten in großem Umfang den Einsatz des Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID und bewiesen, dass dieser neben den Standardmethoden wie Elektronenmikroskopie oder der Transfektion mit GFP-LC3B eine schnelle und gute Alternative für die Detektion von Autophagie-Kompartimenten und die Schätzung des *autophagic flux* darstellt (Chan et al. 2012). Zunächst wurde im Rahmen meiner Arbeit der Farbstoff Cyto-ID auf seine biochemischen Eigenschaften und seine Zytotoxizität in

MOLM-13-Zellen untersucht und nachgewiesen, dass sich die sortierten Fraktionen in ihrer konstitutiven Autophagie-Aktivität nachweislich unterschieden.

Wie in 5.5.1 beschrieben, konnte bereits durch die Inkubation von Etoposid-behandelten Zellen mit CQ gezeigt werden, dass sich der Cyto-ID-Fluoreszenzfarbstoff eignet, um den *autophagic flux* zu messen. Dabei nahm mit zunehmender Hemmung (zunehmende Inkubationszeit von CQ) des Autophagosomen-Abbaus die Cyto-ID-Fluoreszenz parallel zu.

Eine für die Weiterkultivierung einschränkende Zytotoxizität von Cyto-ID wurde sowohl in Vorversuchen als auch in an die Zellsortierung angeschlossenen Versuchen ausgeschlossen (Zelltodanalysen (subG1-Fraktion), Chemosensibilität ($t=0$)). Nicht zu vernachlässigen war hingegen die Temperatursensibilität von Cyto-ID. Auf Eis nahm die Cyto-ID-Fluoreszenz über 90 Minuten nicht ab, wohingegen diese bei 37 °C bereits nach 30 Minuten um mehr als die Hälfte abnahm. Letzteres war von Vorteil für an die Zellsortierung angeschlossene durchflusszytometrische Folgeversuche, da eine Interferenz der vorangegangenen Cyto-ID-Einfärbung nach Inkubation der sortierten Zellen im Brutschrank (bei 37 °C) nicht zu erwarten war. Die Arbeitstemperatur des FACS-Cellsorters wurde auf 4 °C (anstatt vorhergehend Raumtemperatur) eingestellt und Cyto-ID-gefärbte Proben stets auf Eis bearbeitet. Durch weitere Optimierungsschritte wurde die Dauer der Zellsortierung auf 35 Minuten verkürzt. Dennoch befanden sich die sortierten Zellen über diesen Zeitraum in einer Mischung von Medium und Spülflüssigkeit. Ein Einfluss dieses Zellstress auf die Autophagie-Aktivität der sortierten Zellen wird als gering erachtet, da gezeigt werden konnte, dass die Autophagie in Ratten-Hepatozyten bei < 20 °C zum Erliegen kam (Gordon et al. 1987). Zudem konnte arbeitsgruppenintern nachgewiesen werden, dass die Cyto-ID Fluoreszenz der Zellen direkt nach Zellsortierung der von nicht-sortierten Zellen gleich, somit also keine Veränderung der Autophagie vorlag (persönliche Mitteilung: Dr. Jürgen Sonnemann). Auch wenn ein geringer methodischer Einfluss nicht abschließend auszuschließen war, konnte bestätigt werden, dass die Zellfraktionen: Aut^{LO}, Aut^{ME}, Aut^{HI} stets miteinander verglichen wurden und sich somit der Einfluss nivellierte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID nachweislich vernachlässigbar gering toxisch auf MOLM-13-Zellen wirkte und sich zum Nachweis des *autophagic flux*, ohne eine dafür notwendige genetische Manipulation der MOLM-13-Zellen vornehmen zu müssen, eignete. Durch die Optimierung, insbesondere die Temperaturumstellung bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung, konnte eine Weiterkultivierung und Charakterisierung der MOLM-13-Zellen in Anschlussversuchen ermöglicht werden.

6.3 Unterschiede in der konstitutiven Autophagie sind über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil – auch bei Vorbehandlung mit SRT1720

Erster Versuch im Anschluss an die Zellsortierung war die Untersuchung der Stabilität der Autophagie-Aktivität der sortierten MOLM-13-Zellen. Um dabei nicht nur die konstitutive, sondern auch stimulierte Autophagie-Aktivität zu prüfen, wurde eine Autophagie-induzierende Substanz gesucht, die die Autophagie in MOLM-13-Zellen ausreichend steigerte, wenig toxisch war und den Zellzyklus nicht maßgeblich beeinflusste. Nachdem einige Substanzen, wie beispielsweise AICAR, das über eine Aktivierung der AMPK einerseits aktivierend, andererseits inhibierend auf die Autophagie wirkt (Viana et al. 2008), analysiert wurden, konnte SRT1720 als geeigneter und bereits bekannter Autophagie-Aktivator (Gu et al. 2016, Luo et al. 2019, Lahusen und Deng 2015) ausfindig gemacht werden. Dabei steigerten 5 μ M SRT1720 in MOLM-13-Zellen die Autophagie um mehr als das Doppelte, der Zelltod nahm nur geringfügig zu und der Zellzyklus blieb unbeeinflusst.

Die Autophagie-Kinetik der sortierten Fraktionen zeigte, dass diese sich in ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz auch nach 23 Stunden noch unterschieden. Direkt nach der Zellsortierung ($t = 2$ h) zeigten sowohl die unbehandelten als auch die mit SRT1720 vorbehandelten Zellen deutliche Unterschiede in ihren Cyto-ID-Fluoreszenz-Werten: $\text{Aut}^{\text{LO}} < \text{Aut}^{\text{ME}} < \text{Aut}^{\text{HI}}$. Die Vorbehandlung mit SRT1720 diente der Autophagie-Aktivierung, die für Folgeversuche von Bedeutung war. Die anschließende Cyto-ID-Messung zeigte eine erhebliche Steigerung der Cyto-ID-Fluoreszenzwerte durch die Vorbehandlung der Zellen mit SRT1720 (siehe Abbildung 15). Die nachfolgend beschriebenen Veränderungen über die Zeit konnten in vorbehandelten Zellen gleichermaßen beobachtet werden. Bereits sechs Stunden nach der Zellsortierung nahmen die Cyto-ID-Fluoreszenzwerte von Aut^{HI} ab und die von Aut^{LO} zu und näherten sich somit den Fluoreszenzwerten von Aut^{ME} an. Im Weiteren blieben die Unterschiede der Cyto-ID-Fluoreszenzwerte über einen Zeitraum von 23 Stunden stabil, wobei die Differenz zwischen Aut^{HI} und Aut^{ME} weitaus größer war als die zwischen Aut^{LO} und Aut^{ME} , was sich auch bereits direkt nach Zellsortierung zeigte. Insgesamt zeigte sich eine Tendenz zur Annäherung der Cyto-ID-Fluoreszenzwerte auf Aut^{ME} . Gump et al. (2014) zeigten, dass BJAB Lymphoma-Zellen, die nach mCherry-EGFP-LC3 sortiert wurden, sich nach 24 Stunden aussortierten, die Werte der unsortierten Zellen annahmen, und schlossen daraus, dass die anfänglichen Unterschiede in der konstitutiven Autophagie transient sind und eine genetische Heterogenität als Ursache demnach unwahrscheinlich ist. Da sich die sortierten MOLM-13-Zellen nach 24 Stunden nicht aussortierten, die Methode zur Detektion der konstitutiven Autophagie und die Zelllinie eine andere war, lag es nahe, die sortierten Fraktionen auf die Expression Autophagie-relevanter

Gene zu untersuchen. Ebenfalls konnte anhand der Vorversuche bereits ausgeschlossen werden, dass es sich bei den über 24 Stunden erhöhten Cyto-ID-Werten um einen methodischen Fehler handeln könnte, da Cyto-ID-gefärbte und bei 37 °C inkubierte Zellen bereits nach 90 Minuten annähernd die Fluoreszenzwerte ungefärbter Zellen annahmen und die sortierten Zellen während der Kinetik stets im Brutschrank aufbewahrt wurden.

6.3.1 Unterschiede der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf Genexpressionsebene: Erhöhte Expression von ULK1-mRNA in Aut^{HI}

Die Genexpression der die Initiation der Autophagie kontrollierenden Kinase ULK1 war in unbehandelten Zellen in Aut^{HI} gegenüber Aut^{LO} signifikant erhöht. Auch 24 Stunden nach Zellsortierung konnte immer noch eine signifikant erhöhte Expression der ULK1-mRNA in Aut^{HI} nachgewiesen werden. Diese Beobachtung liefert folgende Erkenntnis: Innerhalb einer unbehandelten Zellpopulation gibt es, auch unter optimalen Wachstumsbedingungen, erhebliche Differenzen in der konstitutiven Autophagie-Aktivität, die sich in MOLM-13-Zellen sogar auf Genexpressions-Ebene widerspiegeln. Dabei wird am ehesten von einer stochastischen Fluktuation der Expression von *ULK1* innerhalb einer Zellpopulation ausgegangen. Dafür spricht, dass sowohl die Expression der ULK1-mRNA mit zunehmender Inkubationszeit nach Zellsortierung wieder abnahm, als auch, dass die Cyto-ID-Fluoreszenzwerte mit zunehmender Inkubationszeit (siehe Abbildung 17) parallel dazu abnahmen.

6.3.2 Expression von LC3B-II bestätigt die erfolgreiche Autophagie-spezifische Zellsortierung der MOLM-13-Zellen

Bei LC3B handelt es sich um ein Strukturprotein der LC3/Atg8-Familie, das vor allem streng über Atg4 reguliert an der Phagophoren-Expansion beteiligt ist und im Sinne der selektiven Autophagie p62-markierte Moleküle in das Phagophor einschließt (Dikic und Elazar 2018b). Dabei liegt LC3B-I löslich im Zytosol vor und wird durch Atg3 zu membrangebundenem, in das Phagophor eingebautem, LC3B-II. Lee und Lee (2016) beschreiben, dass LC3-Proteine auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert werden können. Dabei spielen vor allem posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierung eine besondere Rolle. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass sich die sortierten Fraktionen auch auf Proteinexpressionsebene unterscheiden. Dies geschah über den Nachweis der Zunahme der Expression von LC3B-II von Aut^{LO} nach Aut^{HI}. Das Immunoblotting von LC3B und p62 ist eine gängige Methode, um eine Autophagie-Aktivierung oder -Inhibition nachzuweisen. Für die Interpretation von LC3B-Western Blots

muss Einiges beachtet werden, das im Folgenden diskutiert wird (Mizushima und Yoshimori 2007). Zum einen sollten die LC3B-II-Level verschiedener Proben miteinander verglichen werden und nicht singular betrachtet werden – bei den sortierten MOLM-13-Zellen war eindeutig zu erkennen, dass die Menge an LC3B-II (im Vergleich zu Aktin als HKP) von Aut^{LO} nach Aut^{HI} stetig zunahm. Dies bestätigte sich ebenfalls in der Fluoreszenzmikroskopie, in der LC3B-Puncta von Aut^{LO} nach Aut^{HI} augenscheinlich zunahmen. Dabei ist die Menge an LC3B-II wiederum proportional zu der intrazellulären Menge an Autophagosomen. Zum anderen müssen zur Beurteilung des *autophagic flux* lysosomale Inhibitoren, die den Autophagosomen-Abbau hemmen, eingesetzt werden. Bei einer stattfindenden Aktivierung des *autophagic flux* käme es demzufolge dann zu einer Zunahme der LC3B-II Menge unter Behandlung mit diesem Inhibitor (Mizushima und Yoshimori 2007). Dafür wurden die sortierten Zellen vor Anfertigen der Lysate zusätzlich mit CQ inkubiert. In allen drei Fraktionen zeigte sich eine Zunahme der Intensität der LC3B-II-Bande. Dies war zu erwarten, da es sich um unbehandelte Zellen, die eine intakte Autophagie-Maschinerie besitzen, handelt, die bei Hemmung des Autophagosomen-Abbaus trotzdem weiterhin Autophagosomen produzieren können. Dabei war die Steigerung der LC3B-II Menge nach Zugabe von CQ interfraktionell, also beispielsweise von Aut^{LO} nach Aut^{LO}+CQ gegenüber Aut^{HI} nach Aut^{HI}+CQ, etc. ähnlich. Dies spricht dafür, dass die sortierten Zellen sich nur gering in ihrem *autophagic flux* unterschieden, oder dass diese geringen Unterschiede schwer im Western Blot zu detektieren waren. Die sortierten Zellen unterschieden sich nicht in ihrer zellulären Menge von p62, was sich mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie deckt. Die Fraktionen, die mit CQ inkubiert wurden, zeigten eine Tendenz zu gesteigerten p62-Level. Dies war zu vermuten und ist Ausdruck des gehemmten Autophagosomen-Abbaus und dem damit verbundenen gehemmten Abbau von p62. Dass zwischen den unbehandelten Fraktionen keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von p62 zu vermerken waren, kann wie Mizushima und Yoshimori (2007) beschrieben, daran liegen, dass sich p62-Level intrazellulär auch unabhängig von der Autophagie-Aktivität verändern können und wie Klionsky et al. (2016) beschrieben, die Unterschiede von p62-Level zelllinienabhängig nicht oder weniger stark ausgeprägt vorliegen können, außer es handelt sich um eine starke Aktivierung der Autophagie, was hier aber nicht der Fall ist. Da die Zellen nach dem Level ihrer konstitutiven Autophagie sortiert wurden und es keinerlei Autophagie-Aktivierung oder -Inhibierung gab, wurde auch nicht von extrem großen Unterschieden im *autophagic flux* ausgegangen. Ebenfalls konnte der Western Blot die Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID verifizieren. Es handelte sich nachweislich nicht

nur auf Genexpressions-Ebene, sondern auch auf Proteinebene um drei unbehandelte Zellfraktionen, die sich in ihrer konstitutiven Autophagie unterschieden.

6.4 Cyto-ID-sortierte MOLM-13-Zellen unterscheiden sich in ihrem Metabolismus – Zusammenhang der konstitutiven Autophagie und des Metabolismus

Bisherige Erkenntnisse des Autophagie-Mechanismus in Tumorzellen sind Resultat von vor allem durch Stressoren wie Nahrungsmangel induzierter Autophagie. Da in diesem Fall erstmalig neben Gump et al. (2014) Zellen, in unserem Fall MOLM-13-Zellen, nach ihrer konstitutiven Autophagie sortiert wurden, war es von besonderer Bedeutung, diese Zellen noch genauer zu charakterisieren. Dass die Autophagie-Regulation generell vor allem mit dem Nährstoffangebot und dem Energiehaushalt der Zelle zusammenhängt ist allseits bekannt. Dabei wirkt mTOR, das bei Nahrungsüberangebot aktiviert vorliegt, inhibierend auf die Autophagie, während die AMPK, die als Sensor des intrazellulären Energie-Status bekannt ist, aktivierend auf die Autophagie einwirkt (Kim et al. 2011). Dabei wirkt die Autophagie im Sinne eines Nährstoffmangels protektiv und versucht das Überleben der Zelle zu sichern. Der extrem hohe Energiebedarf von Tumorzellen ist von ihrer Autophagie-Aktivität abhängig und wäre ohne diese nicht zu decken (Thomas et al. 2018). Kimmelman und White (2017) fassten zusammen, dass in vielerlei Tumorarten durch pharmakologische (CQ) oder genetische (RNAi) Inhibition der Autophagie der mitochondriale Metabolismus stark gestört wurde. Wie der zelluläre Metabolismus mit der konstitutiven Autophagie-Aktivität einer Zelle in Zusammenhang steht, wurde bislang noch nicht beschrieben. Dafür wurden in dieser Arbeit MOLM-13-Zellen, die wie oben beschrieben nach ihrer konstitutiven Autophagie-Aktivität sortiert worden waren, mittels des Seahorse XF96-Analysers untersucht. Diese Methode erlaubt eine Aussage sowohl über den mitochondrialen Metabolismus (OCR) als auch die glykolytische Aktivität (ECAR) der sortierten Zellen zu treffen. Aut^{HI} zeigte die höchsten Werte der basalen OCR und der basalen ECAR, gefolgt von Aut^{ME} und zuletzt Aut^{LO}. Das heißt, dass die Zellen mit höherer konstitutiver Autophagie einen aktiveren Metabolismus aufwiesen, wobei sowohl die Atmungskette als auch die Glykolyse stärker aktiv waren. Neben basal erhöhter OXPHOS und Glykolyse zeigte sich ebenfalls mit zunehmender konstitutiver Autophagie eine Steigerung der ATP-Produktion, wobei Aut^{HI} die höchsten Werte aufwies. Auch die nicht-mitochondriale Atmung der Zellen zeigte eine Tendenz in Richtung der höchsten Werte in Aut^{HI}. Auffällig war ebenfalls, dass die MOLM-13-Zellen ein sehr glykolytisches Energieprofil zeigten, was charakteristisch für Tumorzellen und auch als *Warburg effect* bekannt ist (Bao et al. 2013,

Vander Heiden und DeBerardinis 2017). Vor allem nach Entkopplung der OXPHOS steigerten alle sortierten Fraktionen kompensatorisch die Glykolyse erheblich ($\text{Aut}^{\text{HI}} > \text{Aut}^{\text{ME}} > \text{Aut}^{\text{LO}}$). Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Redmann et al. (2017) Sie zeigten, dass durch Inhibition der Autophagie, unter anderem durch CQ, sowohl OCR und ATP-Produktion als auch ECAR in Rattenneuronen gegenüber der Kontrollgruppe (unbehandelt) signifikant abnahmen. Somit zeigten sich die Zellen mit gehemmter Autophagie im Plot ähnlich wie Aut^{LO} der MOLM-13-Zellen: sowohl in Bezug auf ECAR als auch OCR am wenigsten aktiv (siehe Abbildung 23C). Dies zeigte eine Abhängigkeit des Energiemetabolismus der Rattenneurone von einer intakt ablaufenden Autophagie. Auch Wu et al. (2009) zeigten an isolierten Mitochondrien aus der Skelettmuskulatur von Atg7-Knockout-Mäusen, dass die gestörte Autophagie-Aktivität der Zellen zu einer signifikanten Abnahme der mitochondrialen Atmungskette führte (Abnahme der OCR und der ATP-Produktion, kompensatorische Zunahme der konstitutiven ECAR). Bezogen auf die konstitutive Autophagie der MOLM-13-Zellen könnte dies bedeuten, dass die Unterschiede in der basalen OCR, basalen ECAR und ATP-Produktion Folge der unterschiedlich aktiven konstitutiven Autophagie waren.

Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die konstitutive Autophagie der Zellen das Resultat der unterschiedlichen mitochondrialen Funktion bzw. des unterschiedlichen Energiebedarfs der Zelle ist. Thomas et al. (2018) zeigten, dass intakte Mitochondrien essentiell für den Mechanismus der Autophagie sind. Sie zeigten, dass eine Inhibition des Komplex I der Atmungskette bei zeitgleicher pharmakologischer Autophagie-Aktivierung dennoch zu einer gestörten Autophagie-Aktivierung führte und ein aktivierter mitochondrialer Metabolismus wiederum zu gesteigerter Autophagie-Aktivierung durch pharmakologische Autophagie-Aktivatoren führte. Auch Rambold und Lippincott-Schwartz (2011) zeigten, dass mittlerweile immer mehr Nachweise existieren, dass Mitochondrien an sich die Autophagie nahezu in jedem Schritt des Autophagie-Prozesses auf verschiedenste Weise beeinflussen können. Dies bedeutet, bezogen auf unsere Daten, dass die konstitutive Autophagie-Aktivität in MOLM-13-Zellen vom zellulären Metabolismus, insbesondere der Atmungskette und somit den Mitochondrien, abhängen könnte, das heißt, dass alle Zellen, die eine erhöhte basale Mitochondrien-Aktivität aufweisen, auch simultan eine erhöhte konstitutive Autophagie-Aktivität zeigen. Ob Stressoren, wie beispielsweise anfallende ROS, entstanden durch die vermehrt aktive Atmungskette, zur Induktion der konstitutiven Autophagie führen, ist zum aktuellen Zeitpunkt rein spekulativ.

Um den Mechanismus des Zusammenhangs zwischen der konstitutiven Autophagie-Aktivität einer MOLM-13-Zelle und deren mitochondrialem Metabolismus zu verstehen, müssten

weitere Versuche vorgenommen werden. Dafür könnte zum Beispiel die mitochondriale Aktivität der Zellen moduliert und anschließend die konstitutive Autophagie gemessen werden. Die Erkenntnisse über den Zusammenhang eröffnen ein interessantes Feld, um eventuell auch neue anti-neoplastische Therapien zu entwickeln. So wie Thomas et al. (2018) bereits mutmaßten, würde die Modulation der mitochondrialen OXPHOS in Tumorzellen womöglich auf zwei Ebenen greifen: der Inhibition des mitochondrialen Metabolismus und der Inhibition der Autophagie.

6.5 Hohe konstitutive Autophagie-Aktivität ist mit der G2/M-Phase des Zellzyklus assoziiert

Um der Vermutung eines Zusammenhangs zwischen der konstitutiven Autophagie-Aktivität und des Zellzyklus weiter nachzugehen, wurden die Zellzyklusprofile der sortierten MOLM-13-Zellen analysiert. Die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschied sich eindeutig in den Fraktionen mit unterschiedlichem Niveau der konstitutiven Autophagie und zeigten die gleiche Tendenz wie bereits in Abbildung 11 mittels des manuellen *gatings* gezeigt. In Aut^{LO} befand sich die Mehrzahl der Zellen in der G1 Phase (80 %), insgesamt doppelt so viele wie in Aut^{HI}. Dafür befanden sich in Aut^{HI} siebenmal so viele Zellen in der G2/M-Phase. Es zeigte sich eindeutig eine Verlagerung der Zellen in Richtung G2/M mit steigender konstitutiver Autophagie-Aktivität. Das Zellzyklusprofil von Aut^{ME} hingegen glich genau dem von unbehandelten, unsortierten Zellen. Dies ließ vermuten, dass der Großteil der Zellen in einer gemischten Population womöglich eine mittlere konstitutive Autophagie aufwies und somit sich vor allem die Zellen mit hoher oder niedriger konstitutiver Autophagie stark davon abgrenzten. Dieser Zusammenhang von Autophagie und Zellzyklusphase wurde mittels Expressionsanalysen Zellzyklus-relevanter Gene und Proteine noch genauer untersucht.

6.5.1 Erhöhte Expression G2/M-spezifischer Proteine und Gene in Aut^{ME}- und Aut^{HI}-Zellen

Dabei konnte auf Transkriptionsebene eine signifikante Zunahme der Expression von *PLK1* und *Cyclin B1* von Aut^{LO} nach Aut^{HI} beobachtet werden. Die PLK1 als am besten erforschte Polo-Like-Kinase, ist an vielen Abschnitten der Mitose, vom Eintritt bis zur Vollendung, von Bedeutung (Lee et al. 2014). Dabei ist *PLK1* während der M-Phase erhöht exprimiert (Martin und Strebhardt 2006). *Cyclin B1* kommt bereits während der G2-Phase im Zellzyklus vor, erreicht das Maximum in der M-Phase und wird anschließend rasch abgebaut. *Cyclin B1* aktiviert dabei im Komplex CDK1 und führt so zur Transition der Zelle in die M-Phase. Während der G2/M-Phase ist auch *Cyclin B1* erhöht exprimiert (Hwang et al. 1995) und dient

in diesem Fall ebenfalls als Indikator für Zellen, die sich in der G2/M-Phase befinden. Die Hochregulation der Expression dieser zwei Gene in Aut^{HI} zeigte, passend zu den Zellzyklusanalysen, dass sich besonders viele Zellen kurz vor oder in der Mitose befanden und die Fraktion sich damit von Aut^{LO} unterschied, in der sowohl *PLK1* als auch *Cyclin B1* weniger exprimiert wurde. Auch auf Proteinebene bestätigte sich eine Zunahme der Cyclin B1-Proteinexpression in Aut^{HI} im Vergleich zu Aut^{ME} und wiederum zu Aut^{LO}. Der Antikörper für pS10H3 markiert an Serin 10 phosphoryliertes Histon 3, welches nur in der Mitose-Phase in dieser phosphorylierten Form vorliegt (Moniz und Stambolic 2011). Die sortierten Fraktionen unterschieden sich erheblich in der Ausstattung mit an Serin 10 phosphoryliertem Histon 3. Mit aufsteigender konstitutiver Autophagie-Aktivität nahm der Anteil an pS10H3 zu, was bedeutet, dass sich in Aut^{ME} und Aut^{HI} zunehmend mehr Zellen in der M-Phase befanden.

Es gelang uns nachzuweisen, dass auch in MOLM-13-Zellen eine konstitutive Autophagie-Aktivität in allen Zellzyklusphasen vorhanden war, indem mittels simultaner durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID- und DRAQ5TM-Fluoreszenz eine Autophagie-Aktivität in jeder Zellzyklusphase zu messen war. Eine Bestätigung für die Autophagie-Aktivität in der M-Phase gelang durch den Einsatz des pS10H3-Antikörpers, der spezifisch für die Mitose ist, und sowohl in Aut^{ME} als auch in Aut^{HI} M-Phase-Zellen detektierte. Weitere Methoden, die eine Differenzierung zwischen der G2- und der M-Phase erlaubt hätten, hätten wiederum zu vermehrtem Zellstress und damit womöglich einer Beeinflussung der Autophagie geführt. Bereits Kaminsky et al. (2011) und Li et al. (2016) zeigten, dass die Autophagie in allen Zellzyklusphasen existierte, jedoch fand in beiden Fällen eine Manipulation der Zellen durch unterschiedlichste methodische Ansätze statt, wodurch eine methodisch bedingte Aktivierung der Autophagie nicht ausgeschlossen werden konnte.

In den sortierten MOLM-13-Zellen konnte nicht nur eine konstitutive Autophagie-Aktivität in allen Zellzyklusphasen gezeigt werden, sondern auch Unterschiede der konstitutiven Autophagie in Bezug auf die Zellzyklusphase. Sowohl auf Proteinexpressionsebene (pS10H3, Cyclin B1) als auch auf Genexpressionsebene (*PLK1*, *Cyclin B1*) konnten die Beobachtungen aus den Zellzyklusanalysen bestätigt werden. Es zeigt sich eindeutig eine Verschiebung der Zellen im Zellzyklus in Richtung der G2/M-Phase mit steigender konstitutiver Autophagie-Aktivität. Diese Ergebnisse deckten sich sowohl mit denen des Etoposid-Versuchs, bei dem Zellen, die sich in der G2/M-Phase befanden, höhere Cyto-ID-Fluoreszenzwerte zeigten als die Zellen der G1-Phase, als auch mit neuesten Arbeitsgruppen-internen Ergebnissen, in denen MOLM-13-Zellen sortiert nach ihrer Zellzyklusphase (durchflusszytometrisch mittels DRAQ5TM) ebenfalls höhere Cyto-ID-Fluoreszenzwerte in der G2/M-Phase und niedrige Cyto-

ID-Fluoreszenzwerte in der G1-Phase aufwiesen (persönliche Mitteilung: Dr. Jürgen Sonnemann).

Dies sind erstmalige Ergebnisse, die auf Daten von nicht synchronisierten, nicht Autophagie-modulierten Zellen basieren.

Tasdemir et al. (2007) vermuteten, dass die Autophagie vor allem in der G1- und S-Phase in HCT116-Kolonkrebiszellen aktiviert war, da sie in diesen Zellzyklusphasen die stärkste Autophagie-Aktivierung mittels der eingesetzten Autophagie-Aktivatoren (Rapamycin, Lithium etc.) erzielten. Kaminsky et al. (2011) wiederum fanden keinerlei Zellzyklus-abhängige Autophagie-Induktion und gingen lediglich von einer konstitutiven Autophagie-Aktivität in allen Zellzyklusphasen aus. Eskelinen et al. (2002) und auch Furuya et al. (2010) beschrieben hingegen eine starke Abnahme der Autophagie-Aktivität während der M-Phase. Furuya et al. (2010) zeigten, dass CDK1 Vps34 phosphorylierte, darüber wiederum dessen Interaktion mit Beclin-1 störte und letztendlich die Initiation der Autophagie gehemmt wurde. Neuere Studien hingegen wiesen auf die Funktion der Autophagie während der Mitose-Phase und vor allem ihre Bedeutung während der Zytokinese hin (Belaid et al. 2013). Li et al. (2016) zeigten an drei nicht-malignen Zelllinien und der malignen HeLa-Zelllinie, dass der *autophagic flux* vor allem in der frühen M-Phase und der S-Phase verstärkt war und in der restlichen Interphase und der späten M-Phase weniger aktiv war. Auch Loukil et al. (2014) bestätigten ebenfalls das Auftreten von LC3B-Puncta in mitotischen MCF-7 Brustkrebiszellen und eine Zunahme des *autophagic flux* in der M-Phase (unter Zugabe von lysosomalen Inhibitoren). Daneben zeigte sich die Bedeutung der Autophagie während der Zytokinese, vor allem in Versuchsansätzen, die das Versagen des *autophagic flux* herbeiführten. You et al. (2016) zeigten, dass der Knockdown von Beclin-1 und auch die Behandlung mit 3-MA (Autophagie-Inhibitor der PI3-Kinase) zu einem Versagen des fehlerfreien Ablaufens der Zytokinese führten. Es existieren noch weitaus mehr Forschungsarbeiten, die sich sowohl mit einzelnen CDKs, CKIs und Checkpoint-Kinase als auch umgekehrt mit dem Einfluss der selektiven Autophagie auf den Abbau bestimmter Zellzyklusproteine oder die Regulation der *DDR* beschäftigen (Zheng et al. 2019).

Die Widersprüchlichkeit in Bezug auf die zellzyklusabhängige Autophagie-Aktivität einer Zelle beruht vor allem auf der Komplexität dieser zwei dynamischen Prozesse. Nicht zu unterschätzen sind sowohl die Variation der methodischen Ansätze als auch die Vielfalt der untersuchten Zelllinien. Meist wurden die Zellen mittels doppeltem Thymidinblock, Nocodazol-induziertem M-Phase-Arrest oder Nährstoffentzug synchronisiert, um im Anschluss die Zellzyklusphasen-abhängige Autophagie zu messen (Li et al. 2016, Tasdemir et al. 2007).

Da der Prozess der Autophagie besonders sensibel auf Zellstress wie beispielsweise Nährstoffmangel oder durch doppelten Thymidinblock-induzierte *DDR* (Darzynkiewicz et al. 2011) reagiert, kann ein methodischer Einfluss auf die Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Auch die Nachweismethoden der Autophagie-Aktivität variierten zwischen den Forschungsarbeiten. Dabei stellt die Transfektion GFP-markierter Gene (Ben-David et al. 2018), wie beispielsweise GFP-LC3B oder mCherry-EGFP-LC3, ebenfalls eine Gefahr der Beeinflussung der Ergebnisse durch genetische Manipulation der Zelllinien dar (Li et al. 2016, Tasdemir et al. 2007). Zudem untersuchten die Arbeitsgruppen jeweils unterschiedliche Zelllinien (Tumorzelllinien (adhärente und Suspensions-Zellen) und nicht-maligne Zelllinien), weshalb Zelllinien-spezifische Unterschiede in den Ergebnissen der zellzyklusabhängigen Autophagie-Aktivierung nicht auszuschließen sind.

Um den Zusammenhang des Zellzyklus und der konstitutiven Autophagie-Aktivität in MOLM-13-Zellen zu untersuchen, wurden die obengenannten Einflüsse so gering wie möglich gehalten. Dabei wurde die Autophagie-Nachweismethode mittels Cyto-ID bewusst gewählt und mittels der Standardmethode (Western Blot von LC3B-II) validiert. Im Voraus wurde Cyto-ID sowohl auf seine Toxizität, den Einfluss auf den Zellzyklus als auch seine Sensitivität für den Nachweis des *autophagic flux* geprüft. Die Zellen wurden nicht synchronisiert, sondern ihre Zellzyklusphase mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DRAQ5TM oder PI ermittelt. Die Differenzierung zwischen der G2-Phase und der M-Phase konnte in den MOLM-13-Zellen nur durch den Einsatz des pS10H3-Antikörpers, der spezifisch mitotische Zellen markiert und bewies, dass sich in Aut^{HI} deutlich mehr Zellen in der M-Phase befanden als in den anderen Fraktionen, vorgenommen werden. Meine Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass sich Zellen mit hoher konstitutiver Autophagie-Aktivität (Aut^{HI}) vermehrt in der G2/M-Phase befinden und sich hingegen Zellen mit niedriger konstitutiver Autophagie (Aut^{LO}) vermehrt in der G1-Phase befinden. Aufgrund dieser Beobachtung, der simultanen Messungen von Cyto-ID und DRAQ5TM und Arbeitsgruppen-internen Ergebnissen, gehen wir davon aus, dass die konstitutive Autophagie in Zellen, die sich in der G2- oder M-Phase befinden, aktiver ist als zu anderen Zeitpunkten des Zellzyklus.

6.5.2 Möglicher Einfluss der Zellzyklusphase auf den Metabolismus der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass sich in Aut^{HI} deutlich mehr Zellen in oder kurz vor der Mitose-Phase befanden als in Aut^{ME} und Aut^{LO}. Betrachtet man nun den Zusammenhang zwischen der Zellzyklusphase und dem Energiemetabolismus, so zeigen sich auch hier eindeutige Unterschiede. Montemurro et al. (2017) beschrieben, dass in INS 832/13-Zellen

(β -pankreatische Zellen) die OCR, die ECAR und die ATP-Produktion in der S- und der G2/M-Phase signifikant gegenüber der G1-Phase erhöht waren. Auch Bao et al. (2013) konnten zeigen, dass in Kolonkrebs-Zellen die ATP-Produktion in der G2/M-Phase vor allem von der OXPHOS abhing und auch die gemessenen ROS-Werte zeitgleich ihr Maximum erreichten. In der G1-Phase hingegen fand die ATP-Produktion maßgeblich mittels aerober Glykolyse statt. Wang et al. (2014) konnten auf molekularer Ebene zeigen, dass ein Teil der Cyclin B1/CDK1-Komplexe, die vor allem den Eintritt in die M-Phase koordinieren, eine Untereinheit des Komplex 1 der Atmungskette phosphoryliert und diese damit aktiviert. In den humanen epithelialen Brustkrebszellen MCF-10A konnten also während der G2/M-Transition eine gesteigerte OCR und eine Steigerung der ATP-Produktion gemessen werden. Die Ergebnisse unserer Zellzyklusanalysen und Metabolismus-Daten der sortierten Zellen in Kombination mit den Erkenntnissen vorheriger Forschungsarbeiten weisen darauf hin, dass es auch in MOLM-13-Zellen eine vom Zellzyklus abhängige Steigerung des mitochondrialen Metabolismus geben könnte. Somit könnte der hohe Anteil der Zellen in der G2/M-Phase in Aut^{HI} die Ursache für die gesteigerte OCR und ATP-Produktion sein und der hohe Anteil der Zellen in der G1-Phase in Aut^{LO} ursächlich für die niedrigeren Werte der OCR und ATP-Produktion sein. Kommen die Unterschiede der Zellzyklus-Verteilung der Zellen in den sortierten Fraktionen nun als Ursache für den gesteigerten Metabolismus (Aut^{HI}) in Frage, würde das wiederum die Hypothese stützen, dass die höheren Werte der konstitutiven Autophagie in Aut^{HI} Folge des gesteigerten mitochondrialen Metabolismus sein könnten. Dafür spricht vor allem, dass die ROS-Level, wobei ROS zu den stärksten Autophagie-Stimuli zählen (Azad et al. 2009), laut Bao et al. (2013) ihr Maximum in der G2/M-Phase erreichten.

Diese Überlegungen erfolgten, nachdem der hohe Anteil der Zellen in der G2/M-Phase in Aut^{HI} nachgewiesen wurde, und schließen dabei aber nicht aus, dass auch ein Effekt der konstitutiven Autophagie auf den mitochondrialen Metabolismus oder ein Effekt des Zellzyklus auf die Autophagie unabhängig von der mitochondrialen Aktivität existieren könnte. Diese diskutierten Zusammenhänge geben Anregung für viele weitere Forschungsarbeiten in Bezug auf die Korrelation von Metabolismus, konstitutiver Autophagie und Zellzyklus in Tumorzellen.

6.6 Unterschiede in der konstitutiven Autophagie-Aktivität haben keinen Einfluss auf die Chemosensibilität von MOLM-13-Zellen

Die etablierte Methode der Zellsortierung eignete sich bereits sehr gut, um den Metabolismus und den Zellzyklus in Zusammenhang mit der konstitutiven Autophagie-Aktivität in MOLM-13-Zellen zu untersuchen. Zudem eröffnete die Methode auch die Möglichkeit, den Einfluss der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf die Sensibilität der Zellen gegenüber verschiedener

Chemotherapeutika zu testen. Diese Idee rührte daher, dass seit der Zunahme der Erkenntnisse der dualen Rolle der Autophagie bei der Tumorentstehung und -Progression, ebenfalls eine duale Rolle der Autophagie in manifesten Tumorzellen als Antwort auf anti-neoplastische Behandlungen (im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf Chemotherapeutika) vermutet wird. Letzteres beruht darauf, dass in verschiedensten Tumorarten und auch durch eine Vielzahl eingesetzter Substanzen eine Induktion der Autophagie als Antwort auf die Behandlung beobachtet wurde (Sui et al. 2013, Gao et al. 2011), welche entweder zu einer Zunahme des Zelltods, vorwiegend durch den *autophagic cell death*, oder einer Abnahme des Zelltods durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen in Tumorzellen führte (Yun und Lee 2018). Letzteres limitiert oftmals die Erfolge von Chemotherapien und stellt vor allem in der klinischen Behandlung von Patienten ein sehr großes Problem dar. Diverse Forschungsgruppen versuchten diesen Zusammenhang mittels Kombinationsbehandlungen von entweder Autophagie-Aktivatoren wie Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor, oder Autophagie-Inhibitoren wie CQ/HCQ und Chemotherapeutika zu untersuchen. Dabei führte vor allem der Einsatz von CQ zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen und einem Anstieg des Zelltods als Antwort auf Zytostatika (Yun und Lee 2018, Li et al. 2017). Da jedoch CQ nachweislich auch Autophagie-unabhängig anti-tumorale Effekte aufwies (Maycotte et al. 2012, Eng et al. 2016), wurden vielerlei Experimente auch an genetisch Autophagie-inhibierten Tumorzellen, beispielsweise mittels Knockout Autophagie-relevanter Gene vorgenommen. Sowohl die pharmakologische Inhibition als auch die genetische Inhibition der Autophagie lieferte das Ergebnis, dass durch eine Dysfunktion der Autophagie in Tumorzellen diese sensibler gegenüber Chemotherapeutika reagieren und die Kombinationsbehandlung mit Autophagie-inhibierenden Substanzen und Chemotherapeutika womöglich die Resistenzentwicklung verzögern oder sogar verhindern könnte. Bislang wurde die Autophagie in Tumormodellen zwar in jedwede Richtung moduliert, jedoch gibt es kaum Forschungsarbeiten, die sich ganz grundlegend mit dem Einfluss der konstitutiven Autophagie von Tumorzellen auf die zelluläre Antwort nach Chemotherapeutika-Behandlung beschäftigen. Chi et al. (2016) untersuchten beispielsweise diverse Autophagie-Modulatoren an zwei verschiedenen Hepatoma-Zelllinien, HA22T und Huh7.5.1, die sich in ihrem konstitutiven *autophagic flux* zu unterscheiden schienen, sich jedoch auch noch in vielen weiteren Eigenschaften unterschieden.

Mit der Autophagie-spezifischen Zellsortierungsmethode war es nun erstmalig möglich, den Einfluss der Unterschiede der konstitutiven Autophagie-Aktivität in Zellen einer einzigen Zelllinie auf die Wirkung von Zytostatika zu untersuchen. Dafür wurden die sortierten MOLM-13-Zellen für 24 Stunden mit Etoposid und Cytarabin in aufsteigenden Konzentrationen

behandelt. Ein Teil der Zellen wurde 24 Stunden mit SRT1720 (5 μ M), das der Autophagie-Aktivierung diene, vorbehandelt. Um jegliche zytotoxischen Effekte der SRT1720 zu verhindern, wurden niedrige Konzentrationen, die nachweislich vernachlässigbar gering toxisch waren, eingesetzt und die Zellen vor dem Sortiervorgang erneut drei Mal gründlich gewaschen. Chi et al. (2016) beispielsweise induzierten die Autophagie mittels Rapamycin und inkubierten die Zellen über 48 Stunden damit. Demnach war ein möglicher zytotoxischer Effekt des Rapamycins nicht ganz auszuschließen. Die Behandlung der MOLM-13-Zellen mit SRT1720 diene dazu, das Spektrum der Unterschiede in der konstitutiven Autophagie zu erweitern. Die Sensibilität der MOLM-13-Zellen auf Etoposid und Cytarabin unterschied sich weder innerhalb der Fraktionen (Aut^{LO} bis Aut^{HI}) noch zwischen den unbehandelten und vorbehandelten Zellen. Somit spielte die Aktivität der konstitutiven Autophagie keinerlei Rolle. In allen Zellfraktionen unterschied sich lediglich der Verlust des MMP, der vor allem als frühes Zeichen der Apoptose gilt, von dem Zelltod. Diese Differenz ließ sich womöglich auf die Kürze der Inkubationszeit von 24 Stunden zurückführen, in der die volle zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika auf die Zellen nicht entfaltet werden konnte. Aufgrund dessen und um eine allgemeine Aussage über die Chemosensibilität der sortierten MOLM-13-Zellen treffen zu können, wurde zum einen die Inkubationszeit auf 48 Stunden verlängert und zum anderen wurden zwei auf unterschiedliche Weise wirkende Zytostatika eingesetzt (siehe 5.6). Auch nach Behandlung mit Camptothecin und Vincristin zeigten sich keine Unterschiede in der Sensibilität der Zellen gegenüber den Zytostatika. Sowohl Zelltod als auch der Verlust des $\Delta\psi_m$ glichen sich in allen Fraktionen, auch zwischen unbehandelten und vorbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die konstitutive Autophagie-Aktivität von MOLM-13-Zellen und auch eine Aktivierung der Autophagie-Aktivität vor der Behandlung mit Chemotherapeutika keinen nennenswerten Einfluss auf die Wirkung der Chemotherapeutika haben. Diese Ergebnisse bestätigten sich ebenfalls in Jurkat-Zellen (persönliche Mitteilung Dr. Jürgen Sonnemann).

Diese Erkenntnis ist in der Autophagie-Forschung neu und leistet einen großen Beitrag für das bessere Verständnis der Rolle der Autophagie in Bezug auf die Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzmechanismen. Zum einen stützen diese Ergebnisse die These, dass eine Inhibition der Autophagie womöglich die Wirkung von Zytostatika in vielversprechenderer Weise moduliert als eine initiale Autophagie-Aktivierung. Zum anderen sollte in Zukunft der Schwerpunkt vor allem auf die Erforschung der tumorprotektiven Autophagie-Aktivierung als Antwort auf die Zytostatika-Behandlung gelegt werden, da

zumindest in MOLM-13-Zellen ein Einfluss des initialen konstitutiven *autophagic flux* ausgeschlossen werden konnte.

7 Schlussfolgerung

Die Optimierung und Validierung der Methode der Zellsortierung mittels des Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs Cyto-ID ermöglichte im Rahmen dieser Dissertation erstmalig, Zellen nach der Aktivität ihrer konstitutiven Autophagie zu sortieren und im Anschluss den Zusammenhang mit dem Zellzyklus, dem Energiemetabolismus und dem Einfluss auf die Chemosensibilität zu untersuchen. Zukünftig wird diese Methode womöglich das Feld der Autophagie-Nachweismethoden wie auch das der Autophagie-Grundlagenforschung bereichern. Mithilfe der Zellsortierung wurde Klarheit in den kontroversen Forschungsstand über das Zusammenspiel von Autophagie und Zellzyklus gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass eine differentielle Regulation der Autophagie im Zellzyklus existiert, die zu einem gesteigerten *autophagic flux* in der G2/M-Phase führt. Anhand unbehandelter, nicht durch genetische Manipulation oder den Einsatz Autophagie-modulierender Substanzen beeinflusster Zellen wurde zudem erstmalig eine konstitutive Autophagie-Aktivität in jeder Zelle und auch in jeder Zellzyklusphase nachgewiesen. Außerdem unterschieden sich die sortierten Zellen, je nach Aktivität der konstitutiven Autophagie, signifikant in ihrem Metabolismus. Die metabolischen Analysen im Anschluss an die Zellsortierung zeigten mit zunehmendem *autophagic flux* eine Zunahme der Aktivität der Atmungskette und der Glykolyse. Ob dies in Zusammenhang mit der massiven Zunahme an Zellen in der G2/M-Phase mit zunehmender Autophagie-Aktivität steht, wurde diskutiert, konnte aber nicht abschließend geklärt werden und stellt somit ein interessantes Thema für zukünftige Forschungsarbeiten dar. Zuletzt wurde anhand der sortierten Zellen nachgewiesen, dass auch große Unterschiede in der Autophagie-Aktivität, sogar nach Induktion durch den potenten Autophagie-Aktivator SRT1720, keinen Einfluss auf die Sensibilität der Zellen gegenüber vier verschiedenen Zytostatika hatten. Dies macht einen Einfluss der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf Resistenzmechanismen in Tumorzellen weniger wahrscheinlich und verlegt damit den Schwerpunkt vor allem auf die Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen der Autophagie-Aktivierung als Antwort auf die antitumoralen Therapien.

Auch wenn in den letzten Jahren viel Arbeit in die Erforschung der Autophagie, die damit verbundenen intrazellulären Verknüpfungen und ihre Bedeutung in der Entstehung und Progression von Erkrankungen investiert wurde, ist der Wissensstand zum jetzigen Zeitpunkt noch eher gering. Ziel ist es, den Autophagie-Mechanismus auf molekularbiologischer Ebene zur Gänze zu verstehen, um die Modulation dieses Prozesses für therapeutische Zwecke nutzen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit wichtige Bausteine für das sich fügende Puzzle.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung des Autophagie-Prozesses und spezifischer Inhibitoren.	8
Abbildung 2: Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle.	17
Abbildung 3: Ausschnitt aus BD-Software des Sortiergeräts.	38
Abbildung 4: Wirkung der applizierten Substanzen auf die OXPHOS.	42
Abbildung 5: Systematische Darstellung einer Seahorse-Messung.	43
Abbildung 6: Einfluss von Etoposid und 3-MA auf den Zellzyklus.	50
Abbildung 7: Nachweis der Zytotoxizität und der Autophagie-Aktivierung durch Etoposid.	51
Abbildung 8: Einfluss von Etoposid und 3-MA auf den Zellzyklus und die Autophagie- Aktivität.	52
Abbildung 9: Abhängigkeit des Zellzyklusarrest und der Autophagie-Aktivierung von der Inkubationszeit mit Etoposid.	53
Abbildung 10: Darstellung der durchflusszytometrischen Einteilung der 5 Cyto-ID Fraktionen.	54
Abbildung 11: Darstellung der Zellzyklusprofile von LOW, MEDIUM und HIGH der 5 Cyto- ID-Fraktionen.	55
Abbildung 12: Darstellung der 5 Cyto-ID Fraktionen und deren Zellzyklusprofile mit steigender Inkubationszeit von 0,5 µM Etoposid.	56
Abbildung 13: Einfluss der Umgebungstemperatur und der Inkubationszeit auf die Cyto-ID- Fluoreszenz der gefärbten Zellen.	57
Abbildung 14: Zytotoxizität von Cyto-ID in MOLM-13-Zellen.	58
Abbildung 15: Nachweis der Zytotoxizität und der Autophagie-Aktivierung durch SRT1720.	59
Abbildung 16: Einfluss von SRT1720 auf den Zellzyklus.	60
Abbildung 17: Messung des zeitlichen Verlaufs der Cyto-ID-Fluoreszenz nach Zellsortierung von unbehandelten und vorbehandelten Zellen.	61
Abbildung 18: Relative Expression der ULK1-mRNA, der LC3B-mRNA und ATG7-mRNA direkt nach Zellsortierung und der ULK1-mRNA 24 h nach Zellsortierung.	62
Abbildung 19: Nachweis der Expression Autophagie-relevanter Proteine in den Cyto-ID- sortierten Fraktionen mittels Western Blot.	63
Abbildung 20: Expression von LC3B in den Cyto-ID-sortierten Zellen.	64

Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von LC3B- und p62-Puncta in den Cyto-ID-sortierten Zellen.	65
Abbildung 22: Analyse des mitochondrialen Metabolismus und Bestimmung spezifischer Parameter (ATP-Produktion und nicht-mitochondriale Atmung) der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	66
Abbildung 23: Analyse der glykolytischen Aktivität (A+B) und Darstellung von basaler OCR und ECAR (C) der Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	68
Abbildung 24: Zellzyklusanalyse der Cyto-ID-sortierten unbehandelten und behandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.....	70
Abbildung 25: Expression der Polo-Like-Kinase-1-mRNA und Cyclin-B1-mRNA in Cyto-ID-sortierten Zellen.....	71
Abbildung 26: Nachweis der Expression Zellzyklus-relevanter Proteine in den Cyto-ID-sortierten Zellen.....	72
Abbildung 27: Wirkung von Etoposid und Cytarabin auf den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und den Zelltod in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.....	74
Abbildung 28: Wirkung von Vincristin und Camptothecin auf den Verlust des $\Delta\psi_m$ und den Zelltod in Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen.	75

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 2: Verwendetes Material.	26
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien, Medien, Puffer und Kits.	28
Tabelle 4: Eingesetzte Zytostatikakonzentrationen nach der Zellsortierung.	30
Tabelle 5: Eingesetzte Autophagie-Aktivatoren (SRT1720, Etoposid) und -Inhibitoren (3-MA, CQ).	31
Tabelle 6: Eigenschaften von Propidiumiodid.	33
Tabelle 7: Eigenschaften von DiOC ₆ (3) und DiIC ₁ (5).....	33
Tabelle 8: Eigenschaften von DRAQ5.....	36
Tabelle 9: Zusammensetzungen der für die Herstellung der Proteinlysate verwendeten Pufferlösungen.....	39
Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Trenngele.....	40
Tabelle 11: Zusammensetzung des für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Sammelgels.	40
Tabelle 12: Auflistung aller verwendeter primären und sekundären Antikörper, deren Hersteller und eingesetzte Verdünnung.....	41
Tabelle 13: Verwendete Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie.	44
Tabelle 14: PCR Reagenzien pro Probe.	48
Tabelle 15: Darstellung der absoluten Cyto-ID-Fluoreszenzwerte behandelter und unbehandelter sortierter Zellen 2 h nach Zellsortierung.....	61
Tabelle 16: Zellzyklusanalysen von Cyto-ID-sortierten MOLM-13-Zellen und unsortierten MOLM-13-Zellen (1,5 h nach Zellsortierung).....	71

8.3 Literaturverzeichnis

- Abada A, Elazar Z. 2014. Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep*, 15 (8):839-852.
- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9 (6):400-414.
- Adimoolam S, Lin CX, Ford JM. 2001. The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts. *J Biol Chem*, 276 (28):25813-25822.
- Azad MB, Chen Y, Gibson SB. 2009. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal*, 11 (4):777-790.
- Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, Yamamoto T, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, Minamishima YA. 2013. Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res*, 11 (9):973-985.
- Barnum KJ, O'Connell MJ. 2014. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*, 1170:29-40.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. 1996. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, 8 (6):805-814.
- Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termeau E, Pedoutour F, Giuliano S, Ilie M, Rubera I, Tauc M, Barale S, Bertolotto C, Brest P, Vouret-Craviari V, Kliensky DJ, Carle GF, Hofman P, Mograbi B. 2013. Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res*, 73 (14):4311-4322.
- Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, Nag A, Kugener G, Cimini B, Tsvetkov P, Maruvka YE, O'Rourke R, Garrity A, Tubelli AA, Bandopadhyay P, Tsherniak A, Vazquez F, Wong B, Birger C, Ghandi M, Thorner AR, Bittker JA, Meyerson M, Getz G, Beroukhim R, Golub TR. 2018. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, 560 (7718):325-330.
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. 2005. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest*, 23 (1):60-75.
- Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, Faienza F, Esposito V, Limatola C, Cecconi F, Di Bartolomeo S. 2015. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*, 9 (8):1612-1625.
- Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J. 2012. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy*, 8 (9):1371-1382.
- Chen YF, Liu H, Luo XJ, Zhao Z, Zou ZY, Li J, Lin XJ, Liang Y. 2017. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. *Crit Rev Oncol Hematol*, 112:21-30.
- Chi KH, Wang YS, Huang YC, Chiang HC, Chi MS, Chi CH, Wang HE, Kao SJ. 2016. Simultaneous activation and inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to chemotherapy. *Oncotarget*, 7 (36):58075-58088.
- Clifford B, Beljin M, Stark GR, Taylor WR. 2003. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res*, 63 (14):4074-4081.
- Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhauser M, Juliusson G, Racil Z, Rowe JM, Russell N, Mohty M, Lowenberg B, Socie G, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ.

2012. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*, 9 (10):579-590.
- Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H, Podhorecka M. 2011. Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 761:85-96.
- Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, Zhou Q, Wilz LM, Li J, Vivona S, Pfuetzner RA, Brunger AT, Zhong Q. 2015. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520 (7548):563-566.
- Dikic I, Elazar Z. 2018a. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19 (6):349-364.
- Dikic I, Elazar Z. 2018b. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19 (6):349-364.
- Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Lowenberg B, Bloomfield CD. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129 (4):424-447.
- Dombret H, Gardin C. 2016. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 127 (1):53-61.
- Eliopoulos AG, Havaki S, Gorgoulis VG. 2016. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. *Front Genet*, 7:204.
- Eng CH, Wang Z, Tkach D, Toral-Barza L, Ugwonali S, Liu S, Fitzgerald SL, George E, Frias E, Cochran N, De Jesus R, McAllister G, Hoffman GR, Bray K, Lemon L, Lucas J, Fantin VR, Abraham RT, Murphy LO, Nyfeler B. 2016. Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (1):182-187.
- Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, Backer JM, Lucocq JM. 2002. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic*, 3 (12):878-893.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. 2018. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*.
- Ferrick DA, Neilson A, Beeson C. 2008. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today*, 13 (5-6):268-274.
- Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G. 2011. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One*, 6 (6):e20849.
- Foster I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14 (2):144-149.
- Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, Shen Y, Rameh L, Yankner B, Tsai LH, Yuan J. 2010. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell*, 38 (4):500-511.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. 2017a. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14 (4):247-258.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, Green DR, Kroemer G. 2017b. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 16 (7):487-511.
- Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. 2011. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ*, 18 (10):1598-1607.

- Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221 (1):3-12.
- Gordon PB, Kovacs AL, Seglen PO. 1987. Temperature dependence of protein degradation, autophagic sequestration and mitochondrial sugar uptake in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 929 (2):128-133.
- Graef M, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. 2013. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol Biol Cell*, 24 (18):2918-2931.
- Grant S. 1998. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res*, 72:197-233.
- Gu X, Han D, Chen W, Zhang L, Lin Q, Gao J, Fanning S, Han B. 2016. SIRT1-mediated FoxOs pathways protect against apoptosis by promoting autophagy in osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to sodium fluoride. *Oncotarget*, 7 (40):65218-65230.
- Gump JM, Staskiewicz L, Morgan MJ, Bamberg A, Riches DW, Thorburn A. 2014. Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1. *Nat Cell Biol*, 16 (1):47-54.
- Guo S, Liang Y, Murphy SF, Huang A, Shen H, Kelly DF, Sobrado P, Sheng Z. 2015. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy*, 11 (3):560-572.
- Gutschner T, Diederichs S. 2012. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*, 9 (6):703-719.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495 (7441):389-393.
- Harnett MM, Pineda MA, Latre de Late P, Eason RJ, Besteiro S, Harnett W, Langsley G. 2017. From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J*, 40 (1):9-22.
- He C, Baba M, Cao Y, Klionsky DJ. 2008. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell*, 19 (12):5506-5516.
- Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK. 2012. Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res*, 72 (17):4294-4299.
- Hwang A, Maity A, McKenna WG, Muschel RJ. 1995. Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J Biol Chem*, 270 (47):28419-28424.
- Ingham M, Schwartz GK. 2017. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. *J Clin Oncol*, 35 (25):2949-2959.
- Jacob DA, Gibson EG, Mercer SL, Dewese JE. 2013. Etoposide catechol is an oxidizable topoisomerase II poison. *Chem Res Toxicol*, 26 (8):1156-1158.
- Kaizuka T, Morishita H, Hama Y, Tsukamoto S, Matsui T, Toyota Y, Kodama A, Ishihara T, Mizushima T, Mizushima N. 2016. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol Cell*, 64 (4):835-849.
- Kaminsky V, Abdi A, Zhivotovsky B. 2011. A quantitative assay for the monitoring of autophagosome accumulation in different phases of the cell cycle. *Autophagy*, 7 (1):83-90.
- Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. 2007. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ*, 14 (3):548-558.
- Ke PY. 2017. Horning cell self-digestion: Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomed J*, 40 (1):5-8.

Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Bieging KT, Jiang D, Dusek RL, Brady CA, Sidow A, Attardi LD. 2013. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev*, 27 (9):1016-1031.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13 (2):132-141.

Kimmelman AC, White E. 2017. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab*, 25 (5):1037-1043.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhietty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akporiaye ET, Al-Rubeai M, Albaiceta GM, Albanese C, Albani D, Albert ML, Aldudo J, Algul H, Alirezaei M, Alloza I, Almasan A, Almonte-Beceril M, Alnemri ES, Alonso C, Altan-Bonnet N, Altieri DC, Alvarez S, Alvarez-Erviti L, Alves S, Amadoro G, Amano A, Amantini C, Ambrosio S, Amelio I, Amer AO, Amessou M, Amon A, An Z, Anania FA, Andersen SU, Andley UP, Andreadi CK, Andrieu-Abadie N, Anel A, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Antonioli M, Aoki H, Apostolova N, Aquila S, Aquilano K, Araki K, Arama E, Aranda A, Araya J, Arcaro A, Arias E, Arimoto H, Ariosa AR, Armstrong JL, Arnould T, Arsov I, Asanuma K, Askanas V, Asselin E, Atarashi R, Atherton SS, Atkin JD, Attardi LD, Auberger P, Auburger G, Aurelian L, Autelli R, Avagliano L, Avantaggiati ML, Avrahami L, Awale S, Azad N, Bachetti T, Backer JM, Bae DH, Bae JS, Bae ON, Bae SH, Baehrecke EH, Baek SH, Baghdiguian S, Bagniewska-Zadworna A, Bai H, Bai J, Bai XY, Bailly Y, Balaji KN, Balduini W, Ballabio A, Balzan R, Banerjee R, Banhegyi G, Bao H, Barbeau B, Barrachina MD, Barreiro E, Bartel B, Bartolome A, Bassham DC, Bassi MT, Bast RC, Jr., Basu A, Batista MT, Batoko H, Battino M, Bauckman K, Baumgarner BL, Bayer KU, Beale R, Beaulieu JF, Beck GR, Jr., Becker C, Beckham JD, Bedard PA, Bednarski PJ, Begley TJ, Behl C, Behrends C, Behrens GM, Behrns KE, Bejarano E, Belaid A, Belleudi F, Benard G, Berchem G, Bergamaschi D, Bergami M, Berkhout B, Berliocchi L, Bernard A, Bernard M, Bernassola F, Bertolotti A, Bess AS, Besteiro S, Bettuzzi S, Bhalla S, Bhattacharyya S, Bhutia SK, Biagosch C, Bianchi MW, Biard-Piechaczyk M, Billes V, Bincoletto C, Bingol B, Bird SW, Bitoun M, Bjedov I, Blackstone C, Blanc L, Blanco GA, Blomhoff HK, Boada-Romero E, Bockler S, Boes M, Boesze-Battaglia K, Boise LH, Bolino A, Boman A, Bonaldo P, Bordi M, Bosch J, Botana LM, Botti J, Bou G, Bouche M, Bouche-careilh M, Boucher MJ, Boulton ME, Bouret SG, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady N, Braga VM, Brancolini C, Braus GH, Bravo-San Pedro JM, Brennan LA, Bresnick EH, Brest P, Bridges D, Bringer MA, Brini M, Brito GC, Brodin B, Brookes PS, Brown EJ, Brown K, Broxmeyer HE, Bruhat A, Brum PC, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Bryson-Richardson RJ, Buch S, Buchan AM, Budak H, Bulavin DV, Bultman SJ, Bultynck G, Bumbasirevic V, Burelle Y, Burke RE, Burmeister M, Butikofer P, Caberlotto L, Cadwell K, Cahova M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calatayud S, Camougrand N, Campanella M, Campbell GR, Campbell M, Campello S, Candau R, Caniggia I, Cantoni L, Cao L, Caplan AB, Caraglia M, Cardinali C, Cardoso SM, Carew JS, Carleton LA, Carlin CR, Carloni S, Carlsson SR, Carmona-Gutierrez D, Carneiro LA, Carnevali O, Carra S, Carrier A, Carroll B, Casas C, Casas J, Cassinelli G, Castets P, Castro-Obregon S, Cavallini G, Ceccherini I, Cecconi F, Cederbaum AI, Cena V, Cenci S, Cerella C, Cervia D, Cetrullo S, Chaachouay H, Chae HJ, Chagin AS, Chai CY, Chakrabarti G, Chamilos G, Chan EY, Chan MT, Chandra D, Chandra P, Chang CP, Chang RC, Chang TY, Chatham JC, Chatterjee S, Chauhan S, Che Y, Cheetham ME, Cheluvappa R, Chen CJ, Chen G, Chen GC, Chen G, Chen H, Chen JW, Chen JK, Chen M, Chen M, Chen P, Chen Q, Chen Q, Chen SD, Chen S, Chen SS, Chen W, Chen WJ, Chen WQ, Chen

W, Chen X, Chen YH, Chen YG, Chen Y, Chen Y, Chen Y, Chen YJ, Chen YQ, Chen Y, Chen Z, Chen Z, Cheng A, Cheng CH, Cheng H, Cheong H, Cherry S, Chesney J, Cheung CH, Chevet E, Chi HC, Chi SG, Chiacchiera F, Chiang HL, Chiarelli R, Chiariello M, Chieppa M, Chin LS, Chiong M, Chiu GN, Cho DH, Cho SG, Cho WC, Cho YY, Cho YS, Choi AM, Choi EJ, Choi EK, Choi J, Choi ME, Choi SI, Chou TF, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chow KC, Chowdhury K, Chu CT, Chuang TH, Chun T, Chung H, Chung T, Chung YL, Chwae YJ, Cianfanelli V, Ciarcia R, Ciechomska IA, Ciriolo MR, Cirone M, Claerhout S, Clague MJ, Claria J, Clarke PG, Clarke R, Clementi E, Cleyrat C, Cnop M, Coccia EM, Cocco T, Codogno P, Coers J, Cohen EE, Colecchia D, Coletto L, Coll NS, Colucci-Guyon E, Comincini S, Condello M, Cook KL, Coombs GH, Cooper CD, Cooper JM, Coppens I, Corasaniti MT, Corazzari M, Corbalan R, Corcelle-Termeau E, Cordero MD, Corral-Ramos C, Corti O, Cossarizza A, Costelli P, Costes S, Cotman SL, Coto-Montes A, Cottet S, Couve E, Covey LR, Cowart LA, Cox JS, Coxon FP, Coyne CB, Cragg MS, Craven RJ, Crepaldi T, Crespo JL, Criollo A, Crippa V, Cruz MT, Cuervo AM, Cuezva JM, Cui T, Cutillas PR, Czaja MJ, Czyzyk-Krzeska MF, Dagda RK, Dahmen U, Dai C, Dai W, Dai Y, Dalby KN, Dalla Valle L, Dalmaso G, D'Amelio M, Damme M, Darfeuille-Michaud A, Dargemont C, Darley-Usmar VM, Dasarathy S, Dasgupta B, Dash S, Dass CR, Davey HM, Davids LM, Davila D, Davis RJ, Dawson TM, Dawson VL, Daza P, de Belleruche J, de Figueiredo P, de Figueiredo RC, de la Fuente J, De Martino L, De Matteis A, De Meyer GR, De Milito A, De Santi M, de Souza W, De Tata V, De Zio D, Debnath J, Dechant R, Decuypere JP, Deegan S, Dehay B, Del Bello B, Del Re DP, Delage-Mourroux R, Delbridge LM, Deldicque L, Delorme-Axford E, Deng Y, Dengjel J, Denizot M, Dent P, Der CJ, Deretic V, Derrien B, Deutsch E, Devarenne TP, Devenish RJ, Di Bartolomeo S, Di Daniele N, Di Domenico F, Di Nardo A, Di Paola S, Di Pietro A, Di Renzo L, DiAntonio A, Diaz-Araya G, Diaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dickey CA, Dickson RC, Diederich M, Digard P, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding C, Ding WX, Ding Z, Dini L, Distler JH, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dmytruk K, Dobson RC, Doetsch V, Dokladny K, Dokudovskaya S, Donadelli M, Dong XC, Dong X, Dong Z, Donohue TM, Jr., Doran KS, D'Orazi G, Dorn GW, 2nd, Dosenko V, Dridi S, Drucker L, Du J, Du LL, Du L, du Toit A, Dua P, Duan L, Duann P, Dubey VK, Duchon MR, Duchosal MA, Duez H, Dugail I, Dumit VI, Duncan MC, Dunlop EA, Dunn WA, Jr., Dupont N, Dupuis L, Duran RV, Durcan TM, Duvezin-Caubet S, Duvvuri U, Eapen V, Ebrahimi-Fakhari D, Echard A, Eckhart L, Edelstein CL, Edinger AL, Eichinger L, Eisenberg T, Eisenberg-Lerner A, Eissa NT, El-Deiry WS, El-Khoury V, Elazar Z, Eldar-Finkelman H, Elliott CJ, Emanuele E, Emmenegger U, Engedal N, Engelbrecht AM, Engelender S, Enserink JM, Erdmann R, Erenpreisa J, Eri R, Eriksen JL, Erman A, Escalante R, Eskelinen EL, Espert L, Esteban-Martinez L, Evans TJ, Fabri M, Fabrias G, Fabrizi C, Facchiano A, Faergeman NJ, Faggioni A, Fairlie WD, Fan C, Fan D, Fan J, Fang S, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Faure M, Favier FB, Fearnhead H, Federici M, Fei E, Felizardo TC, Feng H, Feng Y, Feng Y, Ferguson TA, Fernandez AF, Fernandez-Barrena MG, Fernandez-Checa JC, Fernandez-Lopez A, Fernandez-Zapico ME, Feron O, Ferraro E, Ferreira-Halder CV, Fesus L, Feuer R, Fiesel FC, Filippi-Chiela EC, Filomeni G, Fimia GM, Fingert JH, Finkbeiner S, Finkel T, Fiorito F, Fisher PB, Flajolet M, Flamigni F, Florey O, Florio S, Floto RA, Folini M, Follo C, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fraldi A, Franco R, Francois A, Francois A, Frankel LB, Fraser ID, Frey N, Freyssenet DG, Frezza C, Friedman SL, Frigo DE, Fu D, Fuentes JM, Fueyo J, Fujitani Y, Fujiwara Y, Fujiya M, Fukuda M, Fulda S, Fusco C, Gabryel B, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galadari S, Galili G, Galindo I, Galindo MF, Galliciotti G, Galluzzi L, Galluzzi L, Galy V, Gammoh N, Gandy S, Ganesan AK, Ganesan S, Ganley IG, Gannage M, Gao FB, Gao

F, Gao JX, Garcia Nannig L, Garcia Vescovi E, Garcia-Macia M, Garcia-Ruiz C, Garg AD, Garg PK, Gargini R, Gassen NC, Gatica D, Gatti E, Gavard J, Gavathiotis E, Ge L, Ge P, Ge S, Gean PW, Gelmetti V, Genazzani AA, Geng J, Genschik P, Gerner L, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghigo E, Ghosh D, Giammarioli AM, Giampieri F, Giampietri C, Giatromanolaki A, Gibbings DJ, Gibellini L, Gibson SB, Ginet V, Giordano A, Giorgini F, Giovannetti E, Girardin SE, Gispert S, Giuliano S, Gladson CL, Glavic A, Gleave M, Godefroy N, Gogal RM, Jr., Gokulan K, Goldman GH, Goletti D, Goligorsky MS, Gomes AV, Gomes LC, Gomez H, Gomez-Manzano C, Gomez-Sanchez R, Goncalves DA, Goncu E, Gong Q, Gongora C, Gonzalez CB, Gonzalez-Alegre P, Gonzalez-Cabo P, Gonzalez-Polo RA, Goping IS, Gorbea C, Gorbunov NV, Goring DR, Gorman AM, Gorski SM, Goruppi S, Goto-Yamada S, Gotor C, Gottlieb RA, Gozes I, Gozuacik D, Graba Y, Graef M, Granato GE, Grant GD, Grant S, Gravina GL, Green DR, Greenhough A, Greenwood MT, Grimaldi B, Gros F, Grose C, Groulx JF, Gruber F, Grumati P, Grune T, Guan JL, Guan KL, Guerra B, Guillen C, Gulshan K, Gunst J, Guo C, Guo L, Guo M, Guo W, Guo XG, Gust AA, Gustafsson AB, Gutierrez E, Gutierrez MG, Gwak HS, Haas A, Haber JE, Hadano S, Hagedorn M, Hahn DR, Halayko AJ, Hamacher-Brady A, Hamada K, Hamai A, Hamann A, Hamasaki M, Hamer I, Hamid Q, Hammond EM, Han F, Han W, Handa JT, Hanover JA, Hansen M, Harada M, Harhaji-Trajkovic L, Harper JW, Harrath AH, Harris AL, Harris J, Hasler U, Hasselblatt P, Hasui K, Hawley RG, Hawley TS, He C, He CY, He F, He G, He RR, He XH, He YW, He YY, Heath JK, Hebert MJ, Heinzen RA, Helgason GV, Hensel M, Henske EP, Her C, Herman PK, Hernandez A, Hernandez C, Hernandez-Tiedra S, Hetz C, Hiesinger PR, Higaki K, Hilfiker S, Hill BG, Hill JA, Hill WD, Hino K, Hofius D, Hofman P, Hoglinger GU, Hohfeld J, Holz MK, Hong Y, Hood DA, Hoozemans JJ, Hoppe T, Hsu C, Hsu CY, Hsu LC, Hu D, Hu G, Hu HM, Hu H, Hu MC, Hu YC, Hu ZW, Hua F, Hua Y, Huang C, Huang HL, Huang KH, Huang KY, Huang S, Huang S, Huang WP, Huang YR, Huang Y, Huang Y, Huber TB, Huebbe P, Huh WK, Hulmi JJ, Hur GM, Hurley JH, Husak Z, Hussain SN, Hussain S, Hwang JJ, Hwang S, Hwang TI, Ichihara A, Imai Y, Imbriano C, Inomata M, Into T, Iovane V, Iovanna JL, Iozzo RV, Ip NY, Irazoqui JE, Iribarren P, Isaka Y, Isakovic AJ, Ischiropoulos H, Isenberg JS, Ishaq M, Ishida H, Ishii I, Ishmael JE, Isidoro C, Isobe K, Isono E, Issazadeh-Navikas S, Itahana K, Itakura E, Ivanov AI, Iyer AK, Izquierdo JM, Izumi Y, Izzo V, Jaattela M, Jaber N, Jackson DJ, Jackson WT, Jacob TG, Jacques TS, Jagannath C, Jain A, Jana NR, Jang BK, Jani A, Janji B, Jannig PR, Jansson PJ, Jean S, Jendrach M, Jeon JH, Jessen N, Jeung EB, Jia K, Jia L, Jiang H, Jiang H, Jiang L, Jiang T, Jiang X, Jiang X, Jiang X, Jiang Y, Jiang Y, Jimenez A, Jin C, Jin H, Jin L, Jin M, Jin S, Jinwal UK, Jo EK, Johansen T, Johnson DE, Johnson GV, Johnson JD, Jonasch E, Jones C, Joosten LA, Jordan J, Joseph AM, Joseph B, Joubert AM, Ju D, Ju J, Juan HF, Juenemann K, Juhasz G, Jung HS, Jung JU, Jung YK, Jungbluth H, Justice MJ, Jutten B, Kaakoush NO, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kaeffer B, Kagedal K, Kahana A, Kajimura S, Kakhlon O, Kalia M, Kalvakolanu DV, Kamada Y, Kambas K, Kaminsky VO, Kampinga HH, Kandouz M, Kang C, Kang R, Kang TC, Kanki T, Kanneganti TD, Kanno H, Kanthasamy AG, Kantorow M, Kaparakis-Liaskos M, Kapuy O, Karantza V, Karim MR, Karmakar P, Kaser A, Kaushik S, Kawula T, Kaynar AM, Ke PY, Ke ZJ, Kehrl JH, Keller KE, Kemper JK, Kenworthy AK, Kepp O, Kern A, Kesari S, Kessel D, Ketteler R, Kettelhut Ido C, Khambu B, Khan MM, Khandelwal VK, Khare S, Kiang JG, Kiger AA, Kihara A, Kim AL, Kim CH, Kim DR, Kim DH, Kim EK, Kim HY, Kim HR, Kim JS, Kim JH, Kim JC, Kim JH, Kim KW, Kim MD, Kim MM, Kim PK, Kim SW, Kim SY, Kim YS, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, Kimura T, King JS, Kirkegaard K, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kishi S, Kitajima Y, Kitamoto K, Kitaoka Y, Kitazato K, Kley RA, Klimecki WT, Klinkenberg M, Klucken

J, Knaevelsrud H, Knecht E, Knuppertz L, Ko JL, Kobayashi S, Koch JC, Koechlin-Ramonatxo C, Koenig U, Koh YH, Kohler K, Kohlwein SD, Koike M, Komatsu M, Kominami E, Kong D, Kong HJ, Konstantakou EG, Kopp BT, Korcsmaros T, Korhonen L, Korolchuk VI, Koshkina NV, Kou Y, Koukourakis MI, Koumenis C, Kovacs AL, Kovacs T, Kovacs WJ, Koya D, Kraft C, Krainc D, Kramer H, Kravic-Stevovic T, Krek W, Kretz-Remy C, Krick R, Krishnamurthy M, Kriston-Vizi J, Kroemer G, Krueger MC, Kruger R, Ktistakis NT, Kuchitsu K, Kuhn C, Kumar AP, Kumar A, Kumar A, Kumar D, Kumar D, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung HJ, Kuno A, Kuo SH, Kuret J, Kurz T, Kwok T, Kwon TK, Kwon YT, Kyrmizi I, La Spada AR, Lafont F, Lahm T, Lakkaraju A, Lam T, Lamark T, Lancel S, Landowski TH, Lane DJ, Lane JD, Lanzi C, Lapaquette P, Lapierre LR, Laporte J, Laukkarinen J, Laurie GW, Lavandero S, Lavie L, LaVoie MJ, Law BY, Law HK, Law KB, Layfield R, Lazo PA, Le Cam L, Le Roch KG, Le Stunff H, Leardkamolkarn V, Lecuit M, Lee BH, Lee CH, Lee EF, Lee GM, Lee HJ, Lee H, Lee JK, Lee J, Lee JH, Lee JH, Lee M, Lee MS, Lee PJ, Lee SW, Lee SJ, Lee SJ, Lee SY, Lee SH, Lee SS, Lee SJ, Lee S, Lee YR, Lee YJ, Lee YH, Leeuwenburgh C, Lefort S, Legouis R, Lei J, Lei QY, Leib DA, Leibowitz G, Lekli I, Lemaire SD, Lemasters JJ, Lemberg MK, Lemoine A, Leng S, Lenz G, Lenzi P, Lerman LO, Lettieri Barbato D, Leu JI, Leung HY, Levine B, Lewis PA, Lezoualc'h F, Li C, Li F, Li FJ, Li J, Li K, Li L, Li M, Li M, Li Q, Li R, Li S, Li W, Li W, Li X, Li Y, Lian J, Liang C, Liang Q, Liao Y, Liberal J, Liberski PP, Lie P, Lieberman AP, Lim HJ, Lim KL, Lim K, Lima RT, Lin CS, Lin CF, Lin F, Lin F, Lin FC, Lin K, Lin KH, Lin PH, Lin T, Lin WW, Lin YS, Lin Y, Linden R, Lindholm D, Lindqvist LM, Lingor P, Linkermann A, Liotta LA, Lipinski MM, Lira VA, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu C, Liu CF, Liu F, Liu HJ, Liu J, Liu JJ, Liu JL, Liu K, Liu L, Liu L, Liu Q, Liu RY, Liu S, Liu S, Liu W, Liu XD, Liu X, Liu XH, Liu X, Liu X, Liu X, Liu Y, Liu Y, Liu Z, Liu Z, Liuzzi JP, Lizard G, Ljujic M, Lodhi IJ, Logue SE, Lokeshwar BL, Long YC, Lonial S, Loos B, Lopez-Otin C, Lopez-Vicario C, Lorente M, Lorenzi PL, Lorincz P, Los M, Lotze MT, Lovat PE, Lu B, Lu B, Lu J, Lu Q, Lu SM, Lu S, Lu Y, Luciano F, Luckhart S, Lucocq JM, Ludovico P, Lugea A, Lukacs NW, Lum JJ, Lund AH, Luo H, Luo J, Luo S, Luparello C, Lyons T, Ma J, Ma Y, Ma Y, Ma Z, Machado J, Machado-Santelli GM, Macian F, MacIntosh GC, MacKeigan JP, Macleod KF, MacMicking JD, MacMillan-Crow LA, Madeo F, Madesh M, Madrigal-Matute J, Maeda A, Maeda T, Maegawa G, Maellaro E, Maes H, Magarinos M, Maiese K, Maiti TK, Maiuri L, Maiuri MC, Maki CG, Malli R, Malorni W, Maloyan A, Mami-Chouaib F, Man N, Mancias JD, Mandelkow EM, Mandell MA, Manfredi AA, Manie SN, Manzoni C, Mao K, Mao Z, Mao ZW, Marambaud P, Marconi AM, Marelja Z, Marfe G, Margeta M, Margittai E, Mari M, Mariani FV, Marin C, Marinelli S, Marino G, Markovic I, Marquez R, Martelli AM, Martens S, Martin KR, Martin SJ, Martin S, Martin-Acebes MA, Martin-Sanz P, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez J, Martinez-Lopez N, Martinez-Outschoorn U, Martinez-Velazquez M, Martinez-Vicente M, Martins WK, Mashima H, Mastrianni JA, Matarese G, Matarrese P, Mateo R, Matoba S, Matsumoto N, Matsushita T, Matsuura A, Matsuzawa T, Mattson MP, Matus S, Maugeri N, Mauvezin C, Mayer A, Maysinger D, Mazzolini GD, McBrayer MK, McCall K, McCormick C, McInerney GM, McIver SC, McKenna S, McMahan JJ, McNeish IA, Mehta-Grigoriou F, Medema JP, Medina DL, Megyeri K, Mehrpour M, Mehta JL, Mei Y, Meier UC, Meijer AJ, Melendez A, Melino G, Melino S, de Melo EJ, Mena MA, Meneghini MD, Menendez JA, Menezes R, Meng L, Meng LH, Meng S, Menghini R, Menko AS, Menna-Barreto RF, Menon MB, Meraz-Rios MA, Merla G, Merlini L, Merlot AM, Meryk A, Meschini S, Meyer JN, Mi MT, Miao CY, Micale L, Michaeli S, Michiels C, Migliaccio AR, Mihailidou AS, Mijaljica D, Mikoshiba K, Milan E, Miller-Fleming L, Mills GB, Mills IG, Minakaki G, Minassian BA, Ming XF, Minibayeva F, Minina EA,

Mintern JD, Minucci S, Miranda-Vizuete A, Mitchell CH, Miyamoto S, Miyazawa K, Mizushima N, Mnich K, Mograbi B, Mohseni S, Moita LF, Molinari M, Molinari M, Moller AB, Mollereau B, Mollinedo F, Mongillo M, Monick MM, Montagnaro S, Montell C, Moore DJ, Moore MN, Mora-Rodriguez R, Moreira PI, Morel E, Morelli MB, Moreno S, Morgan MJ, Moris A, Moriyasu Y, Morrison JL, Morrison LA, Morselli E, Moscat J, Moseley PL, Mostowy S, Motori E, Mottet D, Mottram JC, Moussa CE, Mpakou VE, Mukhtar H, Mulcahy Levy JM, Muller S, Munoz-Moreno R, Munoz-Pinedo C, Munz C, Murphy ME, Murray JT, Murthy A, Mysorekar IU, Nabi IR, Nabissi M, Nader GA, Nagahara Y, Nagai Y, Nagata K, Nagelkerke A, Nagy P, Naidu SR, Nair S, Nakano H, Nakatogawa H, Nanjundan M, Napolitano G, Naqvi NI, Nardacci R, Narendra DP, Narita M, Nascimbeni AC, Natarajan R, Navegantes LC, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nazarko VY, Neill T, Neri LM, Netea MG, Netea-Maier RT, Neves BM, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HT, Nguyen HP, Nicot AS, Nilsen H, Nilsson P, Nishimura M, Nishino I, Niso-Santano M, Niu H, Nixon RA, Njar VC, Noda T, Noegel AA, Nolte EM, Norberg E, Norga KK, Noureini SK, Notomi S, Notterpek L, Nowikovsky K, Nukina N, Nurnberger T, O'Donnell VB, O'Donovan T, O'Dwyer PJ, Oehme I, Oeste CL, Ogawa M, Ogretmen B, Ogura Y, Oh YJ, Ohmuraya M, Ohshima T, Ojha R, Okamoto K, Okazaki T, Oliver FJ, Ollinger K, Olsson S, Orban DP, Ordonez P, Orhon I, Orosz L, O'Rourke EJ, Orozco H, Ortega AL, Ortona E, Osellame LD, Oshima J, Oshima S, Osiewacz HD, Otomo T, Otsu K, Ou JH, Outeiro TF, Ouyang DY, Ouyang H, Overholtzer M, Ozbun MA, Ozdinler PH, Ozpolat B, Pacelli C, Paganetti P, Page G, Pages G, Pagnini U, Pajak B, Pak SC, Pakos-Zebrucka K, Pakpour N, Palkova Z, Palladino F, Pallauf K, Pallet N, Palmieri M, Paludan SR, Palumbo C, Palumbo S, Pampliega O, Pan H, Pan W, Panaretakis T, Pandey A, Pantazopoulou A, Papackova Z, Papademetrio DL, Papassideri I, Papini A, Parajuli N, Pardo J, Parekh VV, Parenti G, Park JI, Park J, Park OK, Parker R, Parlato R, Parys JB, Parzych KR, Pasquet JM, Pasquier B, Pasumarthi KB, Patschan D, Patterson C, Pattingre S, Pattison S, Pause A, Pavenstadt H, Pavone F, Pedrozo Z, Pena FJ, Penalva MA, Pende M, Peng J, Penna F, Penninger JM, Pensalfini A, Pepe S, Pereira GJ, Pereira PC, Perez-de la Cruz V, Perez-Perez ME, Perez-Rodriguez D, Perez-Sala D, Perier C, Perl A, Perlmutter DH, Perrotta I, Pervaiz S, Pesonen M, Pessin JE, Peters GJ, Petersen M, Petrache I, Petrof BJ, Petrovski G, Phang JM, Piacentini M, Pierdominici M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pietrocola F, Pimentel-Muinos FX, Pinar M, Pineda B, Pinkas-Kramarski R, Pinti M, Pinton P, Piperdi B, Piret JM, Plataniias LC, Platta HW, Plowey ED, Poggeler S, Poirot M, Polcic P, Poletti A, Poon AH, Popelka H, Popova B, Poprawa I, Poulouse SM, Poulton J, Powers SK, Powers T, Pozuelo-Rubio M, Prak K, Prange R, Prescott M, Priault M, Prince S, Proia RL, Proikas-Cezanne T, Prokisch H, Promponas VJ, Przyklenk K, Puertollano R, Pugazhenth S, Puglielli L, Pujol A, Puyal J, Pyeon D, Qi X, Qian WB, Qin ZH, Qiu Y, Qu Z, Quadrilatero J, Quinn F, Raben N, Rabinowich H, Radogna F, Ragusa MJ, Rahmani M, Raina K, Ramanadham S, Ramesh R, Rami A, Randall-Demllo S, Randow F, Rao H, Rao VA, Rasmussen BB, Rasse TM, Ratovitski EA, Rautou PE, Ray SK, Razani B, Reed BH, Reggiori F, Rehm M, Reichert AS, Rein T, Reiner DJ, Reits E, Ren J, Ren X, Renna M, Reusch JE, Revuelta JL, Reyes L, Rezaie AR, Richards RI, Richardson DR, Richetta C, Riehle MA, Rihn BH, Rikihisa Y, Riley BE, Rimbach G, Rippon MR, Ritis K, Rizzi F, Rizzo E, Roach PJ, Robbins J, Roberge M, Roca G, Roccheri MC, Rocha S, Rodrigues CM, Rodriguez CI, de Cordoba SR, Rodriguez-Muela N, Roelofs J, Rogov VV, Rohn TT, Rohrer B, Romanelli D, Romani L, Romano PS, Roncero MI, Rosa JL, Rosello A, Rosen KV, Rosenstiel P, Rost-Roszkowska M, Roth KA, Roue G, Rouis M, Rouschop KM, Ruan DT, Ruano D, Rubinsztein DC, Rucker EB, 3rd, Rudich A, Rudolf E, Rudolf R, Ruegg MA, Ruiz-Roldan C, Ruparelia AA, Rusmini P, Russ DW, Russo GL, Russo G, Russo R, Rusten

TE, Ryabovol V, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sacher M, Sachse C, Sack MN, Sadoshima J, Saftig P, Sagi-Eisenberg R, Sahni S, Saikumar P, Saito T, Saitoh T, Sakakura K, Sakoh-Nakatogawa M, Sakuraba Y, Salazar-Roa M, Salomoni P, Saluja AK, Salvaterra PM, Salvioli R, Samali A, Sanchez AM, Sanchez-Alcazar JA, Sanchez-Prieto R, Sandri M, Sanjuan MA, Santaguida S, Santambrogio L, Santoni G, Dos Santos CN, Saran S, Sardiello M, Sargent G, Sarkar P, Sarkar S, Sarrias MR, Sarwal MM, Sasakawa C, Sasaki M, Sass M, Sato K, Sato M, Satriano J, Savaraj N, Saveljeva S, Schaefer L, Schaible UE, Scharl M, Schatzl HM, Schekman R, Scheper W, Schiavi A, Schipper HM, Schmeisser H, Schmidt J, Schmitz I, Schneider BE, Schneider EM, Schneider JL, Schon EA, Schonenberger MJ, Schonthal AH, Schorderet DF, Schroder B, Schuck S, Schulze RJ, Schwarten M, Schwarz TL, Sciarretta S, Scotto K, Scovassi AI, Screatton RA, Screen M, Seca H, Sedej S, Segatori L, Segev N, Seglen PO, Segui-Simarro JM, Segura-Aguilar J, Seki E, Sell C, Seilliez I, Semenkovich CF, Semenza GL, Sen U, Serra AL, Serrano-Puebla A, Sesaki H, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shajahan-Haq AN, Shapiro IM, Sharma S, She H, Shen CK, Shen CC, Shen HM, Shen S, Shen W, Sheng R, Sheng X, Sheng ZH, Shepherd TG, Shi J, Shi Q, Shi Q, Shi Y, Shibusaki S, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh JJ, Shih CM, Shimada Y, Shimizu S, Shin DW, Shinohara ML, Shintani M, Shintani T, Shioi T, Shirabe K, Shiri-Sverdlov R, Shirihai O, Shore GC, Shu CW, Shukla D, Sibirny AA, Sica V, Sigurdson CJ, Sigurdsson EM, Sijwali PS, Sikorska B, Silveira WA, Silvente-Poirot S, Silverman GA, Simak J, Simmet T, Simon AK, Simon HU, Simone C, Simons M, Simonsen A, Singh R, Singh SV, Singh SK, Sinha D, Sinha S, Sinicrope FA, Sirko A, Sirohi K, Sishi BJ, Sittler A, Siu PM, Sivridis E, Skwarska A, Slack R, Slaninova I, Slavov N, Smaili SS, Smalley KS, Smith DR, Soenen SJ, Soleimanpour SA, Solhaug A, Somasundaram K, Son JH, Sonawane A, Song C, Song F, Song HK, Song JX, Song W, Soo KY, Sood AK, Soong TW, Soontornniyomkij V, Sorice M, Sotgia F, Soto-Pantoja DR, Sotthibundhu A, Sousa MJ, Spaink HP, Span PN, Spang A, Sparks JD, Speck PG, Spector SA, Spies CD, Springer W, Clair DS, Stacchiotti A, Staels B, Stang MT, Starczynowski DT, Starokadomskyy P, Steegborn C, Steele JW, Stefanis L, Steffan J, Stellrecht CM, Stenmark H, Stepkowski TM, Stern ST, Stevens C, Stockwell BR, Stoka V, Storchova Z, Stork B, Stratoulis V, Stravopodis DJ, Strnad P, Strohecker AM, Strom AL, Stromhaug P, Stulik J, Su YX, Su Z, Subauste CS, Subramaniam S, Sue CM, Suh SW, Sui X, Sukseree S, Sulzer D, Sun FL, Sun J, Sun J, Sun SY, Sun Y, Sun Y, Sun Y, Sundaramoorthy V, Sung J, Suzuki H, Suzuki K, Suzuki N, Suzuki T, Suzuki YJ, Swanson MS, Swanton C, Sward K, Swarup G, Sweeney ST, Sylvester PW, Szatmari Z, Szegezdi E, Szlosarek PW, Taegtmeier H, Tafani M, Taillebourg E, Tait SW, Takacs-Vellai K, Takahashi Y, Takats S, Takemura G, Takigawa N, Talbot NJ, Tamagno E, Tamburini J, Tan CP, Tan L, Tan ML, Tan M, Tan YJ, Tanaka K, Tanaka M, Tang D, Tang D, Tang G, Tanida I, Tanji K, Tannous BA, Tapia JA, Tasset-Cuevas I, Tatar M, Tavassoly I, Tavernarakis N, Taylor A, Taylor GS, Taylor GA, Taylor JP, Taylor MJ, Tchetina EV, Tee AR, Teixeira-Clerc F, Telang S, Tencomnao T, Teng BB, Teng RJ, Terro F, Tettamanti G, Theiss AL, Theron AE, Thomas KJ, Thome MP, Thomes PG, Thorburn A, Thorner J, Thum T, Thumm M, Thurston TL, Tian L, Till A, Ting JP, Titorenko VI, Toker L, Toldo S, Tooze SA, Topisirovic I, Torgersen ML, Torosantucci L, Torriglia A, Torrisi MR, Tournier C, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Triola G, Tripathi DN, Trisciuglio D, Troncoso R, Trougakos IP, Truttman AC, Tsai KJ, Tschan MP, Tseng YH, Tsukuba T, Tsung A, Tsvetkov AS, Tu S, Tuan HY, Tucci M, Tumbarello DA, Turk B, Turk V, Turner RF, Tveita AA, Tyagi SC, Ubukata M, Uchiyama Y, Udelnow A, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Underwood BR, Ungermann C, Ureshino RP, Ushioda R, Uversky VN, Uzcategui NL, Vaccari T, Vaccaro MI, Vachova L, Vakifahmetoglu-Norberg H, Valdor R, Valente EM, Vallette

- F, Valverde AM, Van den Berghe G, Van Den Bosch L, van den Brink GR, van der Goot FG, van der Klei IJ, van der Laan LJ, van Doorn WG, van Egmond M, van Golen KL, Van Kaer L, van Lookeren Campagne M, Vandenabeele P, Vandenberghe W, Vanhorebeek I, Varela-Nieto I, Vasconcelos MH, Vasko R, Vavvas DG, Vega-Naredo I, Velasco G, Velentzas AD, Velentzas PD, Vellai T, Vellenga E, Vendelbo MH, Venkatachalam K, Ventura N, Ventura S, Veras PS, Verdier M, Vertessy BG, Viale A, Vidal M, Vieira HL, Vierstra RD, Vigneswaran N, Vij N, Vila M, Villar M, Villar VH, Villarroya J, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Vitale G, Vogl DT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, von Schwarzenberg K, Voth DE, Vouret-Craviari V, Vuori K, Vyas JM, Waeber C, Walker CL, Walker MJ, Walter J, Wan L, Wan X, Wang B, Wang C, Wang CY, Wang C, Wang C, Wang C, Wang D, Wang F, Wang F, Wang G, Wang HJ, Wang H, Wang HG, Wang H, Wang HD, Wang J, Wang J, Wang M, Wang MQ, Wang PY, Wang P, Wang RC, Wang S, Wang TF, Wang X, Wang XJ, Wang XW, Wang X, Wang X, Wang Y, Wang Y, Wang Y, Wang YJ, Wang Y, Wang Y, Wang YT, Wang Y, Wang ZN, Wappner P, Ward C, Ward DM, Warnes G, Watada H, Watanabe Y, Watase K, Weaver TE, Weekes CD, Wei J, Weide T, Wehl CC, Weindl G, Weis SN, Wen L, Wen X, Wen Y, Westermann B, Weyand CM, White AR, White E, Whitton JL, Whitworth AJ, Wiels J, Wild F, Wildenberg ME, Wileman T, Wilkinson DS, Wilkinson S, Willbold D, Williams C, Williams K, Williamson PR, Winklhofer KF, Witkin SS, Wohlgemuth SE, Wollert T, Wolvetang EJ, Wong E, Wong GW, Wong RW, Wong VK, Woodcock EA, Wright KL, Wu C, Wu D, Wu GS, Wu J, Wu J, Wu M, Wu M, Wu S, Wu WK, Wu Y, Wu Z, Xavier CP, Xavier RJ, Xia GX, Xia T, Xia W, Xia Y, Xiao H, Xiao J, Xiao S, Xiao W, Xie CM, Xie Z, Xie Z, Xilouri M, Xiong Y, Xu C, Xu C, Xu F, Xu H, Xu H, Xu J, Xu J, Xu J, Xu L, Xu X, Xu Y, Xu Y, Xu ZX, Xu Z, Xue Y, Yamada T, Yamamoto A, Yamanaka K, Yamashina S, Yamashiro S, Yan B, Yan B, Yan X, Yan Z, Yanagi Y, Yang DS, Yang JM, Yang L, Yang M, Yang PM, Yang P, Yang Q, Yang W, Yang WY, Yang X, Yang Y, Yang Y, Yang Z, Yang Z, Yao MC, Yao PJ, Yao X, Yao Z, Yao Z, Yasui LS, Ye M, Yedvobnick B, Yeganeh B, Yeh ES, Yeyati PL, Yi F, Yi L, Yin XM, Yip CK, Yoo YM, Yoo YH, Yoon SY, Yoshida K, Yoshimori T, Young KH, Yu H, Yu JJ, Yu JT, Yu J, Yu L, Yu WH, Yu XF, Yu Z, Yuan J, Yuan ZM, Yue BY, Yue J, Yue Z, Zacks DN, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zaglia T, Zakeri Z, Zecchini V, Zeng J, Zeng M, Zeng Q, Zervos AS, Zhang DD, Zhang F, Zhang G, Zhang GC, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang H, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang J, Zhang JP, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang L, Zhang MY, Zhang X, Zhang XD, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Zhao M, Zhao WL, Zhao X, Zhao YG, Zhao Y, Zhao Y, Zhao YX, Zhao Z, Zhao ZJ, Zheng D, Zheng XL, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou GZ, Zhou G, Zhou H, Zhou SF, Zhou XJ, Zhu H, Zhu H, Zhu WG, Zhu W, Zhu XF, Zhu Y, Zhuang SM, Zhuang X, Ziparo E, Zois CE, Zoladek T, Zong WX, Zorzano A, Zughair SM. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12 (1):1-222.
- Kothari A, Hittelman WN, Chambers TC. 2016. Cell Cycle-Dependent Mechanisms Underlie Vincristine-Induced Death of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Res*, 76 (12):3553-3561.
- Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, Mitrakas A, Gatter KC, Harris AL. 2015. Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 10 (9):e0137675.
- Kraywinkel K, Spix C. 2017. Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Der Onkologe*, 23 (7):499-503.
- Lahusen TJ, Deng CX. 2015. SRT1720 induces lysosomal-dependent cell death of breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 14 (1):183-192.

- Lamark T, Svenning S, Johansen T. 2017. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem*, 61 (6):609-624.
- Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira, II, Bishop AJ, Motoyama N, Cao L, Finkel T. 2012. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science*, 336 (6078):225-228.
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (9):3374-3379.
- Lee SY, Jang C, Lee KA. 2014. Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy. *Dev Reprod*, 18 (1):65-71.
- Lee YK, Lee JA. 2016. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*, 49 (8):424-430.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1):27-42.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. 2017. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*, 36 (1):52.
- Li Z, Ji X, Wang D, Liu J, Zhang X. 2016. Autophagic flux is highly active in early mitosis and differentially regulated throughout the cell cycle. *Oncotarget*, 7 (26):39705-39718.
- Liu Q, Shi X, Zhou X, Wang D, Wang L, Li C. 2014. Effect of autophagy inhibition on cell viability and cell cycle progression in MDAMB231 human breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 10 (2):625-630.
- Liu S, Cai X, Xia L, Jiang C, Chen P, Wang X, Zhang B, Zhao HY. 2018. Chloroquine exerts antitumor effects on NB4 acute promyelocytic leukemia cells and functions synergistically with arsenic trioxide. *Oncol Lett*, 15 (2):2024-2030.
- Liu Y, Levine B. 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*, 22 (3):367-376.
- Loukil A, Zonca M, Rebouissou C, Baldin V, Coux O, Biard-Piechaczyk M, Blanchard JM, Peter M. 2014. High-resolution live-cell imaging reveals novel cyclin A2 degradation foci involving autophagy. *J Cell Sci*, 127 (Pt 10):2145-2150.
- Luo G, Jian Z, Zhu Y, Zhu Y, Chen B, Ma R, Tang F, Xiao Y. 2019. Sirt1 promotes autophagy and inhibits apoptosis to protect cardiomyocytes from hypoxic stress. *Int J Mol Med*.
- Manley PW, Caravatti G, Furet P, Roesel J, Tran P, Wagner T, Wartmann M. 2018. Comparison of the kinase profile of midostaurin (Rydapt(R)) with that of its predominant metabolites. *Biochemistry*.
- Martin BT, Strebhardt K. 2006. Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle*, 5 (24):2881-2885.
- Martinez-Cruzado L, Tornin J, Rodriguez A, Santos L, Allonca E, Fernandez-Garcia MT, Astudillo A, Garcia-Pedrero JM, Rodriguez R. 2017. Trabectedin and Camptothecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models. *Neoplasia*, 19 (6):460-470.
- Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R, Simon HU. 2013. ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nat Commun*, 4:2130.
- Mathiassen SG, De Zio D, Cecconi F. 2017. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol*, 7:51.
- Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14 (8):1435-1455.
- Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. 2012. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*, 8 (2):200-212.

- Mizushima N, Yoshimori T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3 (6):542-545.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140 (3):313-326.
- Moassass F, Wafa A, Liehr T, Al-Ablog A, Al Achkar W. 2018. Down syndrome associated childhood myeloid leukemia with yet unreported acquired chromosomal abnormalities and a new potential adverse marker: dup(1)(q25q44). *Mol Cytogenet*, 11:22.
- Monastyrska I, Rieter E, Kliensky DJ, Reggiori F. 2009. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 84 (3):431-448.
- Moniz LS, Stambolic V. 2011. Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol Cell Biol*, 31 (1):30-42.
- Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *Excli j*, 14:95-108.
- Montemurro C, Vadrevu S, Gurlo T, Butler AE, Vongbunyong KE, Petcherski A, Shirihai OS, Satin LS, Braas D, Butler PC, Tudzarova S. 2017. Cell cycle-related metabolism and mitochondrial dynamics in a replication-competent pancreatic beta-cell line. *Cell Cycle*, 16 (21):2086-2099.
- Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. 2011. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell*, 146 (2):303-317.
- Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen SE, Kranc KR, Simon AK. 2011. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*, 208 (3):455-467.
- Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. 2016. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*, 36:1619.
- Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. 2012. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 30 (36):4515-4523.
- Nicholas D, Proctor EA, Raval FM, Ip BC, Habib C, Ritou E, Grammatopoulos TN, Steenkamp D, Dooms H, Apovian CM, Lauffenburger DA, Nikolajczyk BS. 2017. Advances in the quantification of mitochondrial function in primary human immune cells through extracellular flux analysis. *PLoS One*, 12 (2):e0170975.
- Othus M, Kantarjian H, Petersdorf S, Ravandi F, Godwin J, Cortes J, Pierce S, Erba H, Faderl S, Appelbaum FR, Estey E. 2014. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia*, 28 (2):289-292.
- Parzych KR, Kliensky DJ. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20 (3):460-473.
- Pasquier B. 2016. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci*, 73 (5):985-1001.
- Pathania AS, Guru SK, Kumar S, Kumar A, Ahmad M, Bhushan S, Sharma PR, Mahajan P, Shah BA, Sharma S, Nargotra A, Vishwakarma R, Korkaya H, Malik F. 2016. Interplay between cell cycle and autophagy induced by boswellic acid analog. *Sci Rep*, 6:33146.
- Pengo N, Agrotis A, Prak K, Jones J, Ketteler R. 2017. A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun*, 8 (1):294.
- Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, Ross KN, Fitamant J, Boukhali M, Lengrand J, Deshpande V, Selig MK, Ferrone CR, Settleman J, Stephanopoulos G, Dyson NJ, Zoncu R, Ramaswamy S, Haas W, Bardeesy N. 2015. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*, 524 (7565):361-365.

- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. 2013. Diverse autophagosomal membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, 154 (6):1285-1299.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 112 (12):1809-1820.
- Rabinowitz JD, White E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science*, 330 (6009):1344-1348.
- Rambold AS, Lippincott-Schwartz J. 2011. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*, 10 (23):4032-4038.
- Redmann M, Benavides GA, Berryhill TF, Wani WY, Ouyang X, Johnson MS, Ravi S, Barnes S, Darley-Usmar VM, Zhang J. 2017. Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol*, 11:73-81.
- Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. 2017. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res*, 77 (23):6480-6488.
- Satyanarayana A, Kaldis P. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28 (33):2925-2939.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo j*, 26 (7):1749-1760.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3 (6):1101-1108.
- Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM, Estey E. 2009. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 113 (1):28-36.
- Sherr CJ, Bartek J. 2017. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. *Annual Review of Cancer Biology*, 1 (1):41-57.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6 (12):1221-1228.
- Slobodkin MR, Elazar Z. 2013. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*, 55:51-64.
- Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. 2003. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 24 (3):139-145.
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H. 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4:e838.
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuauling HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mule JJ, Pledger WJ, Wang HG. 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 9 (10):1142-1151.
- Tasdemir E, Maiuri MC, Tajeddine N, Vitale I, Criollo A, Vicencio JM, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. 2007. Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy. *Cell Cycle*, 6 (18):2263-2267.
- Thomas HE, Zhang Y, Stefely JA, Veiga SR, Thomas G, Kozma SC, Mercer CA. 2018. Mitochondrial Complex I Activity Is Required for Maximal Autophagy. *Cell Rep*, 24 (9):2404-2417.e2408.
- van der Vaart A, Griffith J, Reggiori F. 2010. Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 21 (13):2270-2284.
- van der Windt GJ, Chang CH, Pearce EL. 2016. Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer. *Curr Protoc Immunol*, 113:3.16b.11-13.16b.14.

- Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. 2017. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168 (4):657-669.
- Verbaanderd C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, Agostinis P, Bouche G. 2017. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedicalsecience*, 11:781.
- Viana R, Aguado C, Esteban I, Moreno D, Viollet B, Knecht E, Sanz P. 2008. Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function. *Biochem Biophys Res Commun*, 369 (3):964-968.
- Villalba JM, Alcain FJ. 2012. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*, 38 (5):349-359.
- Wang Z, Fan M, Candas D, Zhang TQ, Qin L, Eldridge A, Wachsmann-Hogiu S, Ahmed KM, Chromy BA, Nantajit D, Duru N, He F, Chen M, Finkel T, Weinstein LS, Li JJ. 2014. Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Dev Cell*, 29 (2):217-232.
- Watts J, Nimer S. 2018. Recent advances in the understanding and treatment of acute myeloid leukemia. *F1000Res*, 7.
- Wilde L, Tanson K, Curry J, Martinez-Outschoorn U. 2018. Autophagy in cancer: a complex relationship. *Biochem J*, 475 (11):1939-1954.
- Wojcik K, Dobrucki JW. 2008. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells--influence on chromatin organization and histone-DNA interactions. *Cytometry A*, 73 (6):555-562.
- Woods D, Turchi JJ. 2013. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther*, 14 (5):379-389.
- Wu JJ, Quijano C, Chen E, Liu H, Cao L, Fergusson MM, Rovira, II, Gutkind S, Daniels MP, Komatsu M, Finkel T. 2009. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)*, 1 (4):425-437.
- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. 2010. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 285 (14):10850-10861.
- Xie BS, Zhao HC, Yao SK, Zhuo DX, Jin B, Lv DC, Wu CL, Ma DL, Gao C, Shu XM, Ai ZL. 2011. Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. *Int J Mol Med*, 27 (4):599-606.
- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22 (2):124-131.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*, 17 (12):5094-5104.
- Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3 (12):588-596.
- Yonekawa T, Thorburn A. 2013. Autophagy and cell death. *Essays Biochem*, 55:105-117.
- You SY, Park YS, Jeon HJ, Cho DH, Jeon HB, Kim SH, Chang JW, Kim JS, Oh JS. 2016. Beclin-1 knockdown shows abscission failure but not autophagy defect during oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*, 15 (12):1611-1619.
- Yu H, Yin S, Zhou S, Shao Y, Sun J, Pang X, Han L, Zhang Y, Gao X, Jin C, Qiu Y, Wang T. 2018. Magnolin promotes autophagy and cell cycle arrest via blocking LIF/Stat3/Mcl-1 axis in human colorectal cancers. *Cell Death & Disease*, 9 (6):702.
- Yun CW, Lee SH. 2018. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*, 19 (11).
- Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. 2019. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics*, 9 (1):104-125.

8.4 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die am Gelingen dieser entscheidend beteiligt waren.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. James Beck für die Überlassung dieses interessanten Themas, die regelmäßigen Besprechungen und für die stetige Unterstützung auf fachlicher und persönlicher Ebene. Er hat nicht nur maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, vielmehr hat er mir auch als Mentor wertvolle Erkenntnisse vermittelt.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken. Dr. Jürgen Sonnemann gilt großer Dank. Er stand mir unermüdlich mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite und hat die Zeit im Labor zu einer fachlich wie menschlich absolut bereichernden Zeit gemacht hat.

Sabine Becker möchte ich danken für die ausgezeichnete Einarbeitung und Betreuung im Labor. Sie ermöglichte mir mit ihrer jahrelangen Erfahrung ein komplikationsloses Durchführen der Experimente.

Besonderer Dank gilt Dr. Christian Marx vom Fritz-Lippmann-Institut Jena (FLI), Katrin Schubert und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zhao-Qi Wang für die Kooperation, die sehr gute Betreuung und die gemeinsame Autophagie-Forschung.

Ebenfalls danken möchte ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung während meines Forschungssemesters.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwestern für ihre bedingungslose Unterstützung.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. J. F. Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Dr. Christian Marx und Sabine Becker.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den