

**Etablierung eines Zellsortierverfahrens auf Basis der
autophagozytotischen Aktivität: Interaktion der Autophagie mit dem
Zellzyklus und der Chemosensibilität in Leukämiezellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marie Delphine Just

geboren am 26. Oktober 1996 in Hamburg

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

1. Prof. Dr. James F. Beck, Jena

2. Prof. Dr. Udo R. Markert, Jena

3. Prof. Dr. Paul-Gerhardt Schlegel, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 9. August 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	8
2 Einleitung.....	10
2.1 Autophagie.....	10
2.1.1 Autophagiemechanismus	12
2.1.2 Ausblick	15
2.1.3 Pharmakologische Autophagie-Modulation in den durchgeführten Experimenten mit JURKAT-Zellen	16
2.1.4 Detektion des Autophagie-Niveaus in Zellkulturen.....	17
2.2 Zellzyklus	19
2.2.1 Ablauf des Zellzyklus.....	19
2.2.2 Regulation des Zellzyklus	20
2.3 Autophagie und Zellzyklus.....	21
2.3.1 Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Autophagie- Aktivität.....	21
2.4 Autophagie und Tumorentstehung bzw. -progression	22
2.4.1 Autophagiemodulation in der Krebstherapie	25
2.5 Akute lymphatische Leukämie	25
2.5.1 Chemotherapeutika in den durchgeführten Experimenten mit JURKAT-Zellen.....	27
3 Zielstellung der Arbeit	28
4 Methodik.....	29
4.1 Material.....	29
4.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte.....	29
4.1.2 Reagenzien und Kits.....	30
4.1.3 Zelllinie	32
4.2 Versuchsdurchführung.....	32
4.2.1 Zellkultivierung.....	32
4.2.2 Durchflusszytometrie	36
4.2.3 Zellsortierung und durchflusszytometrische Messung.....	39
4.2.4 Etablierung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie- Niveau mittels Cyto-ID	40
4.2.5 Zellzyklusanalyse der sortierten Fraktionen mittels Durchflusszytometrie	43
4.2.6 Genexpressionsanalyse der sortierten Fraktionen mittels <i>real-time</i> RT-PCR.....	44
4.2.7 Graphische Darstellung und Statistische Analyse der Daten.....	49

5	Ergebnisse.....	50
5.1	Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID.....	50
5.1.1	Zytotoxizität von Cyto-ID bei Langzeitinkubation.....	50
5.1.2	Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz	51
5.1.3	Durchflusszytometrische Messung zur Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Fraktionen.....	51
5.2	Autophagie-Induktion durch Etoposid	53
5.3	Zusammenhang zwischen Autophagie und Zellzyklus.....	54
5.3.1	Zellzyklusanalyse in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	54
5.3.2	Genexpressionsmuster Autophagie- und Zellzyklus-relevanter Gene in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	59
5.4	Einfluss des Autophagie-Niveaus auf die Chemosensibilität	60
5.4.1	Vorversuche Zytostatika	60
5.4.2	Chemosensibilität in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	61
6	Diskussion	63
6.1	Etablierung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie- Niveau mittels Cyto-ID	64
6.1.1	Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	66
6.1.2	Expression von <i>ATG</i> -Genen in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	66
6.2	Induktion des Autophagieflux durch den Autophagie-Modulator Etoposid in JURKAT-Zellen.....	68
6.3	Assoziation zwischen hohem Autophagie-Niveau und G2/M-Phase des Zellzyklus in JURKAT-Zellen.....	69
6.3.1	Durchflusszytometrische Analyse – Zellfraktionen mit hohem Autophagie-Niveau befinden sich überwiegend in der G2/M-Phase.....	70
6.3.2	Signifikant erhöhte Genexpression von G2/M-Markern in den Zellfraktionen mit hohem Autophagie-Niveau	73
6.4	Keine Einflussnahme der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf die Chemosensibilität in JURKAT-Zellen	75
7	Schlussfolgerung	78
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	79
9	Anhang.....	99
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	99
9.2	Tabellenverzeichnis.....	100
9.3	Danksagung	101
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	102

Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Abkürzungen

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
ADCD	<i>autophagy-dependent cell death</i> (Autophagie-abhängiger Zelltod)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATG/ ATG/ Atg	<i>autophagy relevant</i> (Autophagie-relevant)
ATP	Adenosintriphosphat
β 2-M	β 2-Mikroglobulin
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CDKI	CDK-Inhibitor
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CQ	Chloroquin
ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
Cyto-ID	Cyto-ID [®] Green
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DiOC ₆ (3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniod
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphat)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen des Leibnitz-Instituts
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evts/s	<i>events per second</i> (Ereignisse pro Sekunde)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FAM	6-Carboxyfluorescein

FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
HCQ	Hydroxychloroquin
IKZ	Inkubationszeit
KIM	Klinik für Innere Medizin
KW	Kalenderwoche
LC3	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A/1B Leichtkette 3)
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i> (rot fluoreszierendes Protein-Monomer)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
PAS	<i>Phagophore assembly site</i> (Lokalisation der Phagophorbildung am ER)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PLK1	<i>polo-like kinase 1</i> (Polo-ähnliche Kinase 1)
PROPPIN	<i>β-propellers that bind polyphosphoinositides</i>
PTM	posttranslationale Proteinmodifikation
<i>real-time</i> RT-PCR	<i>real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RLuc	Renilla-Luciferase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI-1640	Am Roswell Park Memorial Institute formuliertes Zellkulturmedium

SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardabweichung des Mittelwertes)
SL	Stammlösung
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
ULK	<i>Unc-51-like autophagy activating kinase</i> (Unc-51-ähnliche Autophagie-aktivierende Kinase)

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
h	<i>hora</i> (Stunde)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Zusammenfassung

Die Autophagie ist ein metabolischer Prozess, mit dem Zellen zum einen die Zellhomöostase aufrechterhalten und zum anderen auf Stressbedingungen reagieren können; in ersterem Falle handelt es sich um konstitutive, in letzterem um induzierte Autophagie. Sie stellt einen Recyclingmechanismus dar, der unter Ausbildung sogenannter Autophagosomen potenziell toxisches intrazelluläres Material abbaut und die Metaboliten der Wiederverwertung zuführt. Eine Dysregulation der Autophagie kann zu neurodegenerativen, entzündlichen oder autoimmunen Erkrankungen führen und nimmt auch auf die Tumorentstehung und -progression erheblichen Einfluss. Daher gilt die Modulation der Autophagie in der Krebstherapie als erfolgsversprechender Ansatz, um die herkömmlichen Therapiemöglichkeiten zu ergänzen. Dabei muss jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Autophagie einerseits als protektiver Faktor der Krebsentstehung vorbeugen kann, andererseits jedoch auch maligne Zellen vor Stress, einschließlich der Chemotherapie, zu schützen vermag. Ob eine hohe oder niedrige Autophagie-Aktivität die Krebstherapie unterstützen kann, ist deshalb noch unentschieden. Aktuell werden darum sowohl Autophagie-Inhibitoren als auch -Induktoren klinisch getestet. Zudem ist die Autophagie an der Regulation diverser zellulärer Signalwege, wie beispielsweise der Zellzykluskoordination, beteiligt. Der Zusammenhang von Zellzyklusphase und Autophagie wird in aktuellen Studien allerdings kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, durch die Weiterentwicklung und Etablierung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Aktivität einen Beitrag zur Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung der Autophagie zu leisten. Auf Basis der Einfärbung mit dem Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID[®] Green (Cyto-ID) wurden Zellen am *fluorescence activated cell sorting*-Gerät (FACS-Gerät) nach ihrem Autophagie-Niveau sortiert. Als Untersuchungsobjekt diente die akute lymphatische Leukämie (ALL)-Zelllinie JURKAT. Dem Sortiervorgang gingen die Prüfung der Zytotoxizität und der Temperaturempfindlichkeit von Cyto-ID voraus: Der Farbstoff erwies sich als atoxisch und temperaturempfindlich bei 23 und 37 °C, aber stabil bei 2 °C. Die Zellsortierung wurde deshalb bei einer Temperatur von 4 °C vorgenommen. Am Ende der Methodenetablierung konnten JURKAT-Zellen erfolgreich in drei Fraktionen mit

niedrigem, mittlerem und hohem Autophagie-Niveau getrennt und nach dem Sortieren weiterkultiviert werden. Die Bestimmung der autophagozytotischen Aktivität über 24 Stunden nach Sortierung zeigte, dass die drei Fraktionen auch nach diesem Zeitraum noch distinkte Autophagie-Niveaus aufwiesen. Die Analyse der Fraktionen auf Genexpressionsebene mittels *real-time* RT-PCR der Autophagie-relevanten (*ATG*)-Gene *ULK1* und *BECN1* ergab keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression in den Fraktionen und lässt eine zytoplasmatische Regulation der Autophagie vermuten. Über Zellen mit konstitutiver Autophagie hinaus wurden auch Zellen mit induzierter Autophagie sortiert; als Induktor diente der Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid.

Um dem Zusammenhang von Autophagie und Zellzyklus auf den Grund zu gehen, wurde die neue Methode genutzt, um die Zellzyklusprofile der Zellen mit unterschiedlicher Autophagie-Aktivität zu analysieren. Sowohl in unbehandelten als auch Autophagie-stimulierten Zellen wurde eine Assoziation von hohem Autophagie-Niveau mit der G2/M-Phase der Zellen festgestellt, *vice versa* dominierten Zellen mit niedriger Autophagie-Aktivität in der G1-Phase. Auch die Auswertung der Expression der G2/M-spezifisch exprimierten Gene *CCNB1* und *PLK1* mittels *real-time* RT-PCR bestätigte diese Erkenntnisse: Ihre Expressionen waren in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau im Vergleich zur Fraktion mit niedrigem Autophagie-Niveau signifikant erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine Zellzyklus-abhängige Regulation der Autophagie hin.

Des Weiteren konnte die Methode der Zellsortierung die Rolle der konstitutiven Autophagie-Aktivität in Bezug auf die Chemosensibilität in JURKAT-Zellen aufdecken. Die zwei dazu getesteten Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, nämlich Cytarabin und Etoposid, riefen in den drei Cyto-ID-sortierten Fraktionen in gleichem Ausmaß Zelltod hervor. Dieser Befund legt nahe, dass die konstitutive Autophagie-Aktivität der Zellen nicht ausschlaggebend für das Ansprechen auf die Chemotherapie ist.

Die experimentelle Detektion der Autophagie-Aktivität spielt in der Enthüllung ihrer Funktion im pathophysiologischen Kontext eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Methode etabliert werden, die der Grundlagenforschung der konstitutiven und pharmakologisch induzierten Autophagie Türen öffnet, um die Autophagie in der Krebstherapie künftig gezielt zu modulieren.

2 Einleitung

2.1 Autophagie

Die Autophagie ist ein dynamischer, streng regulierter, evolutionär konservierter Prozess, der Eukaryoten ermöglicht, ihre Zellhomöostase zu erhalten (Zhi et al. 2017). Sie fungiert als adaptiver zellulärer Mechanismus, um mit Stressstimuli wie Nährstoff- und Energiemangel, reaktiven oxygenen Spezies, DNA-Schäden, Proteinaggregaten, funktionslosen Organellen und pathogener Invasion umzugehen (Kroemer et al. 2010).

Anfang der 60er-Jahre prägte der Belgier Christian de Duve als Erster den Begriff Autophagie (griech.: Selbstverdauung) (Ohsumi 2014, De Duve und Wattiaux 1966). Die Autophagie koordiniert den Abbau zellulärer Produkte, die durch Akkumulation toxisch werden können (Galluzzi et al. 2017). Je nach Signalweg, der durchlaufen wird, um die Fracht vom Zytosol zu den Lysosomen zu übermitteln, wird der Autophagiemechanismus in drei Arten unterteilt: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie (Zhi et al. 2017). Bei der Mikroautophagie wird zytosolisches Material über direkte Internalisierung in das Lysosom degradiert (Li et al. 2012). Die Chaperon-vermittelte Autophagie dient dem selektiven Abbau zytosolischer Proteine (Catarino et al. 2017).

Die Makroautophagie ist bis heute am besten charakterisiert und wird als Fokus dieser Arbeit im Folgenden als Autophagie betitelt. Sie ist gekennzeichnet durch die Bildung von Doppelmembran-Vesikeln, die als Autophagosomen bezeichnet werden (Reggiori et al. 2012). Langlebige oder fehlgefaltete Proteine, Fette, Glykogene und funktionslose Organellen werden in Autophagosomen zu den Lysosomen transportiert und abgebaut (Zhi et al. 2017). Die Bildung eines Autophagosoms wird von mehreren Proteinkomplexen bestehend aus Autophagie-relevanten (ATG)-Proteinen kontrolliert, die die Neuordnung von Membranen abstimmen (Fullgrabe et al. 2016). Bis zu den 90er-Jahren beschränkte sich die Erforschung des Autophagiemechanismus hauptsächlich auf die mikroskopische Observation und morphologische Beschreibung dieses Prozesses (Harnett et al. 2017). Erst drei Jahrzehnte nach der Prägung des Begriffes Autophagie, 1993, beschrieb Yoshinori Ohsumi 15 *ATG*-Gene, die an der Regulation des Autophagiemechanismus beteiligt sind (Harnett et al. 2017). 2016 erhielt Yoshinori Ohsumi den Nobelpreis in Physiologie und Medizin für seine revolutionäre Arbeit

(Harnett et al. 2017). Heutzutage sind über 40 ATG-Proteine bekannt (Morishita und Mizushima 2019). Der große Fortschritt in der Grundlagenforschung der Autophagie weckte das Interesse an der exakten Rolle dieses zellulären Mechanismus und resultierte in der Publikation zahlreicher neuer Studien. Eine Vielzahl an Mutationen in *ATG*-Genen korreliert mit zellulären Dysfunktionen, die zu humanen Pathologien führen; beispielsweise neurodegenerative und infektiöse Erkrankungen oder Krebserkrankungen (Levy et al. 2017, Dikic und Elazar 2018). Die Enthüllung dieser Zusammenhänge motiviert die Autophagie-Modulation als therapeutischen Ansatz zu nutzen.

Die Autophagie ist ein mehrstufiger Prozess, der sich wie folgt zusammensetzt: Initiation der Autophagie, Biogenese und Expansion eines Phagophor, Bildung eines Autophagosoms und letztendlich Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom (Zhi et al. 2017). Die Dynamik des Prozesses wird gänzlich als *autophagic flux* (Autophagieflux) bezeichnet (Loos et al. 2014).

2.1.1 Autophagiemechanismus

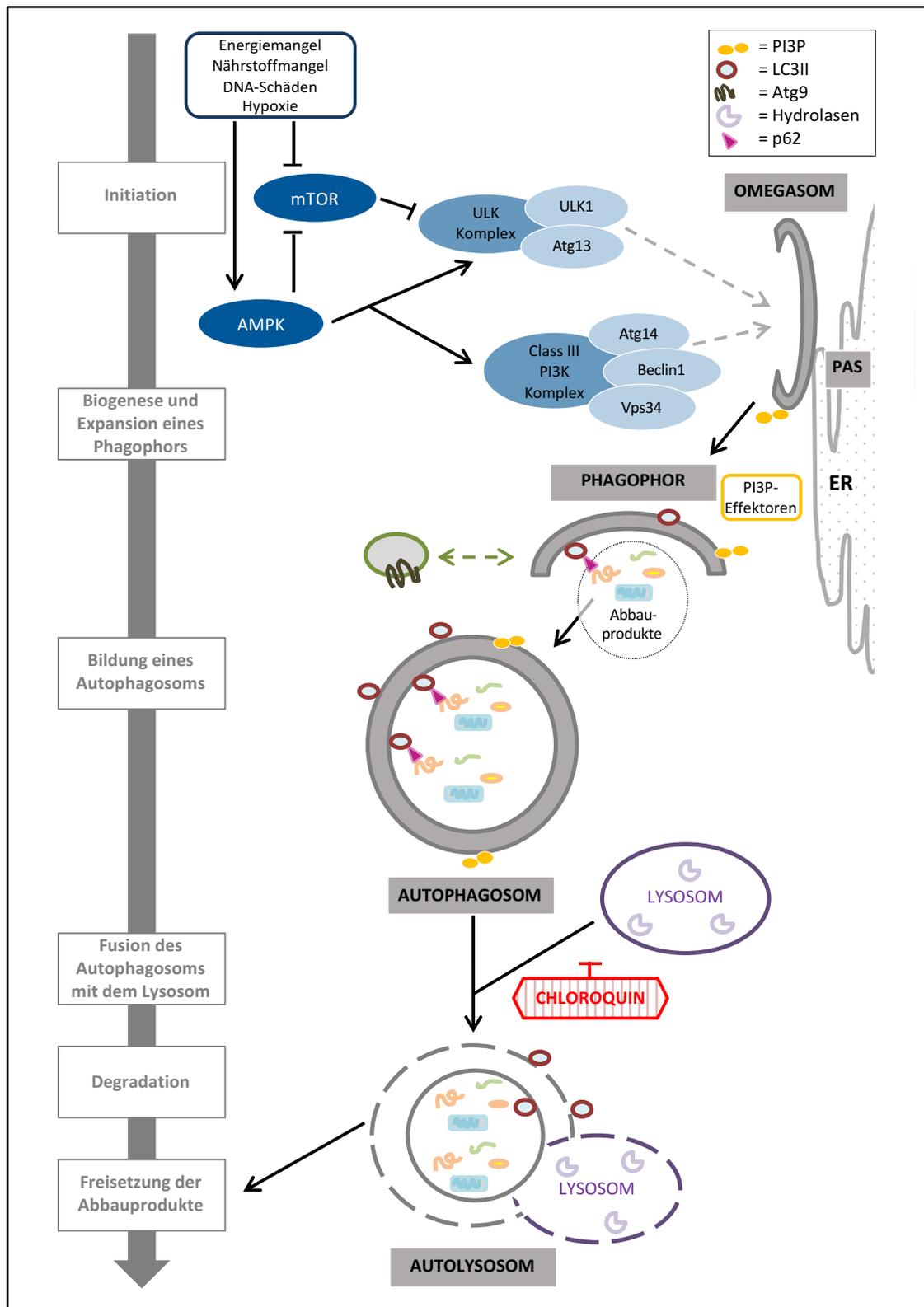


Abbildung 1: Schematische Darstellung des mehrstufigen Autophagie-Prozesses und des Angriffspunktes des Autophagie-Inhibitors Chloroquin
(Wirkmechanismus siehe Seite 17)

2.1.1.1 Initiation der Autophagie

Der autophagozytotische Abbau läuft in jeder Zelle konstitutiv, auch in Abwesenheit jeglicher Stressstimuli, auf einem basalen Niveau ab (Klionsky et al. 2011). Durch aktivierende Signale kann das Autophagie-Niveau einer Zelle deutlich gesteigert werden, diese sind unter anderem Energie- und Nährstoffmangel, insbesondere Aminosäuremangel, DNA-Schäden und Hypoxie (Morel et al. 2017, Zhi et al. 2017). Zum Überblick des komplexen Prozesses dient oben aufgeführte Abbildung 1.

Die Initiation der Autophagie zeichnet sich durch die Rekrutierung von ATG-Proteinen zur *phagophore assembly site* (PAS) am endoplasmatisches Retikulum (ER) aus (Zhi et al. 2017). Ein entscheidender Schritt ist dabei die Translokation des *Unc-51-like autophagy activating kinase*-Komplexes (ULK-Komplex), der sich unter anderem aus den ATG-Proteinen ULK1 und Atg13 zusammensetzt, zur PAS (Mercer et al. 2018). Der ULK-Komplex wird über energie-/nährstoffsensible Kinasen reguliert: Nämlich der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Mercer et al. 2018). Die meisten Autophagie-aktivierenden Signale führen zur Deaktivierung der Serin-/Threonin-Kinase mTOR (Zhi et al. 2017). mTOR ist die katalytische Untereinheit zweier Proteinkomplexe, nämlich mTORC1 und mTORC2 (Kim und Guan 2015). In aktivem Zustand bindet mTORC1 ULK1 und inhibiert die Autophagie (Mercer et al. 2018). Wird diese Hemmung durch Autophagie-aktivierende Signale aufgehoben, kann der ULK-Komplex für weitere Autophagieschritte freigegeben werden. Ein niedriges Energielevel wird durch ein hohes zelluläres AMP-zu-ATP Verhältnis erkannt und führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der AMPK (Zhi et al. 2017). Diese kann über verschiedene Signalwege in den Autophagiemechanismus eingreifen. Einerseits kann die AMPK direkt ULK1 und Atg13 des ULK-Komplexes phosphorylieren und aktivieren (Mercer et al. 2018). Andererseits kann sie in aktivem Zustand den ULK-Komplex über Hemmung von mTORC1 aktivieren und somit den Autophagieprozess stimulieren (Mercer et al. 2018). Außerdem kann die AMPK auch in späteren Autophagieschritten sowohl positiv als auch negativ eingreifen, indem Untereinheiten des nachfolgenden *class III phosphatidylinositol-3-kinase*-Komplexes (PI3K-Komplex), welcher sich aus Vps34, Beclin1, Atg14 und weiteren Proteinen zusammensetzt, durch diese phosphoryliert werden.

Der ULK-Komplex transloziert zu PAS-Subdomänen der ER-Membran (Zhi et al. 2017). In dieser Region wird der ULK-Komplex festgehalten, bis ein Phagophor gebildet ist und der Komplex ins Zytoplasma rezykliert wird (Mercer et al. 2018).

2.1.1.2 Biogenese und Expansion eines Phagophors und Bildung eines Autophagosoms

Zur Ausbildung eines Phagophors wird die Aktivität der Lipidkinase Vps34 des *class III PI3K*-Komplexes benötigt (Zhi et al. 2017). Dem ULK-Komplex direkt nachgeschaltet, transloziert der PI3K-Komplex zum ER. Die Ko-Lokalisation beider Komplexe wird durch Atg13-Atg14 stabilisiert und führt zur kontextabhängigen Phosphorylierung von Vps34, Beclin1 oder Atg14 durch ULK 1 (Mercer et al. 2018). Beclin1 des PI3K-Komplexes gewährleistet die Retention des Phagophors an der Lipiddoppelschicht des ERs (Mercer et al. 2018). Vps34 reguliert die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Produktion (PI3P-Produktion) aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol (Rubinsztein 2010). Die Bildung von Omegasomen, „Ω“-ähnliche PI3P-reiche Membranen, die dynamisch mit der ER-Membran verbunden sind, dient als Plattform für die Biogenese und Expansion des Phagophors (Zhi et al. 2017). Der komplexe Mechanismus der Membranumlagerungen ist noch nicht vollends verstanden. Die PI3P-Produktion lockt PI3P-Effektoren der PROPPIN-Familie an, diese wiederum lipidieren *Ubiquitin-like* Proteine, LC3-Proteine genannt (Mercer et al. 2018). Zur autophagozytotischen Degradation ubiquitiniertes Proteine dient p62 als Adapterprotein und verknüpft diese Abbauprodukte mit LC3 (Bjorkoy et al. 2005). Der nächste Schritt markiert den Übergang des Omegasoms zum Phagophor (Morel et al. 2017). Unlipidiert befinden sich die LC3-Proteine überwiegend im Zytosol (LC3-I) (Mercer et al. 2018). ATG-Proteine koordinieren die LC3-Konjugation mit einer membrangebundenen Phosphatidylethanolamin (PE)-Gruppe des Omegasoms, es entsteht LC3-II auf der Innen- und Außenseite des Phagophors (Mercer et al. 2018). LC3-II begünstigt die Rekrutierung und Assoziation autophagozytotischer Membranen und ist essentiell für die Phagophor-Expansion (Mercer et al. 2018). Bei der Autophagieinduktion, in Abhängigkeit vom ULK1-Phosphorylierungsstatus, pendeln sogenannte *Atg9-compartments* um das Phagophor (Mercer et al. 2018). Es besteht die Annahme, dass diese an der Formation des Autophagosoms aus dem Phagophor beteiligt sind (Yamamoto et al. 2012). Das expandierende Phagophor bildet eine kelchförmige Struktur

und schließt die vom Zytosol abgesonderte Ladung in das Doppelmembranvesikel ein. Ein Autophagosom entsteht. Neben den *Atg9-compartments* gibt es verschiedene weitere Modelle, woher die Autophagosomenmembran stammen könnte (Lamb et al. 2013, Tooze und Yoshimori 2010): Von diversen Membranen, wie der Plasmamembran (Ravikumar et al. 2010), der ER-Membran (Hayashi-Nishino et al. 2009) und der äußeren Mitochondrienmembran (Hailey et al. 2010). Höchstwahrscheinlich haben Autophagosomen multiple Mechanismen, um ihre Membran zusammzusetzen, die alle dynamisch als Antwort auf bestimmte Stresssignale reguliert werden (Zhi et al. 2017). Zusammenfassend wächst die präautophagosomale Struktur in der Expansionsphase zu einem Phagophor und expandiert anschließend zu einem beladenen Autophagosom.

2.1.1.3 Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom und Degradation der Fracht

Lysosomen ändern ihre intrazelluläre Verteilung in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit: Von einer peripheren Lokalisation in nährstoffreichen Situationen zu perinukleärer Clusterbildung in Hungerzuständen (Appelqvist et al. 2013). Das reife Autophagosom dissoziiert vom ER, anschließend verschmilzt die äußere Membran des Doppelmembran-Vesikels mit dem Lysosom, folglich entsteht ein Autolysosom (Zhi et al. 2017). Nach der Fusion werden die innere Autophagosomenmembran und der Vesikelinhalt von Lysosom-resistenten sauren Hydrolasen in Grundbausteine wie Proteine, Fette und Zuckermoleküle zersetzt (Zhi et al. 2017). Anschließend werden die resultierenden monomerischen Einheiten zur Aufrechterhaltung der metabolischen Zell- und Organellhomöostase über lysosomale Membrantransporter (Permeasen) zurück in das Zytosol transportiert und zur Bildung neuer Makromoleküle wiederverwertet (Zhi et al. 2017, Thorburn 2014).

2.1.2 Ausblick

Ursprünglich als sehr unspezifischer Prozess charakterisiert, hat sich die Autophagie in den letzten Jahren auch als zielgerichteter selektiver Signalweg offenbart (Johansen und Lamark 2011). Autophagosomen können intrazelluläres Material relativ wahllos aus dem Zytoplasma aufnehmen oder selektives Material degradieren in Abhängigkeit vom initiiierenden Stimulus (Morishita und Mizushima 2019). Selektive Autophagieprozesse werden entsprechend des bestrebten zellulären Materials benannt: Proteinaggregate (Aggrephagie), Mitochondrien (Mitophagie), Peroxisomen (Pexophagie) etc. (Morel et

al. 2017). Tendenziell wirkt Autophagie eher zytoprotektiv als zytotoxisch (Galluzzi et al. 2017). Trotzdem wird Autophagie auch mit dem Zelltod in Zusammenhang gebracht. Früher als „Zelltod Typ II“ bezeichnet (Clarke und Clarke 2012), wird der Mechanismus, der ohne alternative Zelltod-Signale über Autophagie zum Zelltod führen kann, vom Nomenklatur-Komitee nun als Autophagie-abhängiger Zelltod (ADCD – *autophagy-dependent cell death*) betitelt (Bialik et al. 2018). So ist beispielsweise die Autosis eine Natrium-Kalium-ATPase-abhängige Sonderform des ADCD (Liu et al. 2013). Da die zellulären Mechanismen diesbezüglich noch nicht vollends entschlüsselt sind, werden die Begriffe teils unpräzise eingesetzt.

Der Autophagiemechanismus ist an der intrazellulären Qualitätskontrolle, der Prävention zellulären Alterns, der Zelldifferenzierung und Entwicklung, dem Zellzyklus, dem Zelltod und dem angeborenen und adaptiven Immunsystem beteiligt (Yin et al. 2016, Auberger und Puissant 2017). Wenngleich viele dieser Prozesse unabdingbar zusammenhängen, soll Schwerpunkt dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Autophagiemechanismus und Zellzyklus sein, mit Ausblick auf potenzielle Therapieoptionen in der Krebstherapie.

2.1.3 Pharmakologische Autophagie-Modulation in den durchgeführten Experimenten mit JURKAT-Zellen

2.1.3.1 Autophagie-Aktivator: Etoposid

In geringer Konzentration ist Etoposid ein bekannter Autophagie-Induktor (Montecucco et al. 2015). In höheren Konzentrationen kommt Etoposid als Zytostatikum zum Einsatz (siehe Chemotherapeutikum: Etoposid, Seite 27). Xie et al. bestätigten die Autophagie-Induktion durch Etoposid in HepG2-Zellen (isolierte humane hepatozelluläre Karzinomzellen) mittels-LC3-Fluoreszenzmikroskopie, LC3-II-Protein-Expression im Western Blot und die Anzahl autophagozytotischer Vakuolen im Elektronenmikroskop (Xie et al. 2011). Etoposid scheint die Autophagie und Autophagosomenformation über einen alternativen, unkonventionellen Mechanismus zu aktivieren. So sind die Autophagie-relevanten Proteine ULK1 und Beclin1 für die Etoposid-induzierte Autophagie unabdingbar, während Atg5 und Atg7 (gezeigt an *ATG5*- bzw. *ATG7*-Knockdown-Mäusen) nicht erforderlich sind (Nishida et al. 2009).

2.1.3.2 Autophagie-Inhibitor: Chloroquin

Chloroquin (CQ) – ursprünglich als Malariamittel bekannt – hemmt die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom und somit einen der letzten Schritte des Autophagiemechanismus (siehe Abbildung 1, Seite 12) (Mauthe et al. 2018). CQ und seine Derivate akkumulieren in den endolysosomalen Strukturen, welches in einem Anstieg des pH-Wertes, beeinträchtigt lysosomaler Funktion und Blockade des Autophagieflux resultiert (Amaravadi et al. 2016). Die Blockade der lysosomalen Funktion durch CQ beeinträchtigt nicht nur die Beseitigung der Autophagosomen, sondern auch den Abbau von Endosomen und andere vesikuläre Transportwege (Galluzzi et al. 2017). CQ wird häufig als lysosomaler Inhibitor herangezogen, um beim Einsatz eines Autophagie-Modulators (hier Etoposid) die Akkumulation von Autophagosomen vom Autophagieflux zu unterscheiden (Klionsky et al. 2016). Mithilfe eines Autophagie-Markers (hier Cyto-ID siehe nachfolgendes Kapitel: Detektion des Autophagie-Niveaus in Zellkulturen) kann die Autophagosomen-Anzahl bestimmt werden. Wird nach Inkubation mit CQ eine höhere Autophagosomen-Anzahl detektiert, kann davon ausgegangen werden, dass der Autophagie-Modulator den Autophagieflux induziert und nicht nur zu einer Akkumulation von Autophagosomen führt. Wird aber in Kombination mit CQ kein Anstieg der Autophagosomen-Anzahl registriert, hemmt der Autophagie-Modulator den Autophagosomen-Abbau und induziert keinen Autophagieflux.

2.1.4 Detektion des Autophagie-Niveaus in Zellkulturen

Die besondere Bedeutung der Autophagie in zellulären Prozessen hat das wissenschaftliche Interesse an der Aufklärung der Rolle dieses molekularen Mechanismus in seinem physiologischen und pathophysiologischen Kontext geweckt (Orhon und Reggiori 2017). Die verschiedenen Ansätze, um Autophagie in Zellen zu beobachten, wurden im Detail in einer großen Arbeit von Klionsky et al. diskutiert (Klionsky et al. 2016). Um Zellen mit verschiedenem Autophagie-Niveau zu vergleichen, bietet sich speziell die Zellsortierung am Durchflusszytometer an. Beim *fluorescence activated cell sorting* (FACS) kann eine Zellpopulation in Suspension nach einem bestimmten Kriterium in Subpopulationen getrennt werden. Der gewünschte Parameter wird zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Eine Zu- oder Abnahme des Fluoreszenzsignals entspricht einer Änderung der untersuchten zellulären Aktivität.

Am geläufigsten ist die LC3-Fusion mit der *monomeric red fluorescent protein* (mRFP)-*green fluorescent protein* (GFP)-Probe, wie beispielsweise mCherry-GFP: MCherry-GFP-LC3 (Orhon und Reggiori 2017). Die Probe generiert ein gelbes Signal, wenn LC3 an zytoplasmatische autophagosomale Vorläuferstrukturen und -vesikel gebunden ist (Orhon und Reggiori 2017). Bei der Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen unterdrückt der niedrige lysosomale pH-Wert das GFP-Signal, sodass nur noch das rote mRFP-Fluoreszenzsignal der Autolysosomen detektiert werden kann (Orhon und Reggiori 2017, Kimura et al. 2007). Die Messung der Fluoreszenzsignale ermöglicht folglich die Quantifizierung der Autophagie-Induktion und des Autophagieflux (Orhon und Reggiori 2017). Genauer gesagt kann der Schritt der Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom erfasst werden (Kimura et al. 2007), ohne weitere Notwendigkeit eines Autophagie-Inhibitors (Klionsky et al. 2016). Es gibt weitere Methoden zur Messung des Autophagie-Niveaus, die auf einer LC3-Fusion basieren, wie das Renilla-Luciferase-LC3 (RLuc-LC3)-Reporter-Konstrukt (Orhon und Reggiori 2017) oder die Fluoreszenz-Probe GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G (Kaizuka et al. 2016). Den bis hierhin beschriebenen Methoden ist jedoch ein gemeinsamer Nachteil zueigen: Um die Messungen durchführen zu können, muss zuvor eine Transfektion der Zellen mit einem Plasmid, das die fluoreszierenden Konstrukte codiert, erfolgen (mRFP-GFP-LC3 (Kimura et al. 2007), GFP-LC3-RFP-LC3 Δ G (Kaizuka et al. 2016) oder RLuc-LC3 (Farkas et al. 2009).

Der neuartige Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID ermöglicht auf eine simple Art die schnelle relative Quantifizierung der Autophagie-Aktivität einer einzelnen Zelle. Cyto-ID ist ein kationischer amphiphiler Fluoreszenzfarbstoff, der autophagozytotische Kompartimente anfärbt, bei parallel geringer Anfärbung der Lysosomen (Oeste et al. 2013). Ein Anstieg im Cyto-ID-Fluoreszenzsignal repräsentiert die Autophagosomenformation (Chan et al. 2012). Die erste Arbeit zur Charakterisierung von Cyto-ID wurde 2012 von Chan et al. veröffentlicht. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde zuvor nur vereinzelt eingesetzt, um die Autophagie zu detektieren (Lee und Lee 2012, Klappan et al. 2012, Warenius et al. 2011). Chan et al. validierten den neuen Farbstoff mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie in HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen) in drei verschiedenen Settings. Zunächst wurden Zellen mit Nährstoffmangel-induzierter Autophagie und unbehandelte Zellen mit Cyto-ID inkubiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der Autophagie-induzierten Population ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz, die Anfärbung lysosomaler Strukturen

in der Kontrollgruppe blieb aus und lieferte erste Hinweise zur Spezifität des Autophagosomen-Markers Cyto-ID. Als nächstes kam der Autophagie-Aktivator Rapamycin zum Einsatz, auch die pharmakologische Autophagie-Induktion ließ sich mittels Cyto-ID nachweisen, bei zusätzlicher Inkubation mit dem Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin war keine Fluoreszenz mehr nachzuweisen. Zuletzt konnte die Spezifität des Fluoreszenzfarbstoffs anhand der Ko-Lokalisation der RFP-LC3- und Cyto-ID-Fluoreszenz in Autophagie-induzierten (Tamoxifen) Zellen bestätigt werden (Chan et al. 2012). Auch Guo et al. (2015) bestätigten die hohe Spezifität des Autophagosomen-Markers anhand der Fluoreszenz-Überlappungen von Cyto-ID mit einem autophagosomalen (mCherry-LC3), lysosomalen (LAMP-mRFP) bzw. endosomalen (mRFP-RAB5A) Fluoreszenzfarbstoff. Die Sensitivität von Cyto-ID konnte mindestens genauso hoch wie die eines LC3-Immunblots eingestuft werden (Guo et al. 2015). Ausschlaggebend ist nicht nur die Autophagosomen-Formation und somit Autophagie-Induktion oder -Inhibition detektieren zu können, sondern den tatsächlichen Autophagieflux und das Durchlaufen des gesamten Prozesses. Mithilfe des Autophagie-Inhibitors CQ konnte bestätigt werden, dass Cyto-ID die adäquate Abschätzung des Autophagieflux ermöglicht. Einerseits im Vergleich mit LC3-Immunblots einer Autophagie-induzierten (Imatinib) myeloischen Leukämiezelllinie (K562), andererseits in der durchflusszytometrischen Analyse Autophagie-induzierter (Nährstoffmangel) JURKAT-Zellen (Chan et al. 2012, Guo et al. 2015). 2015 setzten Guo et al. den damals neu entwickelten Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID bei lebenden Organismen ein, in der Hoffnung die Wirksamkeit Autophagie-modulierender Therapien überwachen zu können. Sie bewiesen erfolgreich, dass Autophagie-Antworten auf Autophagie-Modulatoren in peripheren Blutzellen und Knochenmarkszellen von Mäusen mittels Cyto-ID detektiert werden können (Guo et al. 2015).

2.2 Zellzyklus

2.2.1 Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in vier Hauptphasen unterteilt werden: G1, S, G2 und M-Phase. G1, S und G2 werden zur Interphase zusammengefasst, während die M-Phase die Mitose und Zytokinese einschließt. Die S-Phase (Synthese-Phase) wird umgeben von zwei G-Phasen (*gap=engl. Lücke*) (siehe Abbildung 2).

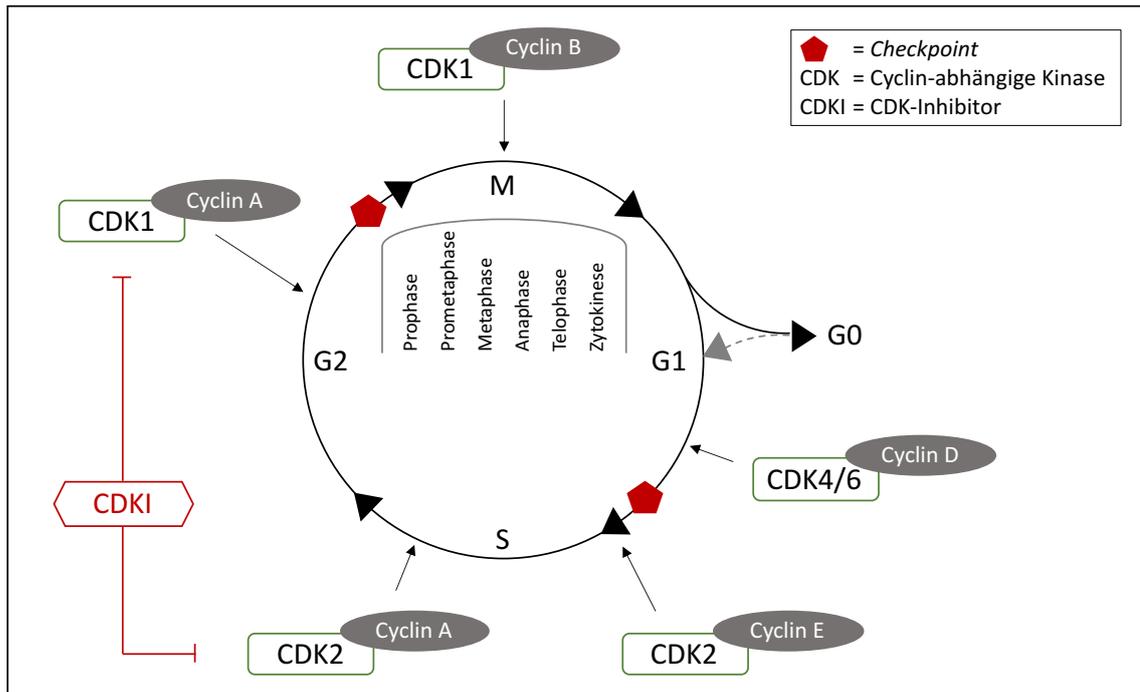


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Während der G1-Phase wird die Zelle auf die DNA-Synthese vorbereitet. Zellen in der G1-Phase können in ein Ruhestadium ausweichen, G0, hierzu zählen überwiegend nicht proliferierende Zellen des menschlichen Körpers (Vermeulen et al. 2003). In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Gefolgt wird die S-Phase von der G2-Phase, in welcher die Zelle auf die Mitose vorbereitet wird. In der M-Phase werden zelluläre Bestandteile auf die Tochterzellen aufgeteilt und letztere anschließend separiert. Die Mitose wird in fünf Phasen unterteilt: Prophase (Initiation der DNA-Kondensation), Prometaphase (Entwicklung des mitotischen Spindelapparates und Auflösung der Zellkernwand), Metaphase (Chromosomenanordnung in Äquatorialebene), Anaphase (Trennung der Schwesterchromatiden zu Tochterchromosomen) und Telophase (DNA-Dekondensation, Bildung der Zellkernmembran). Anschließend folgt die Zytokinese, bei der die Tochterzellen räumlich voneinander getrennt werden (Mathiassen et al. 2017).

2.2.2 Regulation des Zellzyklus

Als Antwort auf DNA-Schäden kann an Kontrollstationen, sogenannten *checkpoints*, der Zellzyklus angehalten werden (Zellzyklusarrest), um Zeit für die DNA-Reparatur zu schaffen. Es gibt einen G1-S-Kontrollpunkt und einen G2-M-Kontrollpunkt, zudem werden Kontrollstationen während der M- und der S-Phase beschrieben (Vermeulen et

al. 2003). Die abgestimmte Progression im Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) koordiniert (siehe Abbildung 2). Die CDK-Aktivität wird durch Bindung ihrer regulatorischen Untereinheiten, sogenannten Cyclinen, bestimmt. Das CDK-Level bleibt während des gesamten Zellzyklus beständig (Vermeulen et al. 2003). Im Gegensatz dazu werden Cycline in spezifischen Phasen des Zellzyklus synthetisiert und abgebaut (Mathiassen et al. 2017). Zusätzlich können CDK-Inhibitoren (CDKI) die CDKs direkt hemmen (Mathiassen et al. 2017).

Die Alternative, den Zellzyklus zu durchlaufen oder anzuhalten, hängt von der Nährstoffsituation, dem mitogenen Status sowie den vorhandenen Stressstimuli ab (Mathiassen et al. 2017). Sobald die Zelle im Zellzyklus engagiert ist, durchläuft sie eine Reihe regulierter Ereignisse (u.a. Zellwachstum, DNA-Replikation, Qualitätskontrollen etc.), die in dem minutiös abgestimmten Prozess der Zellteilung kulminieren (Mathiassen et al. 2017). Dysregulationen in diesem Prozess können zu unkontrollierter Zellproliferation und neoplastischen Transformationen führen (Zheng et al. 2019).

2.3 Autophagie und Zellzyklus

2.3.1 Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Autophagie-Aktivität

Ob und in welchen Phasen des Zellzyklus der Autophagieflux aktiv ist, ist umstritten. 2007 beschrieben Tasdemir et al., dass die Autophagie-Induktion eng mit der Progression des Zellzyklus verbunden ist, denn nur 50 % der Zellen, bevorzugt Zellen der G1- und S-Phase, konnten Autophagie-stimuliert werden (Tasdemir et al. 2007). An anderer Stelle wurde anhand mikroskopischer Observationen vermutet, dass es während der Mitosephase zu einer strengen Inhibition der Autophagie kommt (Eskelinen et al. 2002). Dies wurde durch den Einsatz von Autophagie-Inhibitoren und die anschließende Beobachtung von Autophagosomen-Akkumulation in mitotischen Zellen widerlegt (Liu et al. 2009). Auch Loukil et al. konnten eine Autophagie-Aktivität in der Mitosephase beobachten: So scheint der Autophagie-Prozess am Abbau des Cyclins A2, das von der späten G1 bis zur M-Phase akkumuliert, beteiligt zu sein (Loukil et al. 2014). Eine andere Studie (Kaminsky et al. 2011) nutzte LC3-Antikörper, die die Autophagosomenmembran assoziierten LC3-II-Proteine anfärben, um das Autophagie-Niveau in den Zellzyklusphasen darzustellen. Die Menge an LC3-II aus LC3-I korreliert mit dem Ausmaß der Autophagosomenformation (Kabeya et al. 2000). Diese

Arbeitsgruppe fand mittels Propidiumiodid-Färbung (PI-Färbung) heraus, dass die Autophagie-Aktivität nach pharmakologischer oder Nährstoff-abhängiger Autophagie-Induktion in allen Phasen (G0/G1, S und G2/M) gleich ansteigt (Kaminsky et al. 2011). 2016 versuchten Li et al. diesen Widersprüchen systematisch auf den Grund zu gehen. Ihre Ergebnisse zeigten eine Aktivität des Autophagieflux während des gesamten Zellzyklus mit relativ erhöhtem Autophagieflux in der frühen Mitose und S-Phase im Gegensatz zur G1- und späten G2-Phase (Li et al. 2016). Inzwischen ist man sich in der Literatur größtenteils einig, dass in jeder Zellzyklusphase ein basales Autophagie-Niveau vorhanden ist; ob die Autophagie in der M-Phase hoch oder niedrig ist, bleibt in Diskussion (Zheng et al. 2019).

Sowohl die Autophagie als auch der Zellzyklus sind streng regulierte, dynamische zelluläre Prozesse. Neuere Studien zeigen, dass ursprünglich als Autophagie-relevant charakterisierte Proteine auch an der Zellzyklusregulation beteiligt sind und umgekehrt (Li und Zhang 2017, Zheng et al. 2019). Unter anderem sind folgende Proteine in beide Prozesse involviert: MTORC1, AMPK, PI3K, CDKs, CDKIs und PLK1. Eine Störung der Regulation des einen Prozesses resultiert in der Dysfunktion des anderen, wodurch die enge Verknüpfung zwischen Autophagie und Zellzyklus verdeutlicht wird (Zheng et al. 2019).

2.4 Autophagie und Tumorentstehung bzw. -progression

Aberrante Autophagie ist mit humanen Pathologien, wie neurodegenerativen (Hara et al. 2006), entzündlichen (Cadwell et al. 2008) und autoimmunen Erkrankungen (Yin et al. 2018) bis hin zur Krebsentstehung, assoziiert. Im Folgenden soll insbesondere auf den Zusammenhang zwischen Autophagie und Tumorgenese bzw. -progression eingegangen werden. Viele Kommentare und Review-Artikel über die Rolle der Autophagie nutzen Begriffe wie das „zweischneidige Schwert“ um metaphorisch zu beschreiben, dass die Autophagie häufig konträre Effekte bei gleichen biologischen Prozessen zeigt (Thorburn 2014). Vor allem in Bezug auf Krebserkrankungen ist diese Tatsache von Aktualität. Während vermutet wird, dass Autophagie der Krebsentstehung vorbeugen kann, gibt es auch Evidenzen dafür, dass die Autophagie die Progression eines etablierten Tumors unterstützt.

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Autophagie eine tumorunterdrückende Wirkung hat. Dies basierte hauptsächlich auf folgender Beobachtung: Das Ausschalten von Autophagiegenen, wie beispielsweise *BECN1* oder *ATG5*, führte in bestimmten Konstellationen und in Abhängigkeit vom Gewebetyp zur Initiation der Bildung von Neoplasien (Takamura et al. 2011, Qu et al. 2003, Yue et al. 2003). Einige Mechanismen können, zumindest teilweise, die onko-protective Wirkung der Autophagie erklären (Galluzzi et al. 2015). Autophagozytotische Prozesse unterdrücken auf verschiedene Art und Weise zelluläre Defekte, die maligne Transformationen mit sich bringen können. So scheint die Autophagie über Atg7 die Aufrechterhaltung normaler hämatopoetischer Stammzellen zu gewährleisten (Mortensen et al. 2011). Die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, die höchst genotoxisch wirken, wird durch die selektive autophagozytotische Zersetzung dysfunktionaler Mitochondrien (Green et al. 2011) und redox-aktiver ubiquitiniertes Proteinaggregate gewährleistet (Komatsu et al. 2007). Zudem wirkt die Autophagie, dank ihrer Fähigkeit Zelltod zu induzieren, tumorsuppressiv (Bishop und Bradshaw 2018). Autophagozytotischer Zelltod ist durch die Präsenz zytoplasmatischer Vakuolen und erhöhtem Autophagiefluss charakterisiert. Er läuft unabhängig von der Caspasen-Aktivität ab (Bishop und Bradshaw 2018). Außerdem ist die Autophagie wahrscheinlich in die Degradation onkogenetischer Proteine involviert (Mathew et al. 2009, Wang et al. 2011). Ebenso ist sie an Immunantworten beteiligt, die der Etablierung und Proliferation maligner Zellen vorbeugen (Ma et al. 2013). Autophagie generiert extrazelluläres ATP, welches Immunzellen rekrutiert (Michaud et al. 2011). Manche malignen Transformationen entstehen in inflammatorischer Umgebung. Die Autophagie koordiniert wirksame anti-inflammatorische Effekte. Sie zersetzt sogenannte Inflammasome und verhindert somit die weitere Freisetzung pro-inflammatorischer Leukine (Zitvogel et al. 2012). Zuletzt schützt die Autophagie durch Abwehr viraler und bakterieller Infektionen vor neoplastischer Transformation (Deretic et al. 2013). Zusammenfassend führen diese Observationen zu der Annahme, dass der Autophagiemechanismus vor maligner Transformation schützt, indem er die zelluläre Homöostase des gesamten Organismus konserviert.

Im Gegensatz zu ihrer Rolle, die Tumorinitiation zu hemmen, zeigte Autophagie auch eine kritische pro-tumorale Funktion in vielen bereits etablierten Krebstypen

(Kimmelman und White 2017). In Krebszellen ist der Autophagiemechanismus komplett intakt, teilweise ist die Transkription dieses Signalwegs sogar hochreguliert (Amaravadi et al. 2016). Die erhöhte basale Autophagierate trägt zur Aufrechterhaltung des Tumors bei (Kimmelman 2011). So sichert die Autophagie das Überleben von Zellen bei iatrogenem Stress, wie Chemotherapie oder Radiotherapie, und führt zu Therapieresistenzen, die durch die Autophagie-Inhibition überwunden werden können (Levy et al. 2014, Ko et al. 2014, Apel et al. 2008, Qadir et al. 2008). Studien zeigten, dass das Autophagie-Niveau in sauerstoffarmen Regionen von Tumoren erhöht ist und dieser Mechanismus die Tumorzellen vor Stressoren wie Nährstoffmangel und Hypoxie schützt (Degenhardt et al. 2006). Isolierte Krebszellen, bei denen die Autophagie genetisch oder pharmakologisch inhibiert ist, sind dagegen weniger resistent gegenüber endogenen und exogenen Stimuli (Galluzzi et al. 2015). Zusätzlich zur Funktion der Autophagie im Überleben der Krebszellen durch metabolische Adaptation berichten weitere Arbeiten, dass die Autophagie zelluläre Prozesse, wie die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen begünstigt (Macintosh et al. 2012, Lock et al. 2014). Autophagie wird für die Tumorzellmotilität benötigt, eine Inhibition der Autophagie resultiert in einer Blockierung der Krebszellmigration und -invasion und einer Reduktion der Metastasen *in vivo* (Sharifi et al. 2016). Sobald der Prozess der Invasion und Metastasierung beginnt, verlieren die Tumorzellen den Kontakt zu ihren Nachbarzellen und werden mobil. Normalerweise wird ein apoptotischer Zelltod eingeleitet, sobald eine Zelle die Verbindung zu ihrem Verband löst. Dies wird als Anoikis bezeichnet (Gilmore 2005). Tumorzellen entgehen diesem Mechanismus, indem sie die Autophagie aktivieren und in einen Ruhezustand verfallen, bis wieder Kontakt zu einer neuen extrazellulären Matrix aufgebaut ist (Guadamillas et al. 2011).

Der Autophagiemechanismus zeigt je nach Phase der Tumorgenese verschiedene Auswirkungen. Diese Diskrepanz macht die Autophagie auf ihren verschiedenen Niveaus zu einem interessanten Studienobjekt. Die Erforschung der näheren Rolle der Autophagie in den unterschiedlichen Stadien der Tumorgenese birgt bedeutendes Potenzial, um neue therapeutischen Strategien zur Krebsbekämpfung zu entwickeln (Bishop und Bradshaw 2018).

2.4.1 Autophagiemodulation in der Krebstherapie

Krebszellen können über verschiedene Mechanismen der Chemotherapie entgegenwirken und Resistenzen ausbilden: Tumorheterogenität, Inaktivierung der Apoptose, erhöhte DNA-Reparaturrate, Bildung von Kompartimenten, Angiogenese, veränderter Wirkstoffmetabolismus und -efflux, Verlust molekularer Zielstrukturen und Autophagie-Manipulation (Sui et al. 2013). Die Modulation des letztgenannten Mechanismus, sowohl die Aktivierung als auch die Inhibierung, wurden für verschiedene Krankheiten, unter anderem für Krebserkrankungen, im klinischen Alltag vorgeschlagen (Thorburn 2018). Der Forschungsschwerpunkt wurde zunächst auf die Inhibierung der Autophagie gelegt. CQ und sein Derivat Hydroxychloroquin (HCQ) sind derzeit die geläufigsten klinisch verfügbaren Wirkstoffe, um die Autophagie beim Menschen zu inhibieren (Levy et al. 2017). Während in den ersten Versuchen mit CQ noch positive Bilanzen gezogen werden konnten (Choi et al. 2012), wurden in weiteren klinischen Studien divergierende Effekte in Abhängigkeit der Tumorart und Kombination mit Chemotherapeutika bzw. Radiotherapie festgestellt (Levy et al. 2017). Trotzdem ist es weithin unbestritten, dass die Inhibierung der Autophagie Krebszellen für die zytotoxische Therapie sensitivieren und dadurch die Effekte der Chemotherapie potenzieren könnte (Bishop und Bradshaw 2018). Obwohl der Untersuchung der Autophagie-Induktion in Tumormodellen anfänglich weniger Bedeutung beigemessen wurde (Bishop und Bradshaw 2018), muss die Aktivierung dieses Prozesses in Zukunft intensiver als therapeutischer Ansatz in Betracht gezogen werden.

Derzeit sind zahlreiche klinische Studien (Phase I/II) in hämatopoetischen Tumoren im Gange. Sowohl die ausschließliche Autophagiemodulation, Inhibition und Aktivierung, als auch die Kombination mit Chemotherapeutika werden getestet (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Bisherige Ergebnisse zeigten ein variierendes Outcome in hämatopoetischen Krebsarten (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Somit sollte die Autophagiemodulation in der Therapie wohl überlegt und individuell abgestimmt werden.

2.5 Akute lymphatische Leukämie

Im Kindes- und Jugendalter handelt es sich bei beinahe einem Drittel (30,2 %) der malignen Erkrankungen um Leukämien (Kaatsch 2019). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste aller pädiatrischen Leukämien (Kaatsch 2019). Zur

Durchführung der Experimente wurde eine Zelllinie akuter lymphatischer T-Leukämiezellen, JURKAT, gewählt. Bei der ALL proliferieren lymphatische Vorläuferzellen unkontrolliert und akkumulieren im Knochenmark, Blut, lymphatischem und nicht lymphatischem Gewebe. Die unreifen, transformierten, lymphatischen Blasten verdrängen in Folge das blutbildende Knochenmark. Diese Zellinfiltration führt zum Versagen der obligaten Knochenmarksfunktionen und zu einer Zytopenie in den drei anderen Zellreihen: Anämie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie (Gökbuget 2018). Die Symptome der Erkrankung lassen sich aus genannten Dysfunktionen des blutbildenden Systems ableiten. Unter anderem lässt sich am immunologischen Subtyp ablesen, ob es sich um Zelldifferenzierungen aus der B- oder T-Zellreihe handelt. 80 % der ALL-Erkrankungen sind B-ALL- und 20 % T-ALL-Fälle (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Die exakte Rolle der Autophagie in lymphoiden Tumoren, wie ALL, ist bis heute umstritten und wahrscheinlich abhängig von den spezifischen Subtypen (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Beim Ausbleiben einer Behandlung führt ALL innerhalb weniger Monate zum Tod. Das Ziel der Behandlung ist eine kurative Therapie. Die Behandlung setzt sich aus folgenden Phasen zusammen: Der Induktionstherapie mit dem Ziel der kompletten Remission und der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie zur Aufrechterhaltung der kompletten Remission (Gökbuget 2018). Zusätzlich zur Chemotherapie erfolgen Strahlentherapie und Knochenmarkstransplantationen. Gegenwärtig beträgt die Langzeitüberlebensrate, von mindestens 15 Jahren, 90 % (Kaatsch 2019). Während dies als großer Erfolg in der Geschichte der Onkologie gewertet werden kann, verbleiben die derzeitigen Therapien toxisch und traumatisch für die jungen Patienten und deren Familien und können Jahrzehnte später zu Langzeit-Gesundheitsschäden führen (Essig et al. 2014, Winther und Schmiegelow 2014). Hoffnung neuer Therapieoptionen steckt in der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Krebsinitiation und -entwicklung, um beispielsweise neue Kombinationen mit Autophagie-Modulatoren und somit geringere Konzentrationen herkömmlicher Medikamente in der ALL-Therapie einsetzen zu können.

2.5.1 Chemotherapeutika in den durchgeführten Experimenten mit JURKAT-Zellen

2.5.1.1 Chemotherapeutikum: Cytarabin

Cytarabin wird als Zytostatikum in Leukämien eingesetzt. Es wirkt als Antimetabolit und wird während der DNA-Replikation fälschlicherweise anstelle eines Nukleotids in diese eingebaut, wodurch ein korrektes Ablesen nicht gewährleistet werden kann. Dies führt zu einer Hemmung des Zellwachstums. In seltenen Fällen kann Cytarabin auch als Virostatikum eingesetzt werden (Cohen 1977).

2.5.1.2 Chemotherapeutikum: Etoposid

Etoposid kommt in höheren Konzentrationen als „Breitspektrum“-Zytostatikum, beispielsweise zur Behandlung von Lymphomen und der akuten myeloischen Leukämie (AML), sowie des Hoden-, Ovarial- und Bronchialkarzinoms, zum Einsatz. Es interagiert mit der DNA-Topoisomerase II, was zu DNA-Strangbrüchen und zum G2/M-Zellzyklusarrest führt (Schonn et al. 2010). Können die DNA-Schäden nicht hinlänglich beseitigt werden, wird die Caspase-induzierte Apoptose getriggert und somit kann Etoposid zytotoxisch wirken (Montecucco et al. 2015). Das Isoenzym Topoisomerase II α ist ein Proliferationsmarker, der in Tumorzellen stark erhöht ist und dadurch ein ideales Ziel für Krebsmedikamente darstellt (Montecucco et al. 2015).

3 Zielstellung der Arbeit

Der Grundgedanke meiner Arbeit war, eine simple, zuverlässige, Zelllinien-unspezifische Methode zu etablieren, um Zellpopulationen mittels des Autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID am FACS nach ihrem Autophagie-Niveau in distinkte Fraktionen trennen und nachfolgend weiterkultivieren zu können. Diese Methode sollte es ermöglichen, Zellen mit unterschiedlicher Autophagie-Aktivität in Anschlussexperimenten vergleichend auf zellbiologische Aspekte zu untersuchen. Damit sollte insbesondere der mögliche Zusammenhang zwischen Autophagie und tumorbiologisch bedeutsamen Faktoren wie Zellzyklusphasen und Chemosensibilität geprüft werden.

Vergleichend zu Zellen mit basaler Autophagie-Aktivität sollten auch Autophagie-stimulierte Zellen untersucht werden. In Vorversuchen mit unsortierten Zellen musste zunächst eine geeignete Konzentration des Autophagie-Induktors Etoposid ermittelt und die tatsächliche Aktivierung des Autophagieflux anhand der Kombination mit dem Autophagie-Inhibitor CQ bestätigt werden. Cyto-ID wurde zwar bereits gründlich als Autophagie-Marker validiert (Guo et al. 2015, Chan et al. 2012), doch wurde es noch nicht für Zellsortierungen genutzt. In Vorbereitung derselben sollte der Fluoreszenzfarbstoff daher zunächst auf Zytotoxizität und Temperatursensibilität getestet werden. Im Weiteren sollte in den sortierten Fraktionen die Stabilität der unterschiedlichen Autophagie-Aktivitäten analysiert werden. Würde sich die Autophagie-Aktivität der sortierten Fraktionen auch über einen längeren Zeitraum nachweislich unterscheiden, könnten die Zellen Anschlussexperimente durchlaufen. In der Folge sollten unbehandelte und stimulierte Zellpopulationen nach der Autophagie-basierten Fraktionierung mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusprofilanalyse auf ihre Zellzyklusphasen-Verteilung untersucht werden. Dabei sollte auch die Expression Zellzyklusphasen-relevanter Gene mittels *real-time* RT-PCR bestimmt werden. Abschließend sollte die Methode der Zellsortierung außerdem dazu dienen, den Einfluss der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf die Chemosensibilität aufzuklären. Hierzu sollten die Zellpopulationen mit unterschiedlicher autophagozytotischer Aktivität vergleichend auf ihr Ansprechen auf die Zytostatika Cytarabin und Etoposid geprüft werden.

4 Methodik

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Aus der Universitätsapotheke Jena oder direkt von den Herstellern (rechte Spalte)

Tabelle 1: Verwendetes Material und Geräte

-20 °C Gefrierschrank	Liebherr
4 °C Kühlschrank	Liebherr
Accu-Jet® Pro Pipettierhilfe	BrandTech® Scientific
ARCTIC Kälte-/Wärmebad SC100 A10	Thermo Scientific™
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator (37 °C; 5 % CO ₂)	Thermo Scientific™
BD FACSAria™ Fusion Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences
BioPhotometer® Plus	Eppendorf AG
Cellstar® Kulturflasche 50/250 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Serologische Pipette 1/ 2/ 5/ 10 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Tubes 15/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Zellkulturwellplatte 12 Well	Greiner Bio-One GmbH
CoolCellX	Biozym
Eiswürfelbereiter	NordCap® GmbH & Co. KG
Fast RT-PCR System® (7900 HT)	Applied Biosystems
Filter Tips 100/ 200/ 1 000 µl	ClearLine®
HERAcell® CO ₂ -Inkubator (37 °C; 5 % CO ₂)	Thermo Scientific™
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Menzel Deckgläser für Haemocytometer	Thermo Scientific™
MicroAmp Optical 96-Well Reaction plate	Applied Biosystems
MicroAmp Optical Adhesive film	Applied Biosystems

Mikroskope	Carl Zeiss Jena GmbH, Leica
Multipette Aufsätze 500 µl/ 1 ml	Eppendorf AG
Multipette® plus	Eppendorf AG
Neubauer Zählkammer (Improved) 0,100 mm Tiefe/ 0,0025 mm ²	Hecht Assistent® Germany
Pipetten Eppendorf Reference® variabel 0,5-10/ 10-100/ 50-200/ 1 000 µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen 10/ 200/ 1 000 µl	Eppendorf AG, BrandTech® Scientific, Neptune®
Präzisions-Quarzküvette	VWR® International
Safe Lock Röhrchen 0,5/ 1,5 ml	Eppendorf AG
Serumpipette steril	Greiner Bio-One GmbH
Sterilwerkbank Herasafe™ KS	Thermo Scientific™
Sterilwerkbank PCR Workstation	VWR® International
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific™
Thermomixer comfort (Heizblock)	Eppendorf AG
Transferpipette Einweg, 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG
Vasco® nitril white Handschuhe	B. Braun
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries™, Inc.
Waagen	Kern
Wasserbad	Julabo GmbH, GFL
Zellzähler Counter AC-15	Hecht Assistent® Germany
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich GmbH & Co. KG
Zentrifuge Universal 16 A	Hettich GmbH & Co. KG

4.1.2 Reagenzien und Kits

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Kits

Ampuwa® Wasser Polyethylenampullen Mini-Plasco® connect 10 ml	Fresenius Kabi
BD FACSClean™	BD Biosciences
BD FACSDiva™ CS&T Research Beads	BD Biosciences
BD FACSTFlow™	BD Biosciences

Methodik

BD FACS™ Accudrop Beads	BD Biosciences
BD FACS™ Shutdown Solution	BD Biosciences
BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
Chloroquin	Enzo Life Sciences
Cytarabin	Zytostatikaabteilung FSU Jena
Cyto-ID® Green Autophagy detection Kit	Enzo Life Sciences
D-(+)-Glucose wasserfrei ≥ 99,5 % Zellkulturqualität	Carl Roth®
DiOC ₆ (3)	Molecular Probes™
Dulbecco's PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	Capricorn Scientific
Ethanol 99,5 %	J.T. Baker
Etoposid	Zytostatikaabteilung FSU Jena
Fetales Kälberserum (FKS)	Capricorn Scientific
Glutamin	Biozym
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun
Meliseptol® rapid Desinfektionsspray	B. Braun
Omniscript® RT Kit (200) (10xBuffer-RT, dNTP-Mix, oMniscrypt RT)	Qiagen
PBS (pH 7,4)	Thermo Scientific™
pegGOLD DNase I (Digest Kit)	PeqLab
Penicillin G/ Streptomycin	Biozym
PeqGOLD Total-RNA-Kit (RNA Isolation)	PeqLab
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich®
QIAshredder™ (250)	Qiagen
RNase freies Wasser	Qiagen
RNase OUT™ (Recombinant Ribonuclease Inhibitor)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific
RNeasy® Mini Kit (250) (RTL-Lyse-Puffer, RW1-Waschpuffer, RPE- Waschpuffer)	Qiagen
RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	Capricorn Scientific
RPMI-1640 w/o phenol red	Capricorn Scientific

TaqMan® Gene Expression Assay (Primer-Sonden-Mix, Universal PCR Master Mix) <i>β2-M</i> : Hs00187842_m1 <i>ULK1</i> : Hs00177504_m1 <i>BECN1</i> : Hs00186838_m1 <i>PLK1</i> : Hs00983227_m1 <i>CCNB1</i> : Hs01030099_m1	Applied Biosystems
Triton® X-100	Sigma-Aldrich®
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG

4.1.3 Zelllinie

JURKAT:	Akute lymphatische T-Leukämiezellen	
Isolation:	1976 aus dem peripheren Blut eines an ALL erkrankten Jungen im ersten Rezidiv	
Morphologie:	Runde Suspensionszellen, wachsen vereinzelt oder in Zellhaufen	
Depositor:	Dr. Jun Minowada, ACC 282, Lot 15, DSMZ	
Inkubation:	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	
Komplettmedium:	500 ml – 90 %	RPMI-1640 [mit stabilem Glutamin]
	50 ml – 10 %	FKS
	100 units/ml	Penicillin G
	0,1 mg/ml	Streptomycin

4.2 Versuchsdurchführung

4.2.1 Zellkultivierung

4.2.1.1 Auftauen und Kultivieren der kryokonservierten Zellen

Die Zelllinien wurden bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurde ein Aliquot à zwei Millionen Zellen im Wasserbad (37 °C) rasch aufgetaut. Unter der sterilen Werkbank wurden die aufgetauten Zellen sogleich zu 6 ml vorgewärmten Komplettmedium in einem 15 ml Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurde die Suspension drei Minuten bei 1 200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 6 ml frischem Komplettmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Die Inkubation der Stammkulturen im Brutschrank erfolgte stetig bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt sowie 95 % Luftfeuchtigkeit. Diese

wuchsen ausschließlich in Suspension. Bis zur nächsten Passage wurden die Kulturflaschen im Brutschrank verwahrt. Für Experimente wurden Zellen der Passagen 4 bis 30 eingesetzt. Das Auftauen der Kryokulturen wurde freundlicherweise von der Medizintechnischen Assistentin Sabine Becker übernommen.

4.2.1.2 Passagieren der Zellen

Zunächst wurde die Zellkulturflasche lichtmikroskopisch auf Verunreinigungen und Infektionen untersucht. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage, vor Erreichen der Konfluenz, unter einer sterilen Werkbank passagiert. Mit einer serologischen Pipette wurden die Zellen, inklusive verbrauchtem Medium, in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die 75 cm²-Kulturflasche wurde einmalig mit 10 ml frischem warmen (37 °C) Kompletmedium gespült, welches anschließend ebenfalls in das 50 ml Röhrchen gegeben wurde. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsvorgang bei 1 200 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mittels Pipette in 20 ml frischem warmen Kompletmedium resuspendiert und sorgfältig vereinzelt.

4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur quantitativen Bestimmung der Zellen wurde eine 1:2 Verdünnung angesetzt, bestehend aus 20 µl der homogenen Zell-Medium-Suspension und 20 µl Trypanblau. Der verdünnte Ansatz wurde kurz gevortext. Um die Zellen auszuzählen wurden 10 µl des Ansatzes in eine mit Deckglas belegte Neubauerzählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei diagonal liegende Großquadrante, bestehend aus je 16 Kleinquadranten, ausgezählt. Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte mit dem Farbstoff Trypanblau, der sich nur in Zellen mit permeabler Zellmembran, also geschädigten Zellen, einlagert und somit ein Indikator für den Zelltod darstellt. Der Anteil vitaler, ungefärbter Zellen ergibt sich aus dem Quotienten lebender Zellen und der Gesamtzellzahl sowie Multiplikation mit 100 %.

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \times 100 \% = \text{Zellvitalität}$$

Die Vitalität in den Kulturflaschen der Zelllinien betrug zwischen 90 % und 98 %. Das Volumen eines Großquadranten beträgt jeweils 0,1 µl (1 mm² Fläche x 0,1 mm Schichtdicke). Die Multiplikation der erhaltenen Zellzahl mit 10⁴ ermöglichte die

Ermittlung der Zellzahl pro ml. Zur Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:2) multipliziert man mit 2 und dividiert durch die Anzahl der Quadrate (hier 2).

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen} \times 10\,000 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} = \text{Anzahl der lebenden Zellen pro ml}$$

4.2.1.4 Erhaltung der Zellkultur

Zur Fortführung der JURKAT-Zellkultur wurde eine 75 cm²-Kulturflasche mit frischem warmem Medium und gewünschter errechneter Zellzahl angesetzt:

Für eine Zyklusdauer von 3 Tagen: 4×10^6 Zellen ($0,2 \times 10^6$ Zellen pro ml)

Für eine Zyklusdauer von 4 Tagen: 3×10^6 Zellen ($0,15 \times 10^6$ Zellen pro ml)

Insgesamt wurden die Kulturflaschen mit Medium auf 20 ml Zellsuspension aufgefüllt. Die Zellkulturen wurden bis zur nächsten Passage im Brutschrank inkubiert. Die Zellzahl der Kulturflaschen wurde vor jeder Passage bestimmt. Die Verdopplungszeit der JURKAT-Zellen in Kultur betrug demnach um die 30 Stunden (siehe Abbildung 3).

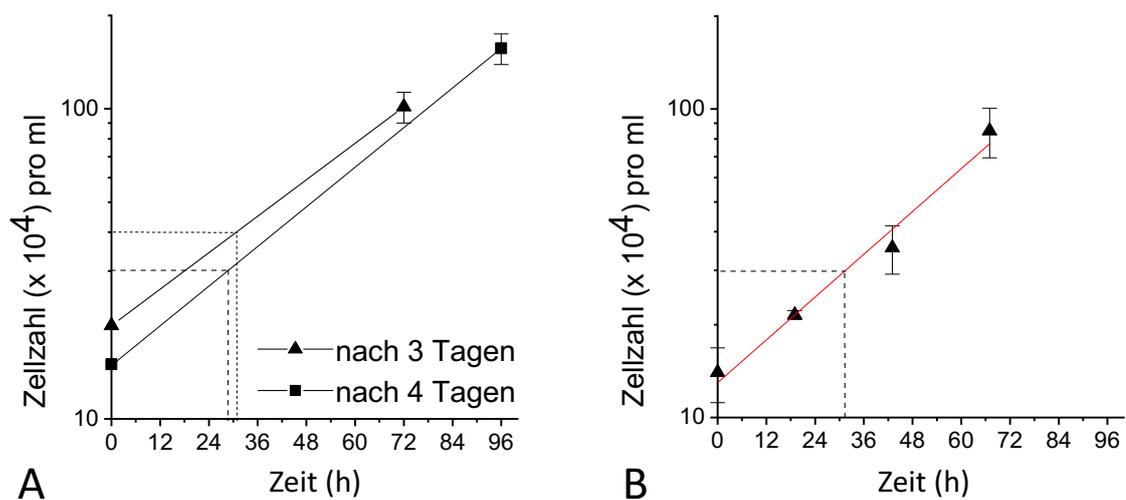


Abbildung 3: Verdopplungszeit JURKAT-Zellen

Zellkultur in der Flasche. Zellzählung mittels Neubauerzählkammer. A: Zusammenfassung der ermittelten Zellzahl während der Zellpassage über 4 Wochen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils vier Zählungen. B: Lineare Regression. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM einer Doppelbestimmung.

4.2.1.5 Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche

Für durchflusszytometrische Analysen wurden je nach Experiment bestimmte Zellzahlen pro 12-Well-Platte ausgesät (siehe Tabelle 3). Hierzu wurde nach der Zellzahlbestimmung eine Zellsuspension mit gewünschter Zelldichte und frischem Medium in einem 50 ml-Röhrchen angelegt. Mittels Multipette wurden dann in jedes Well 500 µl oder 1 ml gegeben und im Brutschrank für den angegebenen Zeitraum inkubiert.

Tabelle 3: Zelldichte pro Well in den durchgeführten Experimenten

Experiment	Zellzahl pro Well/ ml pro Well
Zytotoxizität von Cyto-ID bei Langzeitinkubation (siehe Seite 50)	75 000/ 0,5 ml (= 150 000/ 1 ml)
Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz (siehe Seite 51)	100 000/ 1 ml
Durchflusszytometrische Messung zur Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Fraktionen (siehe Seite 51)	100 000/ 1 ml
Autophagie-Induktion durch Etoposid (siehe Seite 53)	150 000/ 1 ml
Zellzyklusanalyse in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen (siehe Seite 54)	100 000/ 1 ml
Vorversuche Zytostatika (siehe Seite 60)	150 000/ 1 ml
Chemosensibilität in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen (siehe Seite 61)	100 000/ 1 ml

4.2.1.6 Wirkstoffapplikation

Die Wirkstoffapplikationen der Vorversuche (Cyto-ID, Autophagie-Induktor, Autophagie-Inhibitor und Chemotherapeutika) erfolgten 24 Stunden nach Aussaat. Die Applikation der Wirkstoffe nach einem Zellsortiervorgang im FACS erfolgte aus methodischen Gründen direkt nach dem Aussäen der sortierten Zellen. Die Applikation fand unter sterilen Bedingungen und bei gedämpftem Licht statt, da die Substanzen photosensibel sind. Die Verdünnung erfolgte mit JURKAT Komplettmedium.

Die JURKAT Zellen wurden je nach Experiment mit den in Tabelle 4 aufgeführten Konzentrationen behandelt und für die gewünschte Zeit im Brutschrank weiterkultiviert. Um die gewünschte Konzentration aus der Stammlösung zu erhalten, wurden

Verdünnungsreihen mit Medium pipettiert. Nach gewünschter Inkubationszeit konnte die Messung durchgeführt werden.

Tabelle 4: Eingesetzte Autophagie-Modulatoren und Chemotherapeutika

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Intention	Konzentration der SL	Konzentration	IKZ
Etoposid	Topoisomerase-II-Hemmstoff	Autophagie-Induktion	50 mM	0/ 0,2/ 0,3/ 0,5/ 0,7 μ M	24 h
CQ	Lysosomaler Inhibitor der Autophagie	Autophagie-Inhibition	25 mM	10 μ M	0, 1, 2, 3, 4, 5 h
Cytarabin	Antimetabolit	Zytostatikum	2 mM	250/ 500/ 1 000 nM	24 h
Etoposid	Topoisomerase-II-Hemmstoff	Zytostatikum	50 mM	2,5/ 5/ 10 μ M	24 h

Legende: SL = Stammlösung, IKZ = Inkubationszeit

4.2.2 Durchflusszytometrie

Dank der Durchflusszytometrie, speziell der FACS-Analyse, lassen sich sowohl verschiedene Zellparameter untersuchen als auch Zellen nach verschiedenen Variablen sortieren. Bei diesem Messverfahren werden Suspensionszellen in einer sich verjüngenden Messküvette beschleunigt, wodurch die Zellen einzeln monochromatische Laserstrahlen passieren. Es kann sowohl die Lichtbeugung (Vorwärtsstreulicht – FSC: *forward scatter*), als auch die Lichtbrechung und Reflexion (Seitwärtsstreulicht – SSC: *side scatter*) registriert werden. Ersteres ist proportional zur Zelloberfläche und somit zur Zellgröße, Zweiteres repräsentiert die Zellkomplexität und –granularität des Zytoplasmas, des Zellkerns und der Vesikel. Werden FSC und SSC in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen, lässt sich anhand dieser Parameter zunächst eine intakte Population, mit Ausschluss der Verunreinigungen, Zellfragmente und Zelldubletten definieren, Gating genannt. Nach der Inkubation mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, wurden in dieser Arbeit mithilfe des Geräts BD FACSCanto™ II der Zelltod, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und das Autophagie-Niveau gemessen. Bei diesem Messverfahren wird ein charakteristisches Fluoreszenzsignal emittiert, welches proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle ist. Die relative Fluoreszenzintensität wird durch

einen Photodetektor erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Die Datenanalyse der elektrischen Signale erfolgte mittels der BD FACSDiva-Software. Auf dem Bildschirm erscheinen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem Populationen, in denen jeder Punkt einer Zelle entspricht. Für die durchgeführten Experimente wurde eine Ereigniszahl von 10 000 festgelegt, für die Zellzyklusanalysen waren es 20 000. Zur Darstellung wurden zweidimensionale Dotplots und Histogramme mit variierender gewünschter Achsenbeschriftung erstellt. Es folgte die Datenauswertung der Korrelation zwischen den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen.

Zum Sortieren der Zellen nach ihrem Autophagie-Niveau wurde der BD FACSAria™ Fusion Durchflusszytometer herangezogen. Der Sortiervorgang durfte freundlicherweise eigens unter Supervision von Frau Yvonne Schlenker durchgeführt werden. Folgendes Prinzip ermöglicht die Zellsortierung. Die gefärbten Zellen in Suspensionsflüssigkeit (PBS pH 7,4) werden unter hohem Druck durch eine kleine Öffnung (*nozzle*: 85 μM) gepresst. Die Tropfen mit je einer Zelle werden entsprechend ihres Fluoreszenzsignals mit einer positiven oder negativen Ladung versehen und in einem Spannungsfeld (*plate voltage*: 4 500) durch elektrische Platten abgelenkt. Sobald die gewünschte Zellzahl in einer Fraktion erreicht ist, wird die Sammlung der Zellen dieser Fraktion unterbrochen. Die Fraktionen erreichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die eingestellte Zellzahl. Auch hier fand die Datenanalyse mit der FACSDiva-Software statt. Die sortierten homogenen Fraktionen mit niedrigem, mittlerem und hohem Autophagie-Niveau können anschließend für weitere Experimente genutzt werden.

4.2.2.1 Zelltodanalyse und Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Bestimmung des Zelltods erfolgte mittels PI. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind impermeabel für PI, während es von Zellen mit permeabler Zellmembran, also toten Zellen, aufgenommen wird und stöchiometrisch in die DNA interkaliert. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm. Kurz vor der Messung wurde in jede 500 μl Probe 1 μl PI appliziert und gevortext.

Als weiterer Zytotoxizitätsparameter wird der Verlust des $\Delta\Psi_m$ gemessen, welcher durch DiOC₆(3)-Einfärbung dargestellt wird. DiOC₆(3) ist ein lipophiler Farbstoff, der spezifisch die Mitochondrienmembran durchdringt und sich in diese einlagert. Verliert die Zelle ihre Integrität gehen die Mitochondrien, sowie das mitochondriale

Membranpotential zu Grunde. Der Fluoreszenzfarbstoff kann entweichen und ausgewaschen werden. Demzufolge entspricht die DiOC₆(3)-positive Population den intakten Zellen mit wohlbehaltenem Mitochondrien-Membranpotential. Das Absorptionsmaximum von DiOC₆(3) liegt bei 482 nm und das Emissionsmaximum bei 497 nm.

Vor der Messung wurden die Zellen mit jeweils 10 µl DiOC₆(3) (1:10 Verdünnung mit Kompletmedium) pro Well (ml) versehen. Nach 45 Minuten wurde die Zellsuspension mittels Einwegpasteurpipetten in 4 ml FACS-Röhrchen überführt, die Wells wurden mit jeweils 1 ml farblosem Medium gespült und ebenfalls in die FACS-Röhrchen gegeben. Diese wurden dann mit zusätzlich 2 ml farblosem Medium aufgefüllt und für fünf Minuten bei 1 800 U/min zentrifugiert, um die Zellen auszuwaschen. Der Überstand wurde dekantiert, die Röhrchen in Eis gestellt und das Zellpellet in jeweils 500 µl farblosem Medium resuspendiert.

4.2.2.2 Messung der autophagozytotischen Aktivität

Die genaue Quantifizierung der Autophagie-Aktivität erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals korreliert mit der steigenden Anzahl an Autophagosomen und erlaubt dadurch eine Einschätzung des Autophagie-Effektes (Chan et al. 2012). Somit lassen sich die Zellen je nach Stoffwechsellage unterschiedlich einfärben. Das Absorptionsmaximum von Cyto-ID liegt bei 463 nm und das Emissionsmaximum bei 534 nm.

Die Proben wurden mit 37 °C warmen farblosen Medium geerntet, zentrifugiert und dekantiert. Das Zellpellet wurde in einer 240 µl Cyto-ID-Verdünnung (1:1 000 mit JURKAT-Kompletmedium) resuspendiert und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen mit farblosem warmem Medium auf insgesamt 2,5 ml aufgefüllt und für fünf Minuten bei 1 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in jeweils 500 µl farblosem Medium resuspendiert und auf Eis gestellt.

Um beim Experiment „Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz“ zu gewährleisten, dass alle Zellen mit exakt der gleichen Konzentration Cyto-ID und für exakt die gleiche Zeit inkubieren, wurde bei diesem Experiment eine

Zell-Medium Suspension in einem 50 ml Röhrchen angesetzt, mit Cyto-ID inkubiert und anschließend auf die FACS-Röhrchen verteilt.

4.2.2.3 Kompensationsmessung

Bei der simultanen Messung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe kann es zur Interferenz der emittierten Wellenlängen kommen, wobei mehrere Signale in einen Bereich einstrahlen und eine falsch positive Zellpopulation in entsprechendem Kanal detektiert werden würde. Um diese Überlappungsbereiche herauszufinden, erfolgte eine Kompensationsmessung. Hierzu wurden 4 Well einer 12-Well-Platte mit 150 000 JURKAT-Zellen pro ml ausgesät. Drei Well wurden mit je einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die Applikation von 1 µl DiOC₆(3) erfolgte 45 Minuten vor dem Ernten der ausgesäten Zellen. Die 30-minütige Inkubation von Cyto-ID erfolgte nach dem Ernten. Um den Zelltod in der vierten Probe zu simulieren wurde nach der Ernte auf 500 µl Messlösung 55 µl 0,5 %-iges Triton X-100 hinzugefügt und 1 µl PI appliziert. Die fünfte ungefärbte Probe wurde als Negativkontrolle mitgemessen. Anschließend konnten die Überlappungsbereiche rechnerisch korrigiert und auf die Messungen angewendet werden.

4.2.3 Zellsortierung und durchflusszytometrische Messung

Nach der Weiterentwicklung und Etablierung der Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID wurde nachfolgendes Protokoll auch für weitere Promotionsarbeiten in unserer Arbeitsgruppe für die Sortierung der Zellen vor Anschlussexperimenten befolgt.

4.2.3.1 Vorbereitung der zu sortierende Proben

Die Zellsortierung basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie. Am Vortag des Sortiertermins in den Laborräumen der Klinik für Innere Medizin (KIM) I (Arbeitsgruppe Pneumologie von Dr. Martin Förster) wurden zwei zusätzliche 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 8 Millionen Zellen/ 20 ml Kompletmedium mit Phenolrot (Endkonzentration: 0,4 x 10⁶/ml) angelegt. Für einen Teil der Versuchsreihen wurde eine der beiden Flaschen mit 0,3 µM Etoposid behandelt, um die Autophagie zu induzieren. Unter der sterilen Werkbank wurde der Flascheninhalt nach 24 Stunden mit je einer 10 ml-Pipette in je ein 50 ml Röhrchen überführt und die Zellkulturflaschen wurden mit jeweils 10 ml vorgewärmten Kompletmedium ausgewaschen und zum 50 ml Röhrchen gegeben. Nach Schwenken der Röhrchen folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsvorgang bei

1 800 U/min. Der Überstand wurde dekantiert und in jeweils 14 ml farblosem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mittels einer sterilen Pasteurpipette vereinzelt. Jedes Röhrchen der Zell-Medium-Suspension wurde für den Sortiervorgang auf drei bis vier FACS-Röhrchen aufgeteilt.

4.2.3.2 Sortiervorgang

In den Laborräumen der KIM I wurde das zu sortierende FACS-Röhrchen vor der Messung 5 Minuten bei 1 800 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und 30 Minuten mit Cyto-ID-Verdünnung (1:1 000) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff ausgewaschen und das Zellpellet in 2,4 ml farblosem warmen Medium resuspendiert. Die restlichen FACS-Röhrchen wurden während des Sortiervorgangs im Brutschrank gelagert. Zu gegebener Zeit wurde das nächste FACS-Röhrchen mit Cyto-ID inkubiert. Je nach Anschlussexperiment wurden kurz vor dem Sortieren 5 µl PI hinzugegeben. Der Sortiervorgang lief bei 4 °C ab. In die Sammelröhrchen wurden 2 ml Kompletmedium vorgelegt und die Wände der Röhrchen durch Schwenken benetzt. Der Sortiervorgang bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl dauerte pro angelegte Zellkulturflasche ein bis zwei Stunden. Sobald das Sammelröhrchen voll war, wurden die sortierten Zellen zentrifugiert, der Überstand mit Sortierflüssigkeit (PBS pH 7,4) dekantiert, das Zellpellet mit frischem Kompletmedium resuspendiert und in den Brutschrank gestellt.

4.2.4 Etablierung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau mittels Cyto-ID

4.2.4.1 Prozess der Optimierung der Methode bezüglich sortierter Zellzahl und Dauer des Sortiervorgangs

Während der ersten Zellsortierversuche zeigten sich Schwierigkeiten beim Erreichen der gewünschten sortierten Zellzahlen in einem angemessenen Zeitraum. Der Entwicklungsprozess der Methode ist in Tabelle 5 abgebildet. Zu Beginn dauerten die Sortiervorgänge bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl bis zu 2,5 Stunden, bedingt durch die geringe Anzahl gemessener Ereignisse pro Sekunde (*evts/s*). Insbesondere in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau (siehe fettgedruckte Zahlen Tabelle 5) konnten teilweise nur um die 5-15 *evts/s* registriert werden. Diese Problematik konnte Schritt für Schritt mithilfe der Modulation folgender Parameter behoben werden:

Modifikation der Zelldichte der Proben, sukzessive Regulierung der Flussrate am FACS-Gerät. Die Herausforderung bei den Einstellungen am FACS-Gerät bestand vor allem darin, einen Kompromiss zu finden, die Zellen zügiger zu sortieren, ohne dass es zu einem Abriss des durch die *nozzle* gepressten Zellstrahls kam.

Tabelle 5: Entwicklungsprozess der Methode der Zellsortierung nach Cyto-ID bezüglich der gesammelten Zellzahl

Gesammelte Zellzahl in der Fraktion mit:	Niedrigem Autophagie-Niveau	Mittlerem Autophagie-Niveau	Hohem Autophagie-Niveau	Ungefähre Sortierdauer
2017, KW 49	612 500	612 500	5 638	2,5 h
2017, KW 50	399 140	399 140	255 330	2,5 h
2017, KW 51	399 700	399 700	182 000	2,5 h
2018, KW 3	399 700	399 700	399 700	2 h
2018, KW 4/ 5/ 6/ 7/ 8/ 11/ 12/ 14/ 15/ 16	400 000	400 000	400 000	1 h
2018, ab KW 17	600 000	600 000	600 000	2 h

Legende: KW = Kalenderwoche

Die zweite Problematik ließ sich während des Sortiervorgangs in dem Koordinatensystem, bei dem die Zellgröße (im FSC-Kanal gemessen, y-Achse) gegen die Cyto-ID-Fluoreszenz (im FITC-Kanal gemessen, x-Achse) aufgetragen ist, beobachten und erklärt ebenfalls die Schwierigkeit der Zellsammlung, vor allem in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau. Zur Veranschaulichung ist in Tabelle 6 das „Re-Gating“ während des Sortiervorgangs der 12. KW (2018) abgebildet. Die gesamte unsortierte Population wanderte während des Sortiervorgangs minimal nach „links“. Vergleicht man die absoluten Cyto-ID-Fluoreszenzen zu Beginn des Sortiervorgangs und nach 30 Minuten, wird deutlich, dass die Cyto-ID-Fluoreszenz der Zellen im Zeitraum des Sortiervorgangs abnahm (siehe rote Markierungen Tabelle 6). Dies konnte durch zwei verschiedene Ansätze ausgeglichen werden. Die Gates wurden während des Sortiervorgangs manuell verschoben, somit konnte die Fluoreszenzabnahme teilweise kompensiert werden. Demzufolge zeigten sich in den drei Fraktionen ähnliche *evts/s*. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen zwischen 25-45 % bewegte. Rechnet man die Anteile der Subpopulationen zusammen,

so ergeben sich knapp über 100 %, da sich die Trennlinien minimal überlappen. Die zweite Optimierungsoption setzte bei den Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes an. Im Folgenden wird genauer auf die Analyse des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID eingegangen (siehe Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID, Seite 50).

Tabelle 6: Cyto-ID-Fluoreszenzabnahme während des Sortiervorgangs

	Zellpopulation zu Beginn des Sortiervorgangs		Zellpopulation 30 Minuten nach Beginn des Sortiervorgangs „Re-Gating“	
	Absolute Cyto-ID-Fluoreszenz (FITC-Mean)	Prozentualer Anteil aller Zellen	Absolute Cyto-ID-Fluoreszenz (FITC-Mean)	Prozentualer Anteil aller Zellen
P5	431	34,8 %	392	37,0 %
P6	678	40,6 %	597	38,1 %
P7	1 059	33,3 %	901	33,7 %

Legende: P5 entspricht den Zellen mit niedrigem, P6 mit mittlerem und P7 mit hohem Autophagie-Niveau.

Letztendlich konnte ein Protokoll für eine zufriedenstellende Zellsortierung nach Autophagie-Niveau mittels Cyto-ID etabliert werden. Für die Experimente, die im nachfolgenden Ergebnisteil präsentiert werden, wurden Zellen des Sortiervorgangs ab KW 7 (2018) herangezogen.

4.2.4.2 Aussäen der Zellen für anschließende funktionelle Versuche mittels FACS

In den Laborräumen der Kinderklinik wurden die sortierten FACS-Röhrchen 5 Minuten bei 1 800 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in soviel Komplettmedium

resuspendiert, dass eine Konzentration von 100 000 Zellen/ml entstand. Mithilfe einer Multipipette wurden 500 µl bzw. 1 ml Zell-Medium-Suspension pro Well einer 12-Well-Platte pipettiert.

4.2.5 Zellzyklusanalyse der sortierten Fraktionen mittels Durchflusszytometrie

Jeder Phase des Zellzyklus (G1-Phase, S-Phase, G2/M-Phase) bis zur Zellteilung entspricht ein bestimmter DNA-Gehalt im Zellkern. PI interkaliert stöchiometrisch in die DNA und erlaubt somit einen Rückschluss auf den DNA-Gehalt und somit die Zellzyklusphase einer Zelle (siehe Abbildung 4) (Krishan 1975). Über die Intensität des Fluoreszenzsignals jeder Zelle lässt sich ableiten in welcher Zellzyklusphase sie sich befindet. Hauptmerkmal apoptotischer Zellen ist die Fragmentierung der DNA, diese weisen die niedrigste Fluoreszenzintensität auf (sub-G1). PI lagert sich ebenfalls in die RNA ein, deshalb muss diese vor der Messung mithilfe einer RNase eliminiert werden.

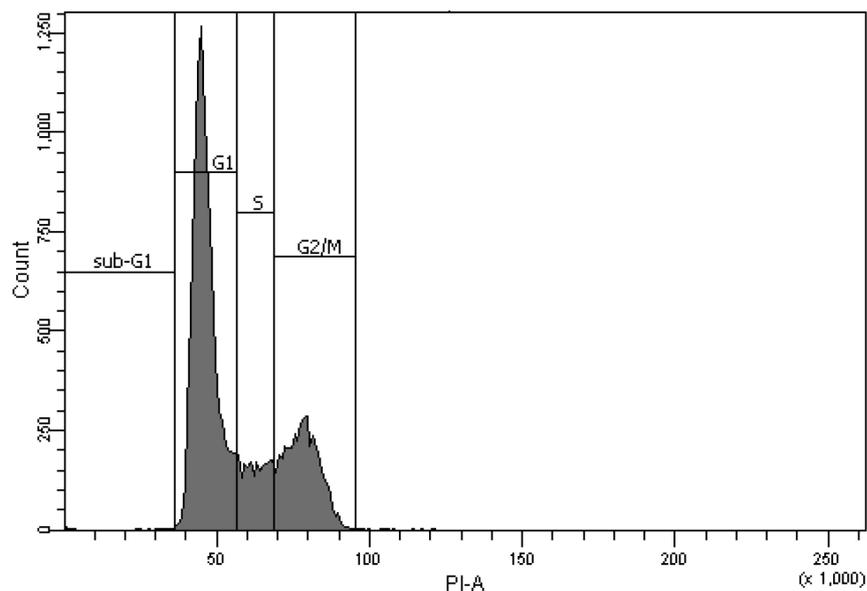


Abbildung 4: *Zellzyklusanalyse einer Zellpopulation*

Bestimmung des DNA-Gehalts in JURKAT-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme. Die gemessene Zellzahl (y-Achse) wurde gegen die PI-Fluoreszenz aufgetragen (x-Achse). Die Cut-offs wurden optisch bestimmt und festgelegt.

Es wurden sowohl Etoposid-stimulierte als auch unbehandelte Zellen sortiert. Während des Sortiervorgangs wurde PI genutzt, um tote Zellen aus der Messung auszuschließen. Nach dem Sortiervorgang wurden 1 ml pro Well Zellen ausgesät. Pro Zeitpunkt wurde eine eigene 12-Well-Platte genutzt (3 Well unbehandelte und 3 Well Etoposid-stimulierte

Zellen mit jeweils niedriger, mittlerer und hoher Autophagie-Aktivität, dementsprechend insgesamt 6 Wells pro Zeitpunkt). Sofort nach dem Sortiervorgang, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden wurde die jeweilige Wellplatte mit Einmalpasteurpipetten geerntet und in FACS-Röhrchen überführt. Die Wells wurden mit 1 ml vorgewärmten PBS gespült und dieses ebenfalls zu den FACS-Röhrchen gegeben. Nach zusätzlicher Zugabe von 2 ml PBS, 5-minütiger Zentrifugation bei 1 800 U/min und scharfem Abkippen des Überstandes, wurden die FACS-Röhrchen mit dem Zellpellet auf Eis gestellt. Unter Vortexen wurden tröpfchenweise 1 ml gekühltes 70 %-iges Ethanol (70 ml 99 % Ethanol + 30 ml Ampuwa® Wasser) zugegeben, um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren. Das Zellpellet wurde mit einer 1000 µl Pipette vereinzelt. Mit einer Multipette wurden anschließend nochmals 1 ml Ethanol in die FACS-Röhrchen pipettiert. Die Proben konnten bis zu einer Woche bei -20 °C gelagert werden.

Die Messung jeder Reihe fand am selben Tag statt, sobald alle Messzeitpunkte gesammelt und mindestens eine Nacht gelagert waren. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500 µl einer Glucose-RNase-PI-Lösung (RNase 50 µg/ml; 50 µg/ml PI; 1 %-ige Glucose in PBS) resuspendiert. Nach 45-minütiger Inkubation unter Lichtschutz bei 4 °C wurde die Fluoreszenzintensität jeder Zelle durchflusszytometrisch am BD FACSCanto™ II gemessen. Die Begrenzung der Ereignisrate lag bei 20 000, die Messung erfolgte bei niedriger Flussgeschwindigkeit.

4.2.6 Genexpressionsanalyse der sortierten Fraktionen mittels *real-time* RT-PCR

Um auf molekularbiologischer Ebene zu verifizieren, ob eine Assoziation zwischen dem Autophagie-Niveau und der Expression bestimmter Zellzyklus- oder Autophagiegene besteht, wurden Genexpressionen in den drei Zellfraktionen verglichen. Als Referenzgene für die Autophagie wurden *ULK1* und *BECN1*, für den Zellzyklus *PLK1* und *CCNB1* herangezogen. Die Bestimmung der Expressionswerte erfolgte anhand der Präparation der RNA. Die erhaltene RNA wird mithilfe des Omniscript® in cDNA umgeschrieben und mittels *real-time* RT-PCR quantifiziert. Um Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurde mit Handschuhen, sterilen wattierten Filterspitzen, sterilen Reaktionsgefäßen und sterilem RNase-freiem Wasser gearbeitet. Anschließend wurden Unterschiede in den amplifizierten Genprodukten analysiert.

Zunächst wurden unbehandelte JURKAT-Zellen, ohne PI, mittels Cyto-ID nach ihrer Autophagie-Aktivität sortiert. Pro Fraktion wurden 400 000 Zellen gesammelt und in ein 15 ml Röhrchen überführt.

4.2.6.1 RNA-Isolation mit PeqGOLD-Total-RNA-Kit

Die 15 ml Röhrchen wurden mit PBS (37 °C) auf 13 ml aufgefüllt, 5 Minuten bei 1 800 U/min im vorgekühlten Gerät zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit einer wattierten Filterspitze trocken gesaugt. Die Proben wurden auf Eis weiterverarbeitet. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem PeqGOLD Total-RNA-Kit. Die trockenen Zellpellets wurden in jeweils 400 µl RNA-Lyse-Puffer homogenisiert und auf die DNA-Removing-Säule mit Unterstandsröhrchen gegeben. Es folgte ein zweiminütiger Zentrifugationsvorgang bei 13 000 U/min. Somit wurde die gesamte DNA in der Säule gebunden und aus dem Lysat entfernt. Die Säule wurde verworfen und der RNA-haltige Unterstand war zur Weiterverarbeitung bereit. Zu diesem wurden 400 µl 70 %-iger Ethanol (7 ml Ethanol 99,9 % + 3 ml Ampuwa® Wasser) gegeben und mit einer Pipette auf- und abpipettiert. Das komplette Lysat wurde auf eine PerfectBind-RNA-Säule mit neuem Unterstandsröhrchen gegeben. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation von 1 Minute bei 13 000 U/min, folglich war die RNA in dem Filter der Säule gebunden. Der Unterstand wurde verworfen. Für eine Einwirkzeit von 5 Minuten wurden 500 µl RNA-Washbuffer-I auf die PerfectBind-RNA-Säule gegeben. Der Washbuffer wurde durch 15 Sekunden Zentrifugation bei 13 000 U/min ausgewaschen. Um auch die übrigen DNA-Reste zu entfernen wurde für 15 bis 25 Minuten der Filter der PerfectBind-RNA-Säule mit einem 75 µl DNase-Verdau-Enzymgemisch (73,5 µl DNase I Digestionspuffer + 1,5 µl RNase-freie DNase) benetzt. Als nächstes folgten weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit 350 µl RNA-Washbuffer-I und zweimal mit 500 µl RNA-Washbuffer-II. Um die RNA zu eluieren, wurde die PerfectBind-RNA-Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gesetzt, der Filter mit der gebundenen RNA mit 35 µl RNase-freiem-Wasser benetzt und für 1 Minute bei 13 000 U/min zentrifugiert. Die Proben mit der gelösten RNA wurden über Nacht bei – 20 °C gelagert.

4.2.6.2 Photometrische RNA-Bestimmung

Zur Quantifizierung des RNA-Gehalts und Beurteilung der Probenqualität wurden 4 µl jeder Probe mit 76 µl RNase-freiem Wasser verdünnt (1:20) und in einer standardisierten

Quarzküvette mithilfe des BioPhotometers von Eppendorf photometrisch gemessen. Der Photometer wurde mit 80 µl RNase-freiem Wasser kalibriert. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm. Da 40 µg RNA/ml einer Absorptionseinheit entsprechen, berechnet sich die RNA-Konzentration (µg/µl) einer Probe folgendermaßen:

$$\text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ µg RNA/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor (20)} : 1\ 000 \\ = \text{RNA-Konzentration (µg/µl)}$$

Das Absorptionsmaximum von Proteinen bzw. deren aromatischen Resten liegt bei 280 nm. Durch die Messung der Absorption in diesem Wellenlängenbereich, können Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe gezogen werden. Wenn der Quotient beider Absorptionswerte ($\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$) kleiner als 2,0 ist, muss von einer Kontamination der Proben ausgegangen werden.

4.2.6.3 cDNA Transkription mit Omniscript®

Um 0,5 µg RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, werden die entsprechenden µl jeder Probe mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 13 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe werden 7 µl „Mastermix“ zugegeben, gevortext und in einem Heizblock (37 °C) für 60 Minuten inkubiert.

„Mastermix“-Zusammensetzung pro Probe:

2 µl	10xBuffer-Reverse Transkriptase
2 µl	dNTP-Mix
2 µl	Random-Hexamer
0,25 µl	RNase-Out
1 µl	Omniscript-Reverse Transkriptase

Dank des Mastermix fand während der Phase im Heizblock folgendes Prozedere statt: Mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase wurde die isolierte RNA in cDNA transkribiert. Die neu gewonnene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser verdünnt (1:2), auf zwei 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.6.4 TaqMan®- *real-time* RT-PCR

Die *real-time* RT-PCR ermöglicht eine simultane, schnelle Amplifikation der erhaltenen cDNA. Während der Vervielfältigungszyklen misst diese standardisierte Methode den Zeitpunkt, an dem die Zielsequenz zum ersten Mal detektiert werden kann. Je höher die anfängliche Menge an Nukleinsäuren der Zielsequenz ist, desto früher wird ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, welches sich proportional zur Produktmenge verhält. Zum relativen Mengenvergleich wird ein Referenzgen (hier β 2-Mikroglobulin – β 2-M) zu Hilfe gezogen. Der Nachweis der synthetisierten Amplifikate erfolgte in der vorliegenden Arbeit mithilfe der hochspezifischen TaqMan®-Methodik.

Bei der *in vitro* Replikation lagern sich Primer und Sonden nach der Denaturierung der Doppelstränge der cDNA in einer Hybridisierungsreaktion spezifisch an ihre Zielsequenz. Somit können nur Gene detektiert werden, bei denen es während der *real-time* RT-PCR zur Amplifikation der Zielsequenz kommt. Die speziell eingesetzten fluorogenen Sonden, aus mehreren Nukleotiden, setzen sich an ihrem 5'-Ende aus einem fluoreszierende Reporter-Farbstoff (z.B. FAM = 6-Carboxyfluorescein) und an ihrem 3'-Ende aus einem Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA = 6-Carboxy-tetramethylrhodamin) zusammen. Wenn die Fluoreszenzfarbstoffe nahe beieinander liegen und durch eine spezifische Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden, unterdrückt der Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) das Reporter-Fluoreszenzsignal. Dank des folgenden Prinzips kann die Gesamtfluoreszenz der Amplifikate gemessen werden: Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase auf die fluorogene Sonde während der Extensionsphase der *real-time* RT-PCR werden die zwei Fluoreszenzfarbstoffe räumlich voneinander getrennt und die sequenzspezifische Reporterfluoreszenz steigt. Die Änderung der Fluoreszenz wird Zyklus für Zyklus in Echtzeit mit dem 7900HT Fast *real-time* RT-PCR System der Firma Applied Biosystems erfasst und mithilfe der Software SDS 2.4 weiterverarbeitet.

Zunächst wurde für jedes zu untersuchende Gen oder Housekeeping-Gens ein Vielfaches des folgenden Mastermix mit spezifischem Primer und entsprechender Sonde zusammengesetzt, um pro Probe ein Endvolumen von 25 μ l zu erreichen. Die Proben wurden zwischenzeitlich gevortext auf Eis verarbeitet.

Mastermix pro Probe:

11,25	µl	RNase-freies Wasser
12,5	µl	Universal PCR Mastermix (mit AmpliTaq Gold DNA-Polymerase)
1,25	µl	Primer-Sonden-Mix (genspezifischer Primer + entsprechende fluorogene Sonde) oder Housekeeping-Gen-Mix

Für jede Probe, genauso wie für die Negativkontrollen fand eine Doppelbestimmung statt. 50 µl des spezifischen Mastermix wurden in einem kleinen Eppendorf-Röhrchen mit 2 µl der entsprechenden cDNA versetzt, gevortext und auf zwei Well einer 96-Spitzwell-Platte aliquotiert (25 µl/Well). Die Negativkontrollen bestanden aus 50 µl reinem genspezifischen Mastermix und wurden ebenfalls aufgeteilt auf zwei Well der 96-Spitzwell-Platte (25 µl/Well).

Mit Adhäsiv-Folie wurde die Wellplatte vor Kontamination geschützt und in das 7900HT Fast *real-time* RT-PCR System gesetzt. Im Thermocycler liefen folgende Reaktionen nacheinander ab: Zunächst wurde die bei Raumtemperatur inaktive TaqPolymerase für 20 Minuten bei 95 °C erhitzt und somit das Enzym aktiviert. Anschließend folgten 40 Zyklen à 1 Minute (95 °C) zur Denaturierung der DNA und à 20 Minuten (60 °C) zur Anlagerung der Primer-Sonden und Amplifikation. Die reverse Transkription und Polymerisation liefen im Reaktionsgefäß direkt nacheinander ab.

4.2.6.5 Auswertung der TaqMan[®]-*real-time* RT-PCR

Die Änderung der sequenzspezifischen Reporterfluoreszenz lässt sich im Amplifikationsplot der SDS 2.4 Software ablesen. Die gemessene Fluoreszenzintensität (Δ RN) wird in Echtzeit gegen die Zyklusanzahl abgebildet. Sie spiegelt die spezifische Genexpression wider. Zur relativen Quantifizierung der Expressionsrate wird im Amplifikationsplot ein imaginärer Schnittpunkt festgelegt. Er entspricht dem Zeitpunkt, bzw. der Zyklusanzahl, an dem die Fluoreszenzintensität das zehnfache des Signalniveaus (engl.: *threshold*) der Hintergrundfluoreszenz der Sonden (engl.: *baseline*) übersteigt. Diese Schwelle wird als *Cycle-threshold* (ct) bezeichnet. Ein niedriger ct-Wert entspricht einer hohen mRNA-Expression der Ausgangsprobe und vice versa. Um die variierenden RNA-Mengen der Ausgangsproben auszugleichen wird für jede Probe parallel ein Referenzgen amplifiziert (hier das β 2-M). Die Differenz zwischen den ct-

Werten des Ziel- und Referenzgens führen zum korrigierten Δct -Wert des Zielgens. Um die Genexpressionsunterschiede in den drei Fraktionen besser vergleichen zu können, wurden die Δct -Werte der Proben mit niedrigem, mittlerem und hohem Autophagie-Niveau auf den Δct -Wert der Probe mit niedrigem Autophagie-Niveau normiert, sodass der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert entstand. Die relative Genexpression wurde anhand der $2^{(-\Delta\Delta\text{ct})}$ -Methode berechnet.

4.2.7 Graphische Darstellung und Statistische Analyse der Daten

Die graphischen Darstellungen der Daten wurden mithilfe des Programms OriginPro 2015G angefertigt. Die Auswertung der Daten fand anhand ungepaarter, zweiseitiger t -Tests statt. Aus diesen wurden statistische p -Werte berechnet. Statistisch signifikante Ergebnisse mit einem p -Wert $< 0,05$ sind mit * gekennzeichnet. Alle Daten basieren auf biologischen Replikaten unabhängiger Experimente. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) angegeben.

5 Ergebnisse

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID wurde eine relativ simple, reproduzierbare Methode etabliert, um JURKAT-Zellen durchflusszytometrisch nach ihrem Autophagie-Niveau zu sortieren (siehe Methodenteil ab Seite 39). Da alle Zellen ein basales Autophagie-Niveau aufweisen, konnten Autophagie-stimulierte, aber auch unstimulierte Zellen, untersucht werden. Sowohl die Abhängigkeit der Autophagie vom Zellzyklus als auch der Zusammenhang zwischen der Autophagie und der Chemosensibilität wurden mithilfe durchflusszytometrischer Messungen aufgezeigt. Unterstützend wurden mittels *real-time* RT-PCR Unterschiede auf Genexpressionsebene in den sortierten Zellen ermittelt.

5.1 Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID

5.1.1 Zytotoxizität von Cyto-ID bei Langzeitinkubation

Da die einzelnen Zellfraktionen nach der Sortierung Anschlussexperimente durchlaufen sollten und darum weiterkultiviert werden mussten, wurde zunächst geprüft, ob der Fluoreszenzfarbstoff nach längerer Inkubationszeit als den regulären 30 Minuten zelltoxisch ist. Dies wurde widerlegt, nach 24 Stunden Inkubation mit der üblichen Konzentration Cyto-ID (Verdünnung 1:1 000) zeigte sich sowohl in der behandelten als auch in der unbehandelten Population ein Zelltod von 8,0 % (siehe Abbildung 5). Somit konnten die Zellen nach dem Sortiervorgang bedenkenlos weiterkultiviert werden.

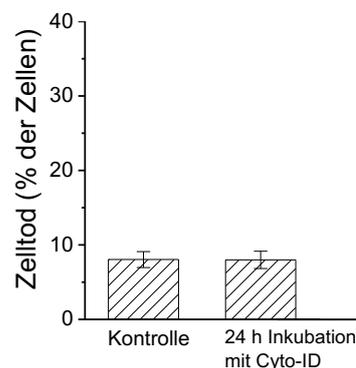


Abbildung 5: *Zytotoxizität von Cyto-ID bei Langzeitinkubation*

Bestimmung des Zelltodes in JURKAT-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Cyto-ID mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme. Kontrollgruppe sind Cyto-ID-ungefärbte JURKAT-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Doppelbestimmungen.

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

Wie zuvor erwähnt, wurde während der ersten Zellsortierversuche beobachtet, dass die Fluoreszenz der Population während des Messvorgangs abnimmt und zugleich der Einfluss der Zeit und der Temperatur auf das Fluorochrom in JURKAT-Zellen untersucht. Abbildung 6 zeigt, dass die Fluoreszenz von Cyto-ID stark temperaturabhängig ist. Zellen, die nach dem Einfärben auf Eis (2 °C) gestellt wurden, wiesen nach 15 Minuten eine relative Restfluoreszenz von 95 % auf. Nach gleicher Zeit wurde bei den Zellen bei Raumtemperatur (23 °C) 75 % Restfluoreszenz und den Zellen im Inkubator (37 °C) 52 % Restfluoreszenz detektiert. Nach 90 Minuten zeigten die Zellen auf Eis eine relative Restfluoreszenz von 92 %. Im Gegensatz dazu lag die relative Restfluoreszenz der Zellen im Inkubator nur noch bei 36 %.

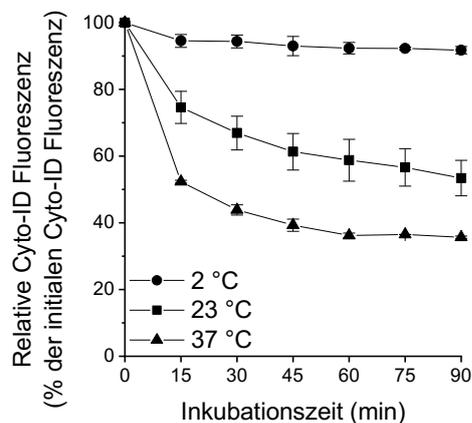


Abbildung 6: Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz

JURKAT-Zellen wurden mit Cyto-ID inkubiert und bei 2 °C, 22 °C und 37 °C weiterkultiviert. Als Startwert wurden je zwei Proben aus dem Eis gemessen und deren Fluoreszenzintensität als 100 % definiert. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde zu den angegebenen Zeitpunkten am FACS gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils zwei unabhängigen Messungen.

5.1.3 Durchflusszytometrische Messung zur Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Fraktionen

Nach dem neu etablierten Schema (siehe Methodenteil ab Seite 39) wurden unbehandelte JURKAT-Zellen entsprechend ihrer Cyto-ID-Fluoreszenz sortiert. Die relative Cyto-ID-Fluoreszenz lässt einen proportionalen Rückschluss auf die Autophagie-Aktivität in den sortierten Fraktionen zu. Es folgte die Analyse der zeitlichen Entwicklung der autophagozytotischen Aktivität und des Zelltodes. Die Autophagie-Aktivitäten in den drei Fraktionen blieben in dem gemessenen Zeitraum von 24 Stunden distinkt

voneinander getrennt und weisen auf einen erfolgreichen Sortiervorgang hin (siehe Abbildung 7A). In Bezug auf die autophagozytotische Aktivität der Fraktion mit mittlerem Autophagie-Niveau lag die Aktivität der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau fünf Stunden nach dem Sortiervorgang 0,44 Mal höher und die der Fraktion mit niedrigem Autophagie-Niveau 0,32 Mal niedriger. Alle drei Fraktionen konvergierten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. In den drei Fraktionen schien sich also wieder die ursprüngliche stochastische Verteilung bezüglich der Autophagie-Aktivität einzustellen.

Vergleicht man den prozentualen Zelltod in den drei Fraktionen ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Nach 5 Stunden hatten 5,4 % der Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau PI aufgenommen und 6,7 % der Zellen mit hohem Autophagie-Niveau (siehe Abbildung 7B). Weitere 19 Stunden später wiesen die Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau den höchsten Zelltod auf (14,5 %). Die unterschiedlichen Autophagieraten scheinen keinen signifikanten Einfluss auf den Zelltod in unbehandelten Zellen in Kultur zu nehmen.

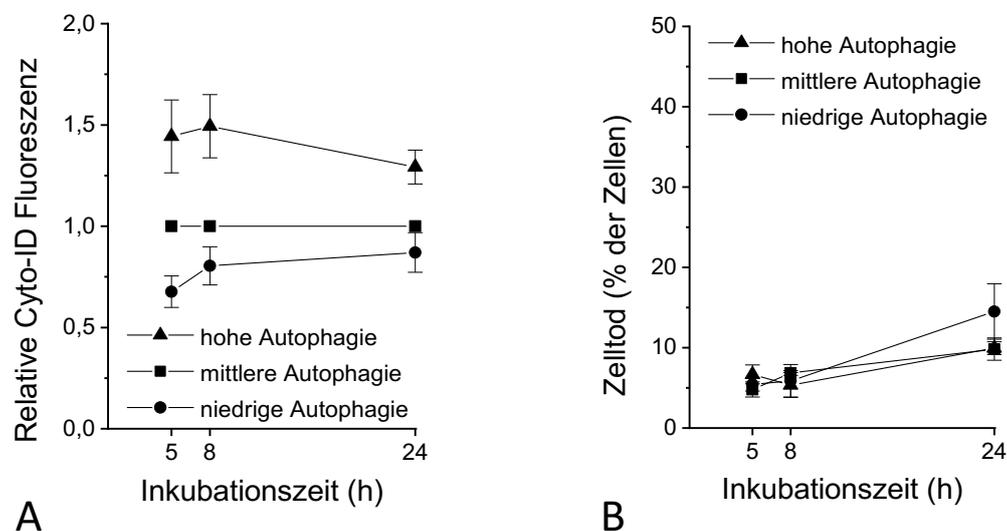


Abbildung 7: Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

JURKAT-Zellen wurden nach dem Sortiervorgang wieder in Medium ausgesät. Die durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessungen der drei Fraktionen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten. A: Bestimmung der Autophagie-Aktivität mittels Cyto-ID. Normierung auf die Zellen mit mittlerer Autophagie. B: Bestimmung des Zelltodes mittels PI-Aufnahme. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils vier unabhängigen Messungen.

5.2 Autophagie-Induktion durch Etoposid

Etoposid induzierte bei einer Konzentration von 0,2/ 0,3 μM und 24-stündiger Inkubation das 1,65 bzw. 2,07-Fache der Autophagie-Aktivität und einen Zelltod von 8,8 bzw. 11,2 % (siehe Abbildung 8). Andere potentiell Autophagie-aktivierende Wirkstoffe (z.B. Sirolimus, A769662, Carbamazepin, Calcitriol) zeigten in Vorversuchen an JURKAT-Zellen nicht die gewünschte Wirkung.

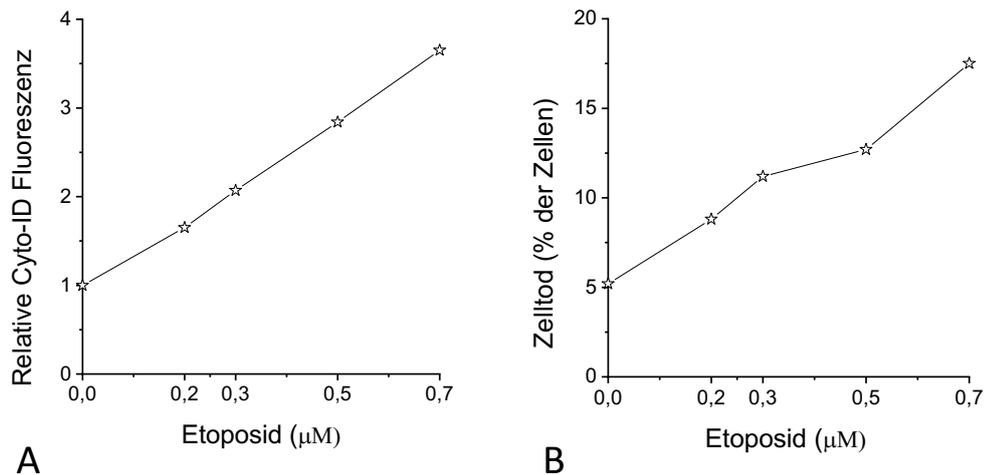


Abbildung 8: *Autophagieaktivität und Zelltod nach Behandlung mit Etoposid in JURKAT-Zellen*

JURKAT-Zellen wurden 24 Stunden mit Etoposid behandelt. Das relative Autophagie-Niveau (A) und der Zelltod (B) wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Fluoreszenz und der PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt ist eine Einfachbestimmung.

Um nachzuweisen, dass Etoposid tatsächlich den gesamten Autophagiemechanismus aktiviert und nicht nur zu einer Akkumulation von Autophagosomen führt, wurden Etoposid-stimulierte JURKAT-Zellen mit dem lysosomalen Inhibitor CQ behandelt. Vergleicht man die CQ-behandelten Zellen mit der Kontrollgruppe, kann man in erstgenannten einen steileren Anstieg der relativen Cyto-ID-Fluoreszenz beobachten (siehe Abbildung 9A). CQ verstärkt durch die Inhibition der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion die Akkumulierung der Autophagosomen und bestätigt somit den durch Etoposid induzierten Autophagieefflux. Etoposid-behandelte Zellen wiesen einen etwas höheren Zelltod auf als die Kontrollgruppe (siehe Abbildung 9B).

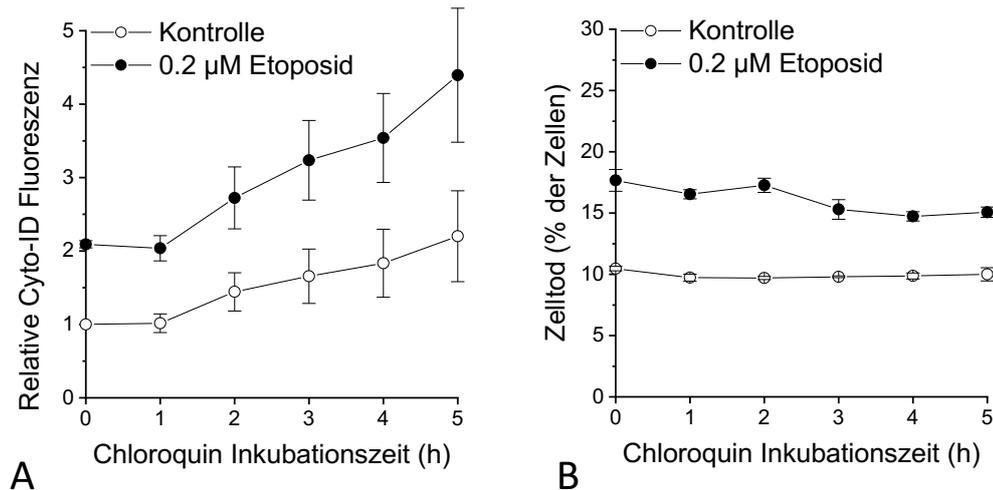


Abbildung 9: Nachweis des Etoposid-stimulierten Autophagieflux in JURKAT-Zellen

JURKAT-Zellen wurden 24 Stunden mit dem Autophagie-Aktivator Etoposid (0,2 µM) behandelt. Es folgte eine Inkubationskinetik mit 10 µM CQ über 5 Stunden. Das relative Autophagie-Niveau (A) und der Zelltod (B) wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Fluoreszenz bzw. der PI-Aufnahme bestimmt. Die relative Cyto-ID-Fluoreszenz wurde auf den Startwert der Kontrollgruppe normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Messungen.

5.3 Zusammenhang zwischen Autophagie und Zellzyklus

5.3.1 Zellzyklusanalyse in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Dank der neu etablierten Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID, erfolgter Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffes und Auswahl eines geeigneten Autophagie-Aktivators konnten die Fraktionen näher untersucht werden.

5.3.1.1 Unbehandelte Zellen

Zunächst wurden unbehandelte Zellen nach ihrem basalen Autophagie-Niveau sortiert. Abbildung 10A verdeutlicht die Zellzyklusphasen-abhängige Verteilung der Zellen direkt im Anschluss an die Zellsortierung nach Autophagie-Niveau. 88 % der Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau befanden sich in der G1-Phase und 5 % in der G2/M-Phase. Im Gegensatz dazu waren in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau 46 % in der G1-Phase und 39 % in der G2/M-Phase. Dies lässt vermuten, dass Zellen in der G2/M-Phase eine höhere Autophagie-Aktivität aufweisen als Zellen in der G1-Phase. Die Verteilung der Zellen in der S-Phase stieg von 6 % in der Fraktion mit niedrigem

Autophagie-Niveau auf 14 % in den Fraktionen mit mittlerer und hoher Autophagie-Aktivität.

Nach 24 Stunden (siehe Abbildung 10 B-E) ging diese Autophagie-abhängige Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen verloren. Die Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau befanden sich nur noch zu 22 % in der G1-Phase, dafür jedoch zu 18 % in der S-Phase und zu 58 % in der G2/M-Phase. In der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau ging der prozentuale Anteil der Zellen in G1 etwas zurück auf 34 %. Dafür stieg der Anteil der Zellen in der S-Phase und G2/M-Phase etwas an. Nach 48 Stunden pendelte sich der prozentuale Anteil der sortierten Fraktionen in den jeweiligen Phasen um ähnliche Werte ein. 46 % der Zellen befanden sich in der G1-Phase, 15 % in der S-Phase und 38 % in der G2/M-Phase (Mittelwert der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen der drei Fraktionen). Die Zellen in der sub-G1-Phase blieben über den untersuchten Zeitraum konstant niedrig, unter 4 %.

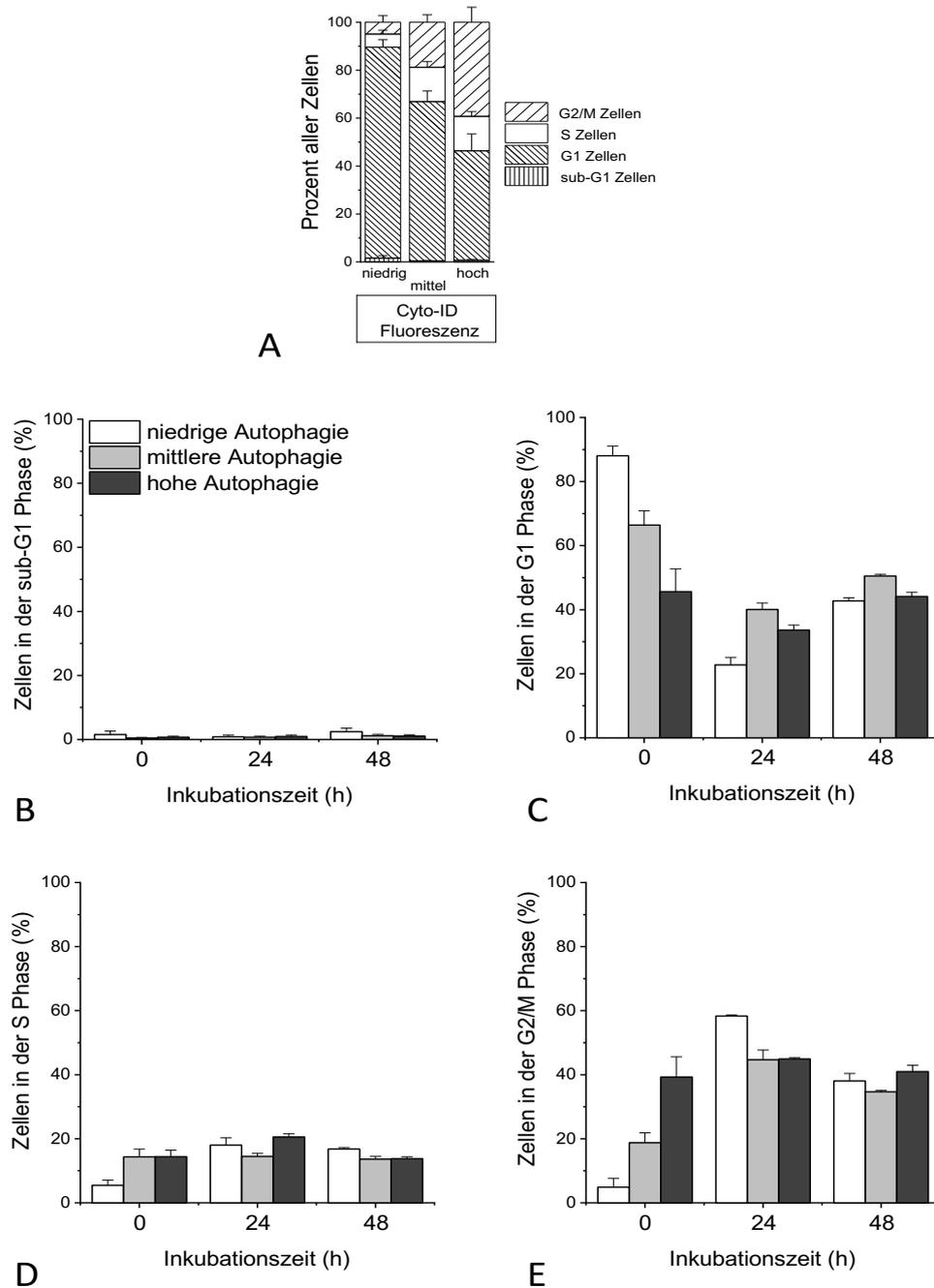


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklus in unbehandelten, Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Unbehandelte nach Cyto-ID-Fluoreszenz-sortierte JURKAT-Zellen. Nach der Zellsortierung wurden die Zellen über den angegebenen Zeitraum weiterkultiviert. Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte über durchflusszytometrische Analyse der PI-Färbung Ethanol-fixierter Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Messungen. **A:** Darstellung des prozentualen Anteils aller sortierten Zellen der drei Fraktionen in den Zellzyklusphasen direkt nach dem Sortiervorgang **B-E:** Darstellung des prozentualen Anteils aller Zellen der drei Fraktionen in den Zellzyklusphasen über 48 Stunden.

5.3.1.2 Autophagie-induzierte Zellen

Vergleichend wurden Autophagie-induzierte Zellen sortiert. Die Zellpopulation wurde für 24 Stunden mit 0,3 μ M Etoposid inkubiert und anschließend nach Autophagie-Niveau in drei Fraktionen getrennt.

Abbildung 11A verdeutlicht die Verteilung der Zellen direkt im Anschluss an die Zellsortierung. Wie bei unbehandelten JURKAT-Zellen war der prozentuale Anteil an Zellen in der G2/M-Phase in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau am höchsten (88 %), im Gegensatz dazu waren 53 % der Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau in der G2/M-Phase. Auch die Zellen in der G1-Phase wiesen einen Zusammenhang mit dem Autophagie-Niveau auf. Nur 7 % der Zellen mit hohem Autophagie-Niveau befanden sich in der G1-Phase, im Gegensatz dazu waren es 33 % mit niedrigem Autophagie-Niveau. Die Schwankungen in der S-Phase waren weniger bedeutend, der prozentuale Anteil nahm von den Zellen mit niedrigem zu hohem Autophagie-Niveau ab. Es war ein G2/M-Arrest zu beobachten. In allen drei Fraktionen zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine deutliche Verschiebung der prozentualen Zellverteilung zugunsten der G2/M-Phase.

Über einen Zeitraum von 48 Stunden (siehe Abbildung 11 B-E) nahm der prozentuale Anteil an Zellen mit hohem Autophagie-Niveau in der G1-Phase zu und in der G2/M-Phase ab. Grundsätzlich befanden sich in allen drei Fraktionen mehr Zellen in der G2/M-Phase als bei den unbehandelten Zellen. Auch in den stimulierten Zellen pendelte sich der prozentuale Anteil der sortierten Fraktionen nach 48 Stunden in den jeweiligen Phasen um ähnliche Werte ein. 40 % der Zellen befanden sich in der G1-Phase, 14 % in der S-Phase und 37 % in der G2/M-Phase (Mittelwert der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen der drei Fraktionen). Der prozentuale Anteil der Zellen in der sub-G1-Phase war direkt nach dem Sortiervorgang verschwindend gering, stieg im Mittel nach 24 Stunden auf 6 % und nach 48 Stunden auf 9 %.

Interessanterweise zeigte sich in den unbehandelten und in den Etoposid-stimulierten Fraktionen eine deutliche Korrelation zwischen der Zellzyklusphase, in der sich eine Zelle befindet, und ihrer Autophagie-Aktivität.

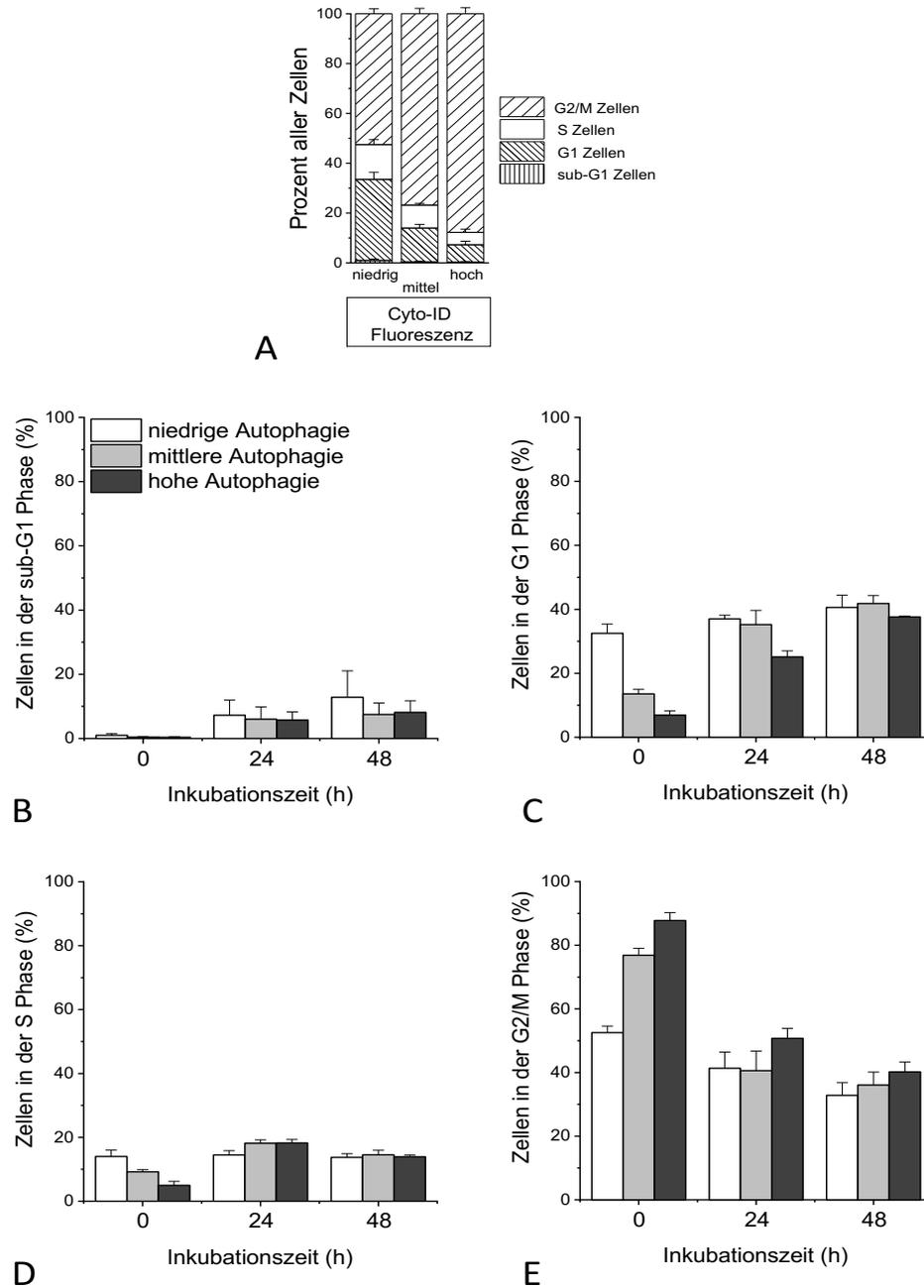


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklus in Etoposid-stimulierten, Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Behandlung der JURKAT-Zellen mit $0,3 \mu\text{M}$ Etoposid, Inkubation für 24 Stunden. Im Anschluss nach Cyto-ID-Fluoreszenz sortiert. Nach der Zellsortierung wurden die Zellen über den angegebenen Zeitraum weiterkultiviert. Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte über durchflusszytometrische Analyse der PI-Färbung Ethanol-fixierter Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Messungen. **A:** Darstellung des prozentualen Anteils aller Zellen der drei Fraktionen in den Zellzyklusphasen direkt nach dem Sortiervorgang **B-E:** Darstellung des prozentualen Anteils aller Zellen der drei Fraktionen in den Zellzyklusphasen über 48 Stunden.

5.3.2 Genexpressionsmuster Autophagie- und Zellzyklus-relevanter Gene in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Um dem Zusammenhang zwischen Autophagiemechanismus und Zellzyklusphase nachzugehen, wurden Genexpressionsmuster ausgewählter Zellzyklus- und Autophagie-relevanter Gene untersucht. Die semiquantitative Expressionsbestimmung auf mRNA-Ebene fand mittels *real-time* RT-PCR statt. Diese wurde in den sortierten Fraktionen verglichen.

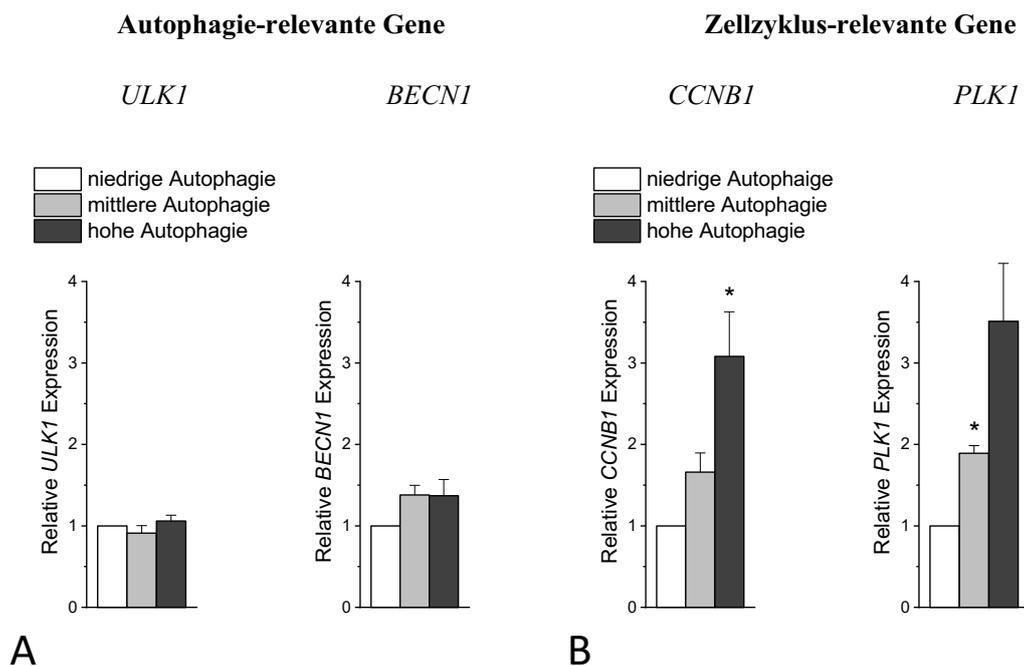


Abbildung 12: Relative Expression der ULK1-, BECN1-, CCNB1- und PLK1-mRNA in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Die RNA der drei Fraktionen wurde direkt im Anschluss an den Sortiervorgang nach Autophagie-Niveau isoliert und die Genexpressionsmuster mittels *real-time* RT-PCR ermittelt. Als Referenzgen wurde die Expression von β 2-M herangezogen. Die Genexpression der Fraktion der mittleren und hohen Autophagie wurde auf die mit niedrigem Autophagie-Niveau normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Messungen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Fraktionen.

ULK1 und BECN1: ULK1 (codiert vom *ULK1*-Gen) ist Teil des ULK-Komplexes, dem Knotenpunkt bei der Initiation der Autophagie. Je nach Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsstatus führen Stresssignale zur Formation von Autophagosomen (Zachari und Ganley 2017). ULK1 wird von den energie- und nährstoffsensiblen Kinasen AMPK und mTOR, direkt bzw. indirekt, aktiviert und phosphoryliert nachfolgend

Beclin1 (codiert vom *BECN1*-Gen) des *class III* PI3K-Komplexes, welches wiederum zur PI3P-Produktion durch Vps34 des *class III* PI3K-Komplexes führt (Zhi et al. 2017). Beclin1 ist außerdem für die Retention des Phagophors an der Lipiddoppelschicht der ER-Membran verantwortlich (Mercer et al. 2018).

Auf Expressionsebene zeigten sich in den nach Autophagie-Niveau sortierten Fraktionen keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression der *ATG*-Gene *ULK1* und *BECN1* (siehe Abbildung 12A). Lediglich die *BECN1*-mRNA-Expression war in den Fraktionen mit mittlerem und hohem Autophagie-Niveau geringfügig erhöht.

***CCNB1* und *PLK1*:** Das mitosespezifische Cyclin B1 (codiert vom *CCNB1*-Gen) wird zu Beginn der M-Phase exprimiert, bildet dann einen Komplex mit CDK1 und ist essentiell, um die Ereignisse der Mitosephase einzuleiten (Brown et al. 2015). Eine Cdc25-Phosphatase reguliert den Cyclin B1-CDK1-Komplex (Jackman et al. 2003). Sie wird bei DNA-Schäden inaktiviert und führt im weiteren Verlauf zum G2-Zellzyklusarrest (Zheng et al. 2019). Die Phosphatase wiederum wird von der PLK1 (codiert vom *PLK1* Gen) phosphoryliert und aktiviert (Roshak et al. 2000), die somit die Transition der G2 zur M-Phase initiiert (Karlsson-Rosenthal und Millar 2006).

Abbildung 12B zeigt, dass die Expressionsmuster der Zellzyklus-relevanten Gene mit den vorangegangenen Ergebnissen korrelieren. Die signifikant erhöhte *CCNB1*- und *PLK1*-mRNA-Expression in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau zeigt die enge Relation zwischen Zellzyklusphase und Autophagie-Aktivität.

5.4 Einfluss des Autophagie-Niveaus auf die Chemosensibilität

Es ist nach wie vor ungeklärt, ob ein hohes oder niedriges Autophagie-Niveau in der Krebstherapie günstig ist. Das Ansprechen auf Chemotherapeutika wurde vergleichend in nach Autophagie-Niveau sortierten Fraktionen untersucht. Als neue Herangehensweise diente die Methode der Zellsortierung nach Cyto-ID-Fluoreszenz. Die Zellen wurden nach Autophagie-Niveau sortiert und anschließend mit verschiedenen Zytostatika-Konzentrationen behandelt: Cytarabin und Etoposid.

5.4.1 Vorversuche Zytostatika

Zunächst fand die Ermittlung der optimalen Konzentrations-Wirkungsbeziehung bei 24-stündiger Wirkstoff-Inkubation statt. Abbildung 13 stellt die konzentrationsabhängigen

Effekte der Zytostatika Cytarabin und Etoposid in unsortierten Zellen auf den Zelltod dar. In den Experimenten kamen folgende ausgewählte Konzentrationsreihen zum Einsatz: Für die Behandlung mit Cytarabin: 250 nM, 500 nM und 1 000 nM; sowie für die Behandlung mit Etoposid: 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M.

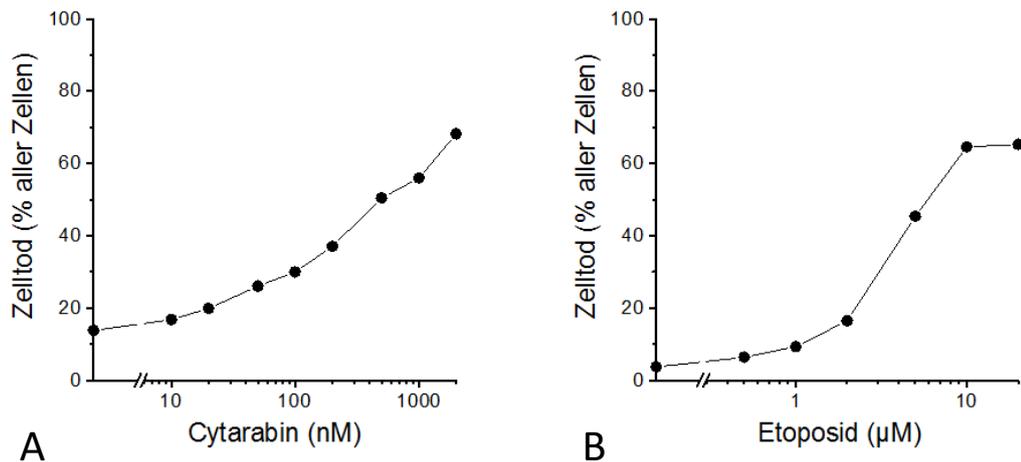


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Zytostatika in JURKAT-Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden mit Cytarabin (A) und Etoposid (B) behandelt. Der Zelltod wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt ist eine Einfachbestimmung.

5.4.2 Chemosensibilität in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Zur Analyse von Differenzen in den nach Autophagie-Niveau sortierten Fraktionen hinsichtlich der Sensibilität auf Chemotherapeutika wurden nur unbehandelte Zellen im FACS sortiert. Um die Ergebnisse bezüglich der Zelltoxizität nicht zu verfälschen, wurde ohne den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PI sortiert. Die Zellen wurden unmittelbar nach Sortierung mit den aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationen behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Zelltod wie auch $\Delta\Psi_m$ -Verlust mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Obwohl die ausgewählten Zytostatika in unterschiedliche zelluläre Mechanismen eingreifen, zeigten sich bei beiden keine signifikanten Unterschiede in den nach Autophagie-Niveau sortierten Fraktionen hinsichtlich der Chemosensibilität (siehe Abbildung 14). Tendenziell wurden in der DiOC₆(3)-Analyse stärkere Effekte beobachtet als in der PI-Analyse, was darauf hindeutet, dass der Verlust des $\Delta\Psi_m$ dem Eintreten des Zelltodes vorausging.

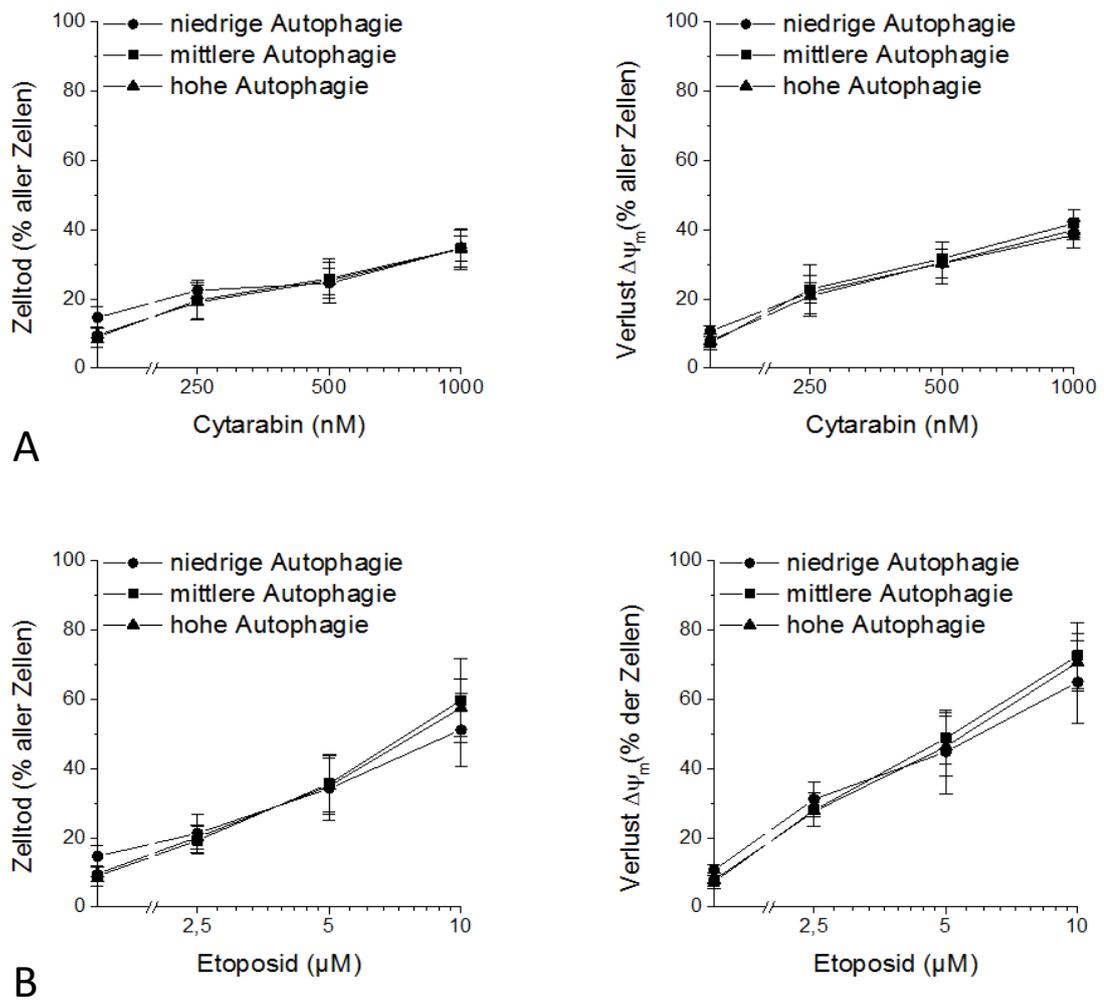


Abbildung 14: Vergleich der Chemosensibilität Cyto-ID-sortierter JURKAT-Zellen

Cyto-ID-sortierte JURKAT-Zellen wurden mit Cytarabin (A) und Etoposid (B) für 24 Stunden behandelt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme, die des Verlustes des $\Delta\Psi_m$ mittels DiOC₆(3)-Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils vier unabhängigen Messungen.

6 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, erstmalig eine reproduzierbare Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau zu etablieren, um die konstitutive Autophagie-Aktivität näher beleuchten zu können. Die Weiterentwicklung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau, hier anhand einer ALL-Zelllinie (JURKAT), bildete die Grundlage, um den Zusammenhang zwischen Autophagie und Zellzyklus sowie Chemosensibilität zu untersuchen.

Mithilfe des Autophagosomen-färbenden Fluoreszenzfarbstoffes Cyto-ID konnten unbehandelte Zellpopulationen in drei Fraktionen mit niedrigem, mittlerem und hohem Autophagie-Niveau getrennt werden, wobei sich die Autophagie-Aktivität über einen Zeitraum von 24 Stunden nachweislich unterschied. Auf Transkriptionsebene konnten bezüglich der *ATG*-Gene *ULK1* und *BECN1* keine signifikanten Abstufungen verzeichnet werden. Die Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffes ergab bei Langzeitinkubation keine Zytotoxizität. Die beobachtete Wärmesensibilität konnte durch einen Sortiervorgang bei 4 °C umgangen werden. Mit besonderem Augenmerk auf den Zusammenhang zwischen Autophagie und Zellzyklus konnte in einer Zellpopulation mit konstitutivem Autophagie-Niveau dank der Methode der Zellsortierung eine deutliche Korrelation zwischen hohem Autophagie-Niveau und der G2/M-Phase einer Zelle nachgewiesen werden. Dieselben Ergebnisse zeigten sich bei einer stimulierten Zellpopulation mit dem Autophagie-Aktivator Etoposid. Auch auf Transkriptionsebene konnte dieses Phänomen bestätigt werden, die Expressionen der G2/M-Markergene *CCNB1* und *PLK1* nahmen in den sortierten Fraktionen sukzessiv, entsprechend der Autophagie-Aktivität, zu. Letztlich wurde mithilfe der Methode der Zellsortierung die Rolle der konstitutiven Autophagie-Aktivität in Bezug auf die Chemosensibilität in JURKAT-Zellen untersucht. In den sortierten Fraktionen zeigte sich keine signifikante Differenz der Reaktion auf die Chemotherapeutika (Cytarabin und Etoposid).

Die Möglichkeit nach der Zellsortierung beliebige Anschlussexperimente durchzuführen, bietet Aussichten für die weitere Charakterisierung der konstitutiven Autophagie-Aktivität in sortierten Zellfraktionen und leistet somit einen Beitrag zur Erforschung der Autophagie-Grundlagen.

6.1 Etablierung der Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau mittels Cyto-ID

Die Grundlage der Zellsortierung stellt das FACS dar, welches es ermöglicht, eine Zellpopulation nach einem bestimmten Kriterium in Fraktionen zu trennen. Gump et al. (2014) gelang es erstmals, Zellen mittels Durchflusszytometer nach ihrem Autophagie-Niveau zu sortieren. Dabei wurden die Zellen in solche mit hohem und niedrigem Autophagieflux getrennt. Als Fluoreszenzfarbstoff und Autophagieflux-Marker wurde mCherry-GFP-LC3 herangezogen. Die erfolgreiche Trennung der Autophagie-Fraktionen wurde mittels Immunblot (anhand der ATG-Proteine LC3 und p62), Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie validiert (Gump et al. 2014). In unserer Arbeitsgruppe wurde bis dahin vereinzelt versucht, Zellen mithilfe des Autophagosomen-Markers Cyto-ID nach Autophagie-Niveau zu sortieren. Im Vergleich zu der von Gump et al. (2014) eingesetzten Methode, bei der über Transfektion eines Fluoreszenzfarbstoff-codierenden Plasmids die Autophagie-Aktivität detektiert wird (mCherry-GFP-LC3: siehe Detektion des Autophagie-Niveaus in Zellkulturen, Seite 17), kann beim Autophagie-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID auf diese genmanipulierende Komponente verzichtet werden. Erwiesenermaßen können ursprünglich als neutral betrachtete Genmanipulationen, wie beispielsweise die Transfektion eines Reporter-Gens, zu genetischen Variabilitäten innerhalb einer klonalen Zelllinie und folglich zu Abweichungen in der Genexpressionen oder zu unterschiedlichen Reaktionen auf Pharmakotherapie führen (Ben-David et al. 2018). Die ersten Experimente mit MOLM-13-Zellen (AML-Zellen) zeigten, dass die Zellsortierung mittels Cyto-ID prinzipiell möglich ist, die Methode aber systematischer Optimierungen bedarf. Ziel dieser Arbeit war es, eine reproduzierbare Methode zu entwickeln und zu etablieren, die es ermöglicht, die Aspekte der Autophagie auf ihren unterschiedlichen Niveaus zu beleuchten.

In einem Vergleich von 16 verschiedenen Zelllinien fand man heraus, dass Lymphozyten am besten geeignet sind, um die Autophagie-Aktivität zu bestimmen und dementsprechend zu sortieren (Gump und Thorburn 2014). Folglich wurde in nachfolgenden Experimenten die nicht adhärente ALL-Zelllinie JURKAT genutzt. Diese Suspensionszelllinie bedarf keiner Trypsinierung, die als zusätzlicher Stressor die Autophagie modulieren könnte (Huang et al. 2010).

Als Autophagie-spezifischer Marker wurde Cyto-ID gewählt, der bereits zur durchflusszytometrischen Analyse des Autophagie-Niveaus in JURKAT-Zellen validiert wurde (Chan et al. 2012) und anschließend genauer charakterisiert. In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität des Fluoreszenzfarbstoffes untersucht, um eine anschließende Weiterkultivierung der Zellen zu ermöglichen. Cyto-ID nahm keinen Einfluss auf den Zelltod in JURKAT-Zellen. Auch nach der Zellsortierung konnte eine Zytotoxizität von Cyto-ID ausgeschlossen werden (Zelltodanalyse (Zellen in der sub-G1 Phase), Chemosensibilität (Konzentration=0)). Weitere Versuche zeigten, dass die Fluoreszenz von Cyto-ID stark temperaturabhängig ist. Während Zellen auf Eis (2 °C) nach 90 Minuten eine relative Restfluoreszenz von 92 % aufwiesen, waren es bei den Zellen im Inkubator (37 °C) nur noch 36 %. Infolge wurden die Zellen mit Rücksicht auf die Temperatursensibilität mithilfe des BD FACSAria™ Fusion Durchflusszytometer bei 4 °C sortiert. Der starke Fluoreszenzabfall bei einer Temperatur von 37 °C im Inkubator ermöglicht eine erneute Messung des Autophagie-Niveaus mittels Cyto-ID nach 24 Stunden, ohne Detektion des Cyto-ID-Fluoreszenzfarbstoffes, welcher zur Zellsortierung zugegeben wurde.

Da alle Zellen eine konstitutive Autophagie-Rate aufweisen (Klionsky et al. 2011), konnten unstimulierte Zellpopulationen sortiert werden. Außerdem konnte die Dauer des Sortiervorgangs bis zum Erreichen der gewünschten Zellzahl durch sukzessive Optimierung der Methode auf eine Stunde verkürzt werden (siehe Tabelle 5: Entwicklungsprozess der Methode der Zellsortierung nach Cyto-ID bezüglich der gesammelten Zellzahl, Seite 41). Ferner wurde die Abnahme der Fluoreszenz über den Zeitraum des Sortiervorgangs manuell angepasst (siehe Tabelle 6: Cyto-ID-Fluoreszenzabnahme während des Sortiervorgangs, Seite 42). Der Fehler, der dadurch zustande kommt, wurde durch den stetigen Vergleich der drei Fraktionen nivelliert. Die rasche Abnahme der Cyto-ID-Fluoreszenz im Inkubator (37 °C) lässt vermuten, dass sich das Fluorochrom nicht in den Zellen ablagert und wirkt sich vorteilhaft auf die Weiterkultivierung der Zellen aus. Um die Einflüsse der Nährstoffmangel-induzierten Autophagie im Rahmen der Zellsortierung bestmöglich zu minimieren, wurde in die Sammelröhrchen des FACS-Gerätes Medium vorgelegt. Sobald das Röhrchen gefüllt war, wurde die nährstofflose Sortierflüssigkeit ausgewaschen und die sortierten Zellen in frischem Medium resuspendiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass die

Cyto-ID-Fluoreszenz nicht sortierter Zellen dem Durchschnitt der sortierten Zellfraktionen gleich und folglich durch den Sortiervorgang keine Änderung der Autophagie zu verzeichnen ist (persönliche Mitteilung von Dr. Jürgen Sonnemann).

Cyto-ID ermöglicht eine simple, nicht zelltoxische, quantitative Abschätzung des Autophagieflux ohne genmanipulierende Komponente, mit hoher Spezifität und Sensitivität im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden. Folglich wurde der Fluoreszenzfarbstoff als geeignet erachtet und konnte für die Etablierung einer Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau herangezogen werden.

6.1.1 Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Da die neu etablierte Methode der Zellsortierung primär der anschließenden Untersuchung beliebiger zellbiologischer Eigenschaften dienen sollte, wurde das Verhalten der sortierten Zellen über 24 Stunden beobachtet. Die Fraktionen unterschieden sich über einen Zeitraum von 8 Stunden nachweislich in ihrer Autophagie-Aktivität. Nach 24 Stunden näherten sich die Fraktionen der Subpopulation mit mittlerem Autophagie-Niveau. Auch Gump et al. (2014) beschrieben in den mCherry-GFP-LC3-sortierten Zellen drei distinkte Subpopulationen über mindestens 4 Stunden, nach 24 Stunden konvergierten die Fluoreszenzen der Fraktionen; auch auf Proteinebene zeigten sich nach 24 Stunden keine Unterschiede mehr (Gump et al. 2014). Für die Duplikationsdauer der JURKAT-Zellen wurden 30 Stunden ermittelt (siehe Abbildung 3: Verdopplungszeit JURKAT-Zellen, Seite 34). Dass sich die sortierten JURKAT-Fraktionen nach 24 Stunden einander annäherten, legt nahe, dass die Unterschiede nicht auf der Heterogenität der Genexpression beruhen. Die Variation innerhalb einer unberührten Zellpopulation beruht wahrscheinlich vielmehr auf der stochastischen Fluktuation der Level bzw. Aktivitäten von Autophagie-Regulatoren (Gump et al. 2014). Bezüglich des Zelltodes zeigten sich über 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede in den sortierten Fraktionen. Als nächstes sollte analysiert werden, ob sich die sortierten Fraktionen in der Expression Autophagie-relevanter Gene unterscheiden.

6.1.2 Expression von *ATG*-Genen in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen

Die Autophagie-relevanten Proteine ULK1 (Gen: *ULK1*) und Beclin1 (Gen: *BECN1*) sind an der Initiation des Autophagieprozesses beteiligt. Bei der Analyse der Genexpression

dieser beiden Proteine konnten keine signifikanten Unterschiede in den nach Autophagie-Niveau sortierten Zellfraktionen nachgewiesen werden. Die *ULK1*-mRNA-Expression entsprach sich in den drei sortierten Gruppen, lediglich die *BECNI*-mRNA-Expression zeigte eine leicht aufsteigende Tendenz von der Fraktion mit niedriger zu hoher Autophagie-Aktivität.

Gleichermaßen dokumentierten Martinet et al. (2006) weder eine signifikant erhöhte *BECNI*-mRNA-Expression, noch eine Änderung des Beclin1-Expressionslevels in durch Nährstoffmangel Autophagie-induzierten HepG2-Zellen. Bei der Autophagie-Aktivierung muss zwischen zwei Phasen differenziert werden: Dem schnellen Anstieg des Autophagieflux als Antwort auf Stressereignisse innerhalb von Minuten bis Stunden, der hauptsächlich über die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM) reguliert wird, und diesem folgend eine verzögerte, anhaltende Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die über die Transkription und Translation zu einer verstärkten Proteinexpression führen (Pietrocola et al. 2013). PTMs beeinflussen die Proteinstruktur, deren Stabilität und biologische Funktion (Morel et al. 2017). Diese Modifikationen veranlassen Interaktionen mit anderen Proteinen oder Lokalisationsänderungen. Die meisten Schlüsselproteine der Autophagie werden posttranslational modifiziert, beispielsweise über Phosphorylierung, Acetylierung oder Ubiquitinierung (McEwan und Dikic 2011). ATG-Proteine, wie ULK1 und Beclin1, sind Zielobjekt der Ubiquitinierung. Die ULK1-Ubiquitinierung kann einerseits den ULK1-Komplex stabilisieren und somit seine Aktivität während der Autophagie-Induktion fördern (Morel et al. 2017). Sie kann andererseits aber auch zur Autophagie-Inhibition über den Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom führen (Zachari und Ganley 2017). Die Ubiquitinierung von Beclin1 führt zu seinem Abbau im Proteasom, umgekehrt bewirkt die Deubiquitinierung von Beclin1 die Aktivierung der Autophagie (Morel et al. 2017). Die Proteinlevel können neben dem Abbau auch über ihre Synthese reguliert werden. Die Regulation der Autophagie auf Transkriptionsebene manifestiert sich als sehr komplex, bisher sind über 20 Transkriptionsfaktoren bekannt, die im Autophagieprozess involviert sind (Fullgrabe et al. 2016). Besonders *ULK1* und *BECNI* weisen eine hohe Anzahl regulatorischer Transkriptions-Aktivatoren auf, dies deutet auf ihre Schlüsselrolle in der Autophagie-Aktivierung durch diverse Stimuli hin (Fullgrabe et al. 2016).

Dank der PTM lässt sich der Autophagiemechanismus schnell aktivieren und erklärt womöglich weshalb sich die relative Genexpression von *ULK1* und *BECN1*, die vor allem an der Initiation der Autophagie beteiligt sind, in den sortierten Fraktionen kaum unterscheidet. Cyto-ID markiert Autophagosomen, also das Produkt der Autophagie-Induktion und zeigt somit, ob der Prozess aktiviert und durchlaufen wurde. Ein Markerprotein für die Autophagosomenformation ist LC3-II. Das membrangebundenen LC3-II geht erst bei initiiertem Autophagieprozess durch Konjugation mit einer PE-Gruppe aus dem zytosolischen LC3-I hervor und befindet sich an der Innen- und Außenseite des Phagophors, der Vorläuferstruktur des Autophagosoms (Mercer et al. 2018). In unserer Arbeitsgruppe konnte mittels Immunoblot, den drei sortierten Fraktionen entsprechend, ein gradueller Anstieg des LC3-II-Levels festgestellt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Jürgen Sonnemann). Somit konnte die erfolgreiche Zellsortierung der drei Fraktionen nach Autophagie-Niveau validiert werden.

6.2 Induktion des Autophagieflux durch den Autophagie-Modulator Etoposid in JURKAT-Zellen

Neben der Zellsortierung nach konstitutiver Autophagie-Aktivität sollten vergleichend auch pharmakologisch Autophagie-stimulierte Zellen nach Autophagie-Niveau getrennt werden. Etoposid aktivierte in Vorversuchen die Autophagie in JURKAT-Zellen. Bei Konzentrationen von 0,2 und 0,3 μM stieg die Autophagie-Aktivität in der stimulierten Population auf das 1,65- bzw. 2,07-Fache an, während der Zelltod bei 8,8 bzw. 11,2 % lag. Der Wirkstoff stellte in diesem Konzentrationsbereich einen guten Kompromiss aus hoher Autophagie-Aktivierung bei zugleich relativ geringem Zelltod dar.

Die tatsächliche Autophagieflux-Aktivierung in Etoposid-behandelten JURKAT-Zellen konnte anhand von CQ bestätigt werden. In einer 5-stündigen Inkubationskinetik mit CQ wurden Zellen exemplarisch mit einer Etoposid-Konzentration von 0,2 μM behandelt und mit einer unstimulierten Kontrollgruppe verglichen. Zeitgleich zur Hemmung des Autophagosomen-Abbaus durch den Autophagie-Inhibitor CQ nahm die Cyto-ID Fluoreszenz in den Etoposid-behandelten Zellen stärker zu als in der Kontrollgruppe. In diesem Experiment wurde überdies abermals bestätigt, dass der Fluoreszenzfarbstoff geeignet ist, um einen Autophagieflux nachzuweisen. Wie zu erwarten war der Zelltod in

Etoposid-behandelten Zellen zur Kontrollgruppe erhöht, die Differenz belief sich stets auf unter 10 % und veränderte sich über die Inkubationszeit von CQ kaum.

Anzumerken ist, dass Etoposid einen konzentrationsabhängigen und zelllinienabhängigen (in HeLa- bzw. nMuMG-Zellen (Brustdrüsenepithelzellen einer Maus-Zelllinie)) G2/M-Phase-Arrest auszulösen vermag (Sakaue-Sawano et al. 2011). Andere wiederum beobachteten einen G1/S-Phase-Arrest in Etoposid-induzierten Hep3B-Zellen (isolierte humane hepatozelluläre Karzinomzellen) (Yoo et al. 2012). Da Etoposid sowohl die Autophagie moduliert als auch in den Zellzyklus eingreift, war es interessant, die Zellzyklusprofile Etoposid-behandelter, nach Autophagie-Niveau-sortierter Zellen zu analysieren. Vergleichend wurden die Zellzyklusprofile unstimulierter Zellen beobachtet, um den Zusammenhang zwischen Autophagie-Aktivität und Zellzyklusphase einer Zelle zu untersuchen.

6.3 Assoziation zwischen hohem Autophagie-Niveau und G2/M-Phase des Zellzyklus in JURKAT-Zellen

Mittlerweile ist unumstritten, dass eine enge Korrelation zwischen der Autophagie- und Zellzyklusregulation herrscht (Zheng et al. 2019), dennoch gibt es multiple kontroverse Diskussionen in welcher der Zellzyklusphasen die Autophagie hochreguliert ist. Während die Autophagie in allen Phasen des Zellzyklus aktiv zu sein scheint (Liu et al. 2009, Kaminsky et al. 2011, Li et al. 2016), plädieren einige für eine vermehrte Aktivierung in der frühen Interphase (G1 und S-Phase) (Tasdemir et al. 2007), andere in der frühen Mitose- und S-Phase (Li et al. 2016) und dritte wiederum beschreiben einen G2/M-Arrest bei pharmakologischer Autophagie-Induktion (Pathania et al. 2016, Filippi-Chiela et al. 2011, Kuo et al. 2006). Die verschiedenen Erkenntnisse basieren wahrscheinlich auf den vielfältigen experimentellen Herangehensweisen und Interpretationen. Problematisch in vielen Studien ist, dass in den Experimenten Autophagie-Aktivatoren bzw. -Inhibitoren angewendet werden, die erwiesenermaßen unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus haben können. Des Weiteren greifen in einigen der genannten Studien, die zur Synchronisierung der Zellzyklusphasen genutzten Methoden, wie der Thymidin-Block (G1/S-Arrest), der RO-3306-induzierte G2-Arrest und das Hervorrufen einer Pseudo-Mitose mithilfe von Nocodazol, in den natürlichen Zellzyklus ein (Tasdemir et al. 2007, Liu et al. 2009, Li et al. 2016).

6.3.1 Durchflusszytometrische Analyse – Zellfraktionen mit hohem Autophagie-Niveau befinden sich überwiegend in der G2/M-Phase

Dank der Methode der Zellsortierung nach Cyto-ID-Fluoreszenz wurden unbehandelte, nicht synchronisierte JURKAT-Zellen nach ihrem Autophagie-Niveau voneinander separiert, anschließend konnten die Zellzyklusprofile mittels PI-Färbung in Abhängigkeit der Autophagie-Aktivität analysiert werden. Die neue Herangehensweise ermöglicht es zuvor beschriebene Einflussfaktoren weitestgehend zu minimieren. Zusätzlich wurden vergleichend Autophagie-stimulierte (Etoposid) Zellen nach Autophagie-Niveau sortiert und auf ihre Zellzyklusprofile untersucht.

In den sortierten Fraktionen konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen Autophagie-Aktivität und Zellzyklusphase erkannt werden. Sowohl in unbehandelten als auch in Autophagie-stimulierten JURKAT-Zellen zeigten sich direkt nach dem Sortiervorgang Unterschiede in der Verteilung der Zellen in der G1-, S-, und G2/M-Phase der drei Fraktionen. In der unbehandelten Population, die nach konstitutiver Autophagie-Aktivität sortiert wurde, dominierten die Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau in der G1-Phase, während in der G2/M-Phase die Zellen mit hohem Autophagie-Niveau überwogen. Die Zellen mit mittlerem Autophagie-Niveau bewegten sich zwischen den beiden anderen Fraktionen und zeigen den entsprechenden Zusammenhang zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklusphase. Die Zellen in der S-Phase wiesen tendenziell ein hohes Autophagie-Niveau auf. Der aktive Autophagiefluss in der M-Phase schließt sich der Behauptung an, dass ein defekter Autophagiemechanismus in Einzellern mit abnormaler Mitose und vermehrt auftretender Aneuploidie assoziiert ist (Matsui et al. 2013). Die Observation, dass Zellen in der G1-Phase eine niedrige Autophagie-Aktivität an den Tag legen, die Autophagie in S-Phase Zellen hochreguliert wird und sich Zellen mit hohem Autophagie-Niveau größtenteils in der G2/M-Phase befinden, stützt zudem die Annahmen einer Studie von Warnes (2015). In dieser konnte in myeloischen Leukämiezellen mittels Durchflusszytometrie bei Nährstoffmangel-induzierter Autophagie eine Änderung der LC3-, ergo Autophagie-Level über die Zellzyklusphasen festgestellt werden. Zellen in der G1-Phase wiesen den geringsten LC3-Spiegel auf, dieser stieg sowohl beim Übergang der G1- in die S-Phase, als auch von der S- zur G2/M-Phase; als Zellzyklusmarker wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) herangezogen (Warnes 2015). Sowohl der bei Warnes (2015) eingesetzte

Fluoreszenzfarbstoff DAPI, als auch PI, lassen über den DNA-Gehalt einer Zelle Rückschlüsse auf die Zellzyklusphasen ziehen. Ein Defizit ist dabei die mangelnde Unterscheidung der G2- von der Mitosephase. Eine systematische und umfangreiche Studie lieferten Li et al (2016). Synchronisierte HeLa-Zellen zeigten in Western Blots im Vergleich zur G2-, späten Mitose- und G1-Phase einen hohen Autophagiefluss (LC3-II-Expression und Autophagie-Inhibitor Ammoniumchlorid) in der S-, sowie in der frühen Mitosephase (Li et al. 2016). In unbehandelten HeLa-Zellen wurde die natürlich auftretende Mitose fluoreszenzmikroskopisch präziser untersucht: Ebenso konnte hier, besonders in der frühen Mitosephase (fluoreszierende anti- β -Tubulin-Antikörper), ein hoher Autophagiefluss (fluoreszierende anti-LC3-Antikörper und Autophagie-Inhibitor CQ) erfasst werden (Li et al. 2016).

Vergleicht man vorangegangene Zellzyklusprofile unbehandelter nach Autophagie-Niveau-sortierter Zellen mit denen Etoposid-stimulierter Zellen, lassen sich zuvor getroffene Annahmen untermauern. In Autophagie-induzierten Zellen wiesen diejenigen mit hohem Autophagie-Niveau ebenso die Tendenz auf, sich in der G2/M-Phase zu befinden, vice versa hielten sich Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau eher in der G1-Phase auf. Während der Anteil der S-Phase-Zellen in unbehandelten Zellen, passend zu den Ergebnissen von Li et al. (2016), von den Zellen mit niedrigem zu hohem Autophagie-Niveau stieg, fiel er in Etoposid-stimulierten Zellen. Womöglich liegt dieser Effekt in der Zellzyklus-manipulierende Komponente von Etoposid begründet, so greift Etoposid, unabhängig von seinem Autophagie-Effekt, in hohen Konzentrationen in die DNA-Synthese, folglich in die S-Phase, ein (Ishiyama et al. 1994). Anzumerken ist, dass die S-Phase-Werte zu niedrig lagen, um eindeutige Schlüsse zu ziehen.

Nach 24 Stunden waren die unterschiedlichen Verteilungsverhältnisse zwischen den sortierten Fraktionen der unbehandelten und der stimulierten Population nicht mehr zu erkennen. Bedenkt man die Verdopplungszeit der JURKAT-Zellen von 30 Stunden, könnte die engmaschigere Beobachtung der Zellen von Interesse sein. Abermals 24 Stunden später, nach 48 Stunden, pendelten sich die prozentualen Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen auf ähnliche Werte ein und entsprachen wieder der durchschnittlichen stochastischen Verteilung nicht sortierter Zellen.

Insgesamt befindet sich der überwiegende Anteil der unbehandelten Zellpopulation in der G1-Phase, passend dazu arretieren Zellen, die einem Nährstoff- oder Wachstumsfaktormangel ausgesetzt sind, meist in der G1-Phase (Jorgensen und Tyers 2004). Die Mehrheit der Autophagie-stimulierten Zellen befindet sich hingegen in der G2/M-Phase, was im Einklang mit einem Etoposid-induzierten G2/M-Zellzyklus-Arrest steht. Dies begründet sich vermutlich unter anderem darin, dass subletale Konzentrationen DNA-schädigender Wirkstoffe, wie Etoposid, zur Expression des Atg5 Proteins führen können, welches für die Induktion der sogenannten „Mitotischen Katastrophe“ verantwortlich ist (Maskey et al. 2013). Diese stellt einen onko-suppressiven Mechanismus zur Kontrolle Mitose-inkompetenter Zellen dar, kann zum Mitose-Arrest und folglich zum mitotischen Zelltod führen (Galluzzi et al. 2018). Solange eine Autophagie-Antwort während der „Mitotischen Katastrophe“ aufrechterhalten wird, kann der Zelltod umgangen werden (Maskey et al. 2013). Der prozentuale Anteil an sub-G1-Zellen, welche Zellen mit fragmentierter DNA repräsentieren, lag in Etoposid-behandelten Zellen direkt nach dem Sortiervorgang bei unter 1 %, da die toten Zellen mittels PI-Markierung während des Sortiervorgangs ausgeschlossen wurden. Der Zelltod stieg innerhalb von 48 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen etwas an (im Mittel bis zu 9 %), zeigte aber keine relevanten Unterschiede zwischen den sortierten Fraktionen. Die Versuche belegten, dass Etoposid zusätzlich zur Autophagie-Stimulation zu einem G2/M-Arrest in JURKAT-Zellen führt. Dies befürwortet die Annahme, dass Autophagie-Modulatoren in den Zellzyklus eingreifen. Um Fehlinterpretationen bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Autophagie und Zellzyklus zu vermeiden, muss hierauf in Zukunft Rücksicht genommen werden.

Zusammenfassend sprechen die erhobenen Ergebnisse sowie die Mehrheit anderer Forschungsarbeiten für einen Zusammenhang zwischen niedriger Autophagie-Aktivität und G1-Phase und widerlegen somit die Erkenntnisse von Tasdemir et al. 2007. Meine Ergebnisse enthüllten, dass sich sowohl unbehandelte als auch Autophagie-stimulierte Zellen mit einem hohen Autophagie-Niveau überwiegend in der G2/M-Phase befinden. Sie entkräften somit die Behauptung von Eskelinen et al. (2002), die Autophagie sei während der Mitosephase inhibiert, und erhärten die Hypothese eines hohen Autophagieflux kurz vor bzw. in der Mitosephase (Li et al. 2016, Liu et al. 2009, Loukil et al. 2014). Daraufhin stellte sich die Frage welchen Einfluss das Autophagie-Niveau auf

die molekularbiologische Zellzyklusregulation hat. Der Fokus wurde hierbei auf die Genexpression G2/M-spezifischer Proteine in unbehandelten Zellen gesetzt.

6.3.2 Signifikant erhöhte Genexpression von G2/M-Markern in den Zellfraktionen mit hohem Autophagie-Niveau

Da in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt wurde, dass sich Zellen mit hohem Autophagie-Niveau größtenteils in der G2/M-Phase befinden, wurde die mRNA-Expression der Zellzyklus-Proteine Cyclin B1 (Gen: *CCNB1*) und PLK1 (Gen: *PLK1*) in den Autophagie-Niveau-sortieren JURKAT-Zellen untersucht. Auf Transkriptionsebene konnte eine signifikante Zunahme der *CCNB1*- und *PLK1*-Genexpression von der Fraktion mit niedrigem zu hohem Autophagie-Niveau festgestellt werden.

Cyclin B1 und PLK1 sind anerkannte G2/M-Marker (Williams und Stoeber 2007). Während der G2-Phase steigt das Cyclin B1-Level um ein Vielfaches an (Pines und Hunter 1989) und reguliert über die Interaktion mit CDK1 den Eintritt der G2- in die Mitosephase (Brown et al. 2015). Die PLK1 weist in der G1- und S-Phase eine geringe Expression und Aktivität auf, die während der G2-Phase ansteigt und in der M-Phase ihren Gipfel erreicht (Strebhardt und Ullrich 2006). Die erhöhte *CCNB1*- und *PLK1*-mRNA-Expression in der Fraktion mit hohem Autophagie-Niveau zeigt, dass sich Zellen mit hoher Autophagie-Aktivität überwiegend kurz vor oder in der Mitosephase befinden. Sie unterscheiden sich deutlich von den Zellen mit mittlerem und niedrigem Autophagie-Niveau, die eine geringere mRNA-Expression beider Gene aufzeigten. Beide Proteine kennzeichnen die G2- und M-Phase und belegen passend zu den Zellzyklusanalysen eine enge Korrelation zwischen hoher konstitutiver Autophagie-Aktivität einer Zelle und genannter Zellzyklusphasen.

Wirft man einen genaueren Blick auf die Proteine, die sowohl im Zellzyklus als auch in der Autophagie involviert sind, fällt auf, dass ursprünglich als Zellzyklus-relevant charakterisierte Proteine parallel in der Autophagieregulation eine Rolle spielen. Einige CDK-Inhibitoren (p16, p19, p21, p27) induzieren die Autophagie (Capparelli et al. 2012, Campos et al. 2016, Zada et al. 2015). Dagegen inhibieren die meisten CDKs die Autophagie während des Zellzyklus (Zheng et al. 2019). CDK1 ist über die Phosphorylierung von Vps34 an der Autophagie beteiligt und verhindert die Interaktion zwischen Vps34 und Beclin1, welches normalerweise in der Herunterregulierung der

Autophagosomen-Formation resultiert (Rubinsztein 2010). Li et al. (2016) schlugen aber vor, dass dieser Schritt nicht reiche, um die Autophagie während der M-Phase vollends zu inhibieren. Nach anfänglicher Inhibition scheint Vps34 in späten Stadien der M-Phase sogar dephosphoryliert und reaktiviert zu werden (Furuya et al. 2010). Zudem kann die Zytokinese, der letzte Schritt der M-Phase, bei Inhibition des Autophagie-relevanten Vps34-Komplexes nicht adäquat vonstattengehen (Sagona et al. 2010, Thoresen et al. 2010). Die CDK1, die über Cyclin B1 reguliert wird und über die Interaktion mit Vps34 Einfluss auf die Autophagieregulation nimmt, erfüllt während der G2/M-Phase offenbar vielfältige Aufgaben. Li et al. (2016) näherten sich der Problematik auf folgende Art und Weise: Sie nutzten Cyclin B1 als Zellzyklusmarker und konnten in der Mitosephase eine verstärkte mRNA-Expression der Autophagie-relevanten Proteine LC3 und Beclin1 nachweisen. Uns gelang es diese Beobachtungen in umgekehrter Richtung zu bestätigen. Mittels der Zellsortierung wurden die Zellen zuerst nach Autophagie-Niveau getrennt, anschließend konnte eine starke mRNA-Expression des Cyclin B1-Proteins in Zellen mit hohem Autophagie-Niveau im Vergleich zu Zellen mit niedrigem Autophagie-Niveau nachgewiesen werden. Auch die leicht erhöhte *BECN1*-mRNA-Expression in der Zellfraktion mit hohem Autophagie-Niveau deckt sich mit diesen Ergebnissen (siehe Expression von *ATG*-Genen in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen, Seite 66). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalysen deutet dies womöglich auf eine Schlüsselrolle des Cyclin B1-Levels bzw. der CDK1-Aktivität in der engen Verknüpfung zwischen G2/M-Phase und hoher Autophagie-Aktivität.

Die Rolle der PLK1 in der Autophagie bleibt kontrovers diskutiert. Einerseits induziert die PLK1 die Autophagie durch Phosphorylierung und somit Inhibition von mTOR (Ruf et al. 2017), andererseits führt die Inhibition der PLK1 zur Induktion der Autophagie in AML-Zellen durch Dephosphorylierung von mTOR (Tao et al. 2017), welches wiederum eine inhibitorische Aufgabe der PLK1 in der Autophagie-Regulation vermuten lässt. Die komplexe Funktion der PLK1 in der mitotischen Autophagie-Regulation scheint experimentell schwer zu erfassen sein. Die starke *PLK1*-mRNA-Expression in Zellen mit hohem Autophagie-Niveau, die sich laut Zellzyklusanalysen vermehrt in der G2/M-Phase befinden, deutet zunächst auf eine Autophagie-aktivierende Aufgabe der PLK1 in der G2/M-Phase und schließt sich den Aussagen von Ruf et al. (2017) an. Umgekehrt sind auch Autophagie-spezifische Proteine an der Zellzyklus-Regulation beteiligt. So

kontrolliert der Komplex mTORC1 neben der indirekten Autophagie-Antwort auf Nährstoffmangel und verminderte Wachstumsfaktorsignale die G2/M-Progression (Ramirez-Valle et al. 2010). Auch die AMPK, ein Energiesensor, der bei niedrigem intrazellulären ATP-Level aktiviert wird, ist sowohl in der Autophagie-Regulation über die Interaktion mit ULK1 als auch in den Mitoseprozess über die Regulation der Spindelorientierung involviert (Thaiparambil et al. 2012). Die Class III PI3K Vps34 induziert die Autophagie über die Generierung von PI3P, welches zur Rekrutierung autophagozytotischer Proteine und zur Bildung des Vps34-Komplexes führt. Die Inhibierung des PI3K-Signalwegs führt zu einem verzögerten S-Phase-Austritt und einer verzögerten G2/M-Transition aufgrund von einer herabgesetzten CDK1-Aktivität (Ornelas et al. 2013, Roberts et al. 2002). Demnach scheint die Autophagie während der G2- bzw. M-Phase durchaus ein unabdingbarer Prozess zu sein.

Die vielfältige Rolle der involvierten Proteine erklärt die Problematik, eine eindeutige Antwort auf die Frage zu finden, in welcher Zellzyklusphase die Autophagie hochreguliert ist. Der Autophagiemechanismus wird ebenso wie der Zellzyklusarrest unter verschiedenen Stressbedingungen induziert, in welchen er eine ausschlaggebende Rolle in der Überlebensfähigkeit der Zelle spielt (Mathiassen et al. 2017). Ihm werden zunehmend wesentliche Aufgaben zugesprochen, die den korrekten Ablauf des Zellzyklus sicherstellen. Ein bekannter Verbindungspunkt zwischen Autophagie und Zellzyklus ist die Antwort auf DNA-Schäden (Anand et al. 2020). Diese initiiert einen Halt der Zellzyklus-Progression und die Stimulation der Autophagie (Vessoni et al. 2013, Roos et al. 2016, Hewitt und Korolchuk 2017, Gomes et al. 2017) und gewährleistet somit die Genomintegrität. Der Fortschritt im Verständnis des Zusammenhangs zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklus hat offensichtliche Bedeutung für das Verständnis der komplizierten Beziehung zwischen Autophagie und Tumorgenese.

6.4 Keine Einflussnahme der konstitutiven Autophagie-Aktivität auf die Chemosensibilität in JURKAT-Zellen

In den letzten Jahren wurden die weitreichenden Erkenntnisse in Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Autophagie, Tumorentstehung und -progression kontinuierlich zusammengetragen (Singh et al. 2017, Amaravadi et al. 2016, Galluzzi et al. 2015) und lassen keinen Zweifel an der potentiellen Chance, die die Autophagie-Modulation in der

Krebsbehandlung mit sich bringen würde. Die vielseitigen Widersprüche bezüglich Autophagie-Inhibition versus -Induktion in der Literatur lassen die Frage offen, in welche Richtung die Autophagie-Modulation bei der Krebstherapie von Vorteil sein könnte (siehe Autophagie und Tumorentstehung bzw. -progression, Seite 22). Einerseits können Autophagie-abhängige Zelltodmechanismen zur Wirksamkeit von Chemotherapeutika beitragen, andererseits führen protektive Autophagieprozesse in Krebszellen zur Ausbildung von Resistenzen unter Chemotherapie (Sui et al. 2013). In Mausmodellen mit humanen Leukämiezellen (AML) konnte bei genetischer Autophagie-Inhibition (über *ATG7*-Knockdown) eine bessere Ansprechrate auf Chemotherapeutika festgestellt werden (Piya et al. 2016). Auch die pharmakologische Autophagie-Inhibition (mittels CQ) erhöhte die Chemosensibilität in ALL-Zellen (Takahashi et al. 2017). Auf der anderen Seite zeigte der Einsatz von Autophagie-Aktivatoren, wie beispielsweise mTOR-Inhibitor Everolimus, in Mausmodellen mit humanen Leukämiezellen (ALL) ebenfalls eine Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika (Crazzolara et al. 2009). Auch in klinischen Studien konnte beim Einsatz von Autophagie-Inhibitoren sowie -Aktivatoren die Frage, ob eine Hochregulation oder Unterdrückung der Autophagie in der Krebstherapie förderlich ist, nicht einheitlich geklärt werden (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Bis dato gibt es zahlreiche Forschungsarbeiten, die die Autophagie-Aktivität pharmakologisch oder genetisch modulieren, jedoch untersuchte kaum eine den Einfluss der konstitutiven Autophagie-Aktivität von Tumorzellen auf Unterschiede in der Reaktion auf die Behandlung mit Zytostatika.

Da die neue Methode der Zellsortierung erfolgreich zur Zellzyklusprofilanalyse Autophagie-Niveau-sortierter JURKAT-Zellen eingesetzt werden konnte, kam der Gedanke auf, die Methode zu nutzen, um im Allgemeinen eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich Zellen mit niedriger, mittlerer und hoher konstitutiver Autophagie-Aktivität hinsichtlich ihrer Chemosensibilität unterscheiden. Exemplarisch wurde wieder die ALL-Zelllinie JURKAT herangezogen. Die Wahl der Zytostatika fiel auf Cytarabin, einem zur Behandlung von Leukämien gängigen Chemotherapeutikum, und Etoposid, einem allgemein weitläufig eingesetzten Zytostatikum. Cyto-ID-sortierte JURKAT-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Chemotherapeutika Cytarabin bzw. Etoposid inkubiert. Pro Chemotherapeutikum kamen drei aufsteigende Wirkstoffkonzentrationen zum Einsatz. Sowohl beim Zelltod als auch im Verlust des $\Delta\Psi_m$ waren keine signifikanten

Unterschiede zwischen den nach Autophagie-Niveau sortierten Fraktionen festzustellen. Zu vermerken ist, dass beide eingesetzten Zytostatika in der S-Phase wirken. Etoposid, ein Topoisomerase-II-Inhibitor, induziert Doppelstrangbrüche und hemmt die DNA-Synthese der S-Phase Zellen und führte in Leukämiezellen, passend zu vorangegangenen Ergebnissen, zu einem Arrest in der G2/M-Phase (Ishiyama et al. 1994). Auch Cytarabin, ein Antimetabolit, wirkt in der S-Phase, führte jedoch zu einem G1/S-Phase-Arrest (Ishiyama et al. 1994). Interessanterweise führte die Kombination von Autophagie-Inhibitor CQ und Chemotherapeutika, die ihre zytotoxische Wirkung in der M-Phase entfalten (Paclitaxel und Vinblastin), zu erhöhten anti-tumoralen Effekten der Zytostatika (Levy et al. 2014, Gao et al. 2015). Mit Hinblick auf die gewonnenen Erkenntnisse bei der Analyse der Zellzyklusprofile der nach Autophagie-Niveau sortieren Zellen und dem Zusammenhang zwischen Autophagie-Aktivität und Zellzyklusphase einer Zelle, stellt sich die Frage, inwieweit dieser Faktor bei der Wahl des Zytostatikums in Bezug auf die konstitutive Autophagie-Aktivität bzw. Kombination mit einem Autophagie-Modulator eine Rolle spielt. Hierzu wären weitere Versuche – unter systematischer Berücksichtigung der Zellzyklusphase, in der die eingesetzten Zytostatika wirken – von Interesse und würden Klarheit schaffen im Zusammenspiel zwischen Autophagie, Zellzyklus und Chemosensibilität.

Es bleibt festzuhalten, dass die initiale konstitutive Autophagie-Aktivität keinen Einfluss auf die Chemosensibilität (bezüglich Cytarabin und Etoposid) in JURKAT-Zellen nimmt. Diese neue Erkenntnis trägt dazu bei, die Autophagie-abhängigen Resistenzmechanismen in Tumorzellen besser zu verstehen. Die Beobachtungen sprechen gegen einen protektiven Effekt einer initial hohen konstitutiven Autophagie-Aktivität in Krebszellen, lassen jedoch nur einen Rückschluss über den Einfluss der basalen und nicht der Zytostatika-induzierten Autophagie-Aktivität auf die Chemosensibilität zu. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zytostatika-induzierte Autophagie beispielsweise zu einer herabgesetzten Zytostatika-Empfindlichkeit führt und folglich die Inhibition der Autophagie im Kontext der Krebstherapie förderlich wäre. Die Autophagie-Modulation als Ansatz der Sensibilitätssteigerung zu nutzen verbleibt eine Option, jedoch muss der Rolle der Autophagie mit Blick auf die Kannzerogenese künftig weiter nachgegangen werden.

7 Schlussfolgerung

Die Weiterentwicklung und Etablierung der Methode der Zellsortierung mittels Cyto-ID ermöglichte weitreichende Erkenntnisse im Hinblick auf den Zusammenhang der Autophagie-Aktivität mit tumorbiologisch bedeutsamen Faktoren wie Zellzyklusphasen und Chemosensibilität in ALL-Zellen.

Der Fluoreszenzfarbstoff Cyto-ID wurde nach Validierung und Charakterisierung als Autophagieflux-Marker in der Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau eingesetzt. Die Methode ermöglichte erstmalig, anhand von Zellpopulationen mit distinkter autophagozytotischer Aktivität den Zusammenhang von konsitutiver Autophagie sowohl mit dem Zellzyklus wie auch mit der Chemosensibilität zu untersuchen. Obwohl die Verknüpfung von Zellzyklus und Autophagie in vielen Studien untersucht wurde, war der Charakter des Zusammenhangs umstritten. Die Methode der Zellsortierung ermöglichte es nachzuweisen, dass Zellen besonders in der G2/M-Phase einen hohen Autophagieflux aufwiesen. In Bezug auf die zweiseitige Rolle der Autophagie in der Kanzerogenese führten die Untersuchungen an sortierten Zellen zu dem Befund, dass die konstitutive Autophagie-Aktivität keinen Einfluss auf die Sensibilität gegenüber den Chemotherapeutika Cytarabin und Etoposid nahm. Dieses Erkenntnis weckt Zweifel, ob die klinische Manipulierung der Autophagie tatsächlich geeignet ist, Chemoresistenz zu überwinden und legt nahe, den Einfluss der Autophagie auf die Chemosensibilität noch eingehender zu prüfen.

Die nach einmal erfolgter Etablierung relativ einfach durchzuführende Methode der Zellsortierung nach Autophagie-Niveau verspricht, ohne größeren Aufwand auf weitere Zelllinien übertragen werden zu können. Sie ermöglicht somit, nach Belieben weitere mit der Autophagie im Zusammenhang stehende zelluläre Mechanismen in unterschiedlichsten Tumoren zu untersuchen. Damit eröffnet diese Methode neue Möglichkeiten in der Grundlagenforschung der Autophagie wie auch in der Entwicklung von Wirkstoffen zu ihrer klinischen Manipulierung.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. 2016. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 30 (17):1913-1930.
- Anand SK, Sharma A, Singh N, Kakkar P. 2020. Entrenching role of cell cycle checkpoints and autophagy for maintenance of genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*, 86:102748.
- Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. 2008. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res*, 68 (5):1485-1494.
- Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K. 2013. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol*, 5 (4):214-226.
- Auberger P, Puissant A. 2017. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood*, 129 (5):547-552.
- 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.
- Bialik S, Dasari SK, Kimchi A. 2018. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci*, 131 (18).
- Bishop E, Bradshaw TD. 2018. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol*, 82 (6):913-922.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171 (4):603-614.
- Brown NR, Korolchuk S, Martin MP, Stanley WA, Moukhametzianov R, Noble MEM, Endicott JA. 2015. CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nat Commun*, 6:6769.
- Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HWt. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456 (7219):259-263.
- Campos T, Ziehe J, Palma M, Escobar D, Tapia JC, Pincheira R, Castro AF. 2016. Rheb promotes cancer cell survival through p27Kip1-dependent activation of autophagy. *Mol Carcinog*, 55 (2):220-229.

- Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Pestell TG, Pestell RG, Hult J, Ando S, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. 2012. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle*, 11 (19):3599-3610.
- Catarino S, Pereira P, Girao H. 2017. Molecular control of chaperone-mediated autophagy. *Essays Biochem*, 61 (6):663-674.
- 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.
- Choi JH, Yoon JS, Won YW, Park BB, Lee YY. 2012. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *Apmis*, 120 (7):597-604.
- Clarke PG, Clarke S. 2012. Nineteenth century research on cell death. *Exp Oncol*, 34 (3):139-145.
- Cohen SS. 1977. The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA). *Cancer*, 40 (1 Suppl):509-518.
- Crazzolaro R, Cisterne A, Thien M, Hewson J, Baraz R, Bradstock KF, Bendall LJ. 2009. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113 (14):3297-3306.
- De Duve C, Wattiaux R. 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28:435-492.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10 (1):51-64.
- Deretic V, Saitoh T, Akira S. 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 13 (10):722-737.
- Dikic I, Elazar Z. 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19 (6):349-364.
- Djavaheri-Mergny M, Giuriato S, Tschan MP, Humbert M. 2019. Therapeutic Modulation of Autophagy in Leukaemia and Lymphoma. *Cells*, 8 (2).
- 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.
- Essig S, Li Q, Chen Y, Hitzler J, Leisenring W, Greenberg M, Sklar C, Hudson MM, Armstrong GT, Krull KR, Neglia JP, Oeffinger KC, Robison LL, Kuehni CE, Yasui Y, Nathan PC. 2014. Risk of late effects of treatment in children newly

- diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol*, 15 (8):841-851.
- Farkas T, Hoyer-Hansen M, Jaattela M. 2009. Identification of novel autophagy regulators by a luciferase-based assay for the kinetics of autophagic flux. *Autophagy*, 5 (7):1018-1025.
- 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.
- Fullgrabe J, Ghislat G, Cho DH, Rubinsztein DC. 2016. Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J Cell Sci*, 129 (16):3059-3066.
- 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, Levine B, Green DR, Kroemer G. 2017. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 16 (7):487-511.
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *Embo j*, 34 (7):856-880.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, Garcia-Saez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jaattela M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Munoz-Pinedo C, Nagata S, Nunez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM,

- Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25 (3):486-541.
- Gao M, Xu Y, Qiu L. 2015. Enhanced combination therapy effect on paclitaxel-resistant carcinoma by chloroquine co-delivery via liposomes. *Int J Nanomedicine*, 10:6615-6632.
- Gilmore AP. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1473-1477.
- Gökbuget NB, C.; Brüggemann, M.; Hauswirth, A. W.; Schanz U. 2018. Akute Lymphatische Leukämie. *Onkopedia Leitlinien*.
- Gomes LR, Menck CFM, Leandro GS. 2017. Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int J Mol Sci*, 18 (11).
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. 2011. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333 (6046):1109-1112.
- Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. 2011. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci*, 124 (Pt 19):3189-3197.
- Gump JM, Thorburn A. 2014. Sorting cells for basal and induced autophagic flux by quantitative ratiometric flow cytometry. *Autophagy*, 10 (7):1327-1334.
- 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.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141 (4):656-667.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441 (7095):885-889.

- 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.
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11 (12):1433-1437.
- Hewitt G, Korolchuk VI. 2017. Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends Cell Biol*, 27 (5):340-351.
- Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*, 17:36.
- Ishiyama K, Satoh S, Igarashi Y, Kumagai H, Yahagi A, Sasaki H. 1994. Flow cytometric analysis of the cell cycle of the leukemic cell lines treated with etoposide and cytosine arabinoside. *Tohoku J Exp Med*, 174 (2):95-107.
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*, 5 (2):143-148.
- Johansen T, Lamark T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7 (3):279-296.
- Jorgensen P, Tyers M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol*, 14 (23):R1014-1027.
- Kaatsch PGDSC. 2019. German Childhood Cancer Registry - Annual ... C, German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
- Kabeja Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo j*, 19 (21):5720-5728.
- 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.
- Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. 2006. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol*, 16 (6):285-292.

- Kim YC, Guan KL. 2015. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*, 125 (1):25-32.
- Kimmelman AC. 2011. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 25 (19):1999-2010.
- Kimmelman AC, White E. 2017. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab*, 25 (5):1037-1043.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 3 (5):452-460.
- Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Bruning A. 2012. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol*, 137 (1):25-36.
- Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, Chu CT, Codogno P, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Elazar Z, Eskelinen EL, Finkbeiner S, Fueyo-Margareto J, Gewirtz D, Jaattela M, Kroemer G, Levine B, Melia TJ, Mizushima N, Rubinsztein DC, Simonsen A, Thorburn A, Thumm M, Tooze SA. 2011. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*, 7 (11):1273-1294.
- 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, Alirezai 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, Behrens 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, Bouchecareilh 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, Kruer 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, Mechta-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, Nowikovskiy 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, Pugazhenthis 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, Rippo 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, Seiliez 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, Shibutani 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, Sothibundhu 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, Taegtmeyer 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, Vandenaabeele 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 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, Zughaier SM. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12 (1):1-222.
- Ko A, Kanehisa A, Martins I, Senovilla L, Chargari C, Dugue D, Marino G, Kepp O, Michaud M, Perfettini JL, Kroemer G, Deutsch E. 2014. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ*, 21 (1):92-99.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131 (6):1149-1163.
- Krishan A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, 66 (1):188-193.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40 (2):280-293.
- Kuo PL, Hsu YL, Cho CY. 2006. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5 (12):3209-3221.
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (12):759-774.
- Lee JS, Lee GM. 2012. Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods*, 56 (3):375-382.
- Levy JM, Thompson JC, Griesinger AM, Amani V, Donson AM, Birks DK, Morgan MJ, Mirsky DM, Handler MH, Foreman NK, Thorburn A. 2014. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors. *Cancer Discov*, 4 (7):773-780.
- Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. 2017. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 17 (9):528-542.
- Li WW, Li J, Bao JK. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69 (7):1125-1136.
- Li Z, Zhang X. 2017. Kinases Involved in Both Autophagy and Mitosis. *Int J Mol Sci*, 18 (9).

- 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 L, Xie R, Nguyen S, Ye M, McKeehan WL. 2009. Robust autophagy/mitophagy persists during mitosis. *Cell Cycle*, 8 (10):1616-1620.
- Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Jr., Wei Y, Ginet V, Zhang L, Posner B, Tran KA, Green DR, Xavier RJ, Shaw SY, Clarke PG, Puyal J, Levine B. 2013. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (51):20364-20371.
- Lock R, Kenific CM, Leidal AM, Salas E, Debnath J. 2014. Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov*, 4 (4):466-479.
- Loos B, du Toit A, Hofmeyr JH. 2014. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy*, 10 (11):2087-2096.
- 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.
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. 2013. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*, 39 (2):211-227.
- Macintosh RL, Timpson P, Thorburn J, Anderson KI, Thorburn A, Ryan KM. 2012. Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle*, 11 (10):2022-2029.
- 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.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E. 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, 137 (6):1062-1075.
- Mathiassen SG, De Zio D, Cecconi F. 2017. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol*, 7:51.
- Matsui A, Kamada Y, Matsuura A. 2013. The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS Genet*, 9 (1):e1003245.
- 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.

- McEwan DG, Dikic I. 2011. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends Cell Biol*, 21 (4):195-201.
- Mercer TJ, Gubas A, Tooze SA. 2018. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *J Biol Chem*, 293 (15):5386-5395.
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, di Virgilio F, Zitvogel L, Kroemer G. 2011. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334 (6062):1573-1577.
- Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *Excli j*, 14:95-108.
- Morel E, Mehrpour M, Botti J, Dupont N, Hamai A, Nascimbeni AC, Codogno P. 2017. Autophagy: A Druggable Process. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57:375-398.
- Morishita H, Mizushima N. 2019. Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 35:453-475.
- 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.
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. 2009. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 461 (7264):654-658.
- Oeste CL, Seco E, Patton WF, Boya P, Perez-Sala D. 2013. Interactions between autophagic and endo-lysosomal markers in endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, 139 (5):659-670.
- Ohsumi Y. 2014. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*, 24 (1):9-23.
- Orhon I, Reggiori F. 2017. Assays to Monitor Autophagy Progression in Cell Cultures. *Cells*, 6 (3).
- Ornelas IM, Silva TM, Fragel-Madeira L, Ventura AL. 2013. Inhibition of PI3K/Akt pathway impairs G2/M transition of cell cycle in late developing progenitors of the avian embryo retina. *PLoS One*, 8 (1):e53517.
- 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.

- Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G. 2013. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*, 23 (5):310-322.
- Pines J, Hunter T. 1989. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*, 58 (5):833-846.
- Piya S, Kornblau SM, Ruvolo VR, Mu H, Ruvolo PP, McQueen T, Davis RE, Hail N, Jr., Kantarjian H, Andreeff M, Borthakur G. 2016. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Blood*, 128 (9):1260-1269.
- Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM. 2008. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat*, 112 (3):389-403.
- 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.
- Ramirez-Valle F, Badura ML, Braunstein S, Narasimhan M, Schneider RJ. 2010. Mitotic raptor promotes mTORC1 activity, G(2)/M cell cycle progression, and internal ribosome entry site-mediated mRNA translation. *Mol Cell Biol*, 30 (13):3151-3164.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 12 (8):747-757.
- Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. 2012. Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol*, 2012:219625.
- Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG. 2002. Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol*, 22 (20):7226-7241.
- Roos WP, Thomas AD, Kaina B. 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 16 (1):20-33.
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. 2000. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal*, 12 (6):405-411.
- Rubinsztein DC. 2010. Cdks regulate autophagy via Vps34. *Mol Cell*, 38 (4):483-484.

- Ruf S, Heberle AM, Langelaar-Makkinje M, Gelino S, Wilkinson D, Gerbeth C, Schwarz JJ, Holzwarth B, Warscheid B, Meisinger C, van Vugt MA, Baumeister R, Hansen M, Thedieck K. 2017. PLK1 (polo like kinase 1) inhibits MTOR complex 1 and promotes autophagy. *Autophagy*, 13 (3):486-505.
- Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestol K, Poulton J, Rusten TE, Skotheim RI, Raiborg C, Stenmark H. 2010. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol*, 12 (4):362-371.
- Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, Ohtawa K, Miyawaki A. 2011. Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biol*, 12:2.
- Schonn I, Hennesen J, Dartsch DC. 2010. Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, 15 (2):162-172.
- Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M, Mui S, Macleod KF. 2016. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep*, 15 (8):1660-1672.
- Singh SS, Vats S, Chia AY, Tan TZ, Deng S, Ong MS, Arfuso F, Yap CT, Goh BC, Sethi G, Huang RY, Shen HM, Manjithaya R, Kumar AP. 2017. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*.
- Strebhardt K, Ullrich A. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6 (4):321-330.
- 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 Dis*, 4:e838.
- Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. 2017. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*, 36 (30):4267-4276.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, 25 (8):795-800.
- Tao YF, Li ZH, Du WW, Xu LX, Ren JL, Li XL, Fang F, Xie Y, Li M, Qian GH, Li YH, Li YP, Li G, Wu Y, Feng X, Wang J, He WQ, Hu SY, Lu J, Pan J. 2017. Inhibiting PLK1 induces autophagy of acute myeloid leukemia cells via mammalian target of rapamycin pathway dephosphorylation. *Oncol Rep*, 37 (3):1419-1429.
- 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.

- Thaiparambil JT, Eggers CM, Marcus AI. 2012. AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Mol Cell Biol*, 32 (16):3203-3217.
- Thorburn A. 2014. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords. *PLoS Biol*, 12 (10):e1001967.
- Thorburn A. 2018. Autophagy and disease. *J Biol Chem*, 293 (15):5425-5430.
- Thoresen SB, Pedersen NM, Liestol K, Stenmark H. 2010. A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Exp Cell Res*, 316 (20):3368-3378.
- Tooze SA, Yoshimori T. 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol*, 12 (9):831-835.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36 (3):131-149.
- Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Menck CF, Lenz G. 2013. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ*, 20 (11):1444-1454.
- Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, Yu Y, Xie M, Yin X, Livesey KM, Tang D. 2011. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RARalpha oncoprotein. *Autophagy*, 7 (4):401-411.
- Warenius HM, Kilburn JD, Essex JW, Maurer RI, Blaydes JP, Agarwala U, Seabra LA. 2011. Selective anticancer activity of a hexapeptide with sequence homology to a non-kinase domain of Cyclin Dependent Kinase 4. *Mol Cancer*, 10:72.
- Warnes G. 2015. Flow cytometric assays for the study of autophagy. *Methods*, 82:21-28.
- Williams GH, Stoeber K. 2007. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (6):672-679.
- Winther JF, Schmiegelow K. 2014. How safe is a standard-risk child with ALL? *Lancet Oncol*, 15 (8):782-783.
- 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.
- Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M, Ohsumi Y. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol*, 198 (2):219-233.

- Yin H, Wu H, Chen Y, Zhang J, Zheng M, Chen G, Li L, Lu Q. 2018. The Therapeutic and Pathogenic Role of Autophagy in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 9:1512.
- Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. 2016. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3 (12):588-596.
- Yoo SH, Yoon YG, Lee JS, Song YS, Oh JS, Park BS, Kwon TK, Park C, Choi YH, Yoo YH. 2012. Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. *Int J Oncol*, 41 (4):1443-1454.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (25):15077-15082.
- Zachari M, Ganley IG. 2017. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*, 61 (6):585-596.
- Zada S, Noh HS, Baek SM, Ha JH, Hahm JR, Kim DR. 2015. Depletion of p18/LAMTOR1 promotes cell survival via activation of p27(kip1) -dependent autophagy under starvation. *Cell Biol Int*, 39 (11):1242-1250.
- Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. 2019. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics*, 9 (1):104-125.
- Zhi X, Feng W, Rong Y, Liu R. 2017. Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cell Mol Life Sci*.
- Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. 2012. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol*, 13 (4):343-351.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des mehrstufigen Autophagie-Prozesses und des Angriffspunktes des Autophagie-Inhibitors Chloroquin	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	20
Abbildung 3: Verdopplungszeit JURKAT-Zellen	34
Abbildung 4: Zellzyklusanalyse einer Zellpopulation	43
Abbildung 5: Zytotoxizität von Cyto-ID bei Langzeitinkubation.....	50
Abbildung 6: Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Cyto-ID-Fluoreszenz	51
Abbildung 7: Kinetik der Autophagie und des Zelltodes in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen.....	52
Abbildung 8: Autophagieaktivität und Zelltod nach Behandlung mit Etoposid in JURKAT-Zellen.....	53
Abbildung 9: Nachweis des Etoposid-stimulierten Autophagieflux in JURKAT-Zellen.....	54
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklus in unbehandelten, Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen.....	56
Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Autophagie-Niveau und Zellzyklus in Etoposid-stimulierten, Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	58
Abbildung 12: Relative Expression der ULK1-, BECN1-, CCNB1- und PLK1-mRNA in Cyto-ID-sortierten JURKAT-Zellen	59
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Zytostatika in JURKAT-Zellen.....	61
Abbildung 14: Vergleich der Chemosensibilität Cyto-ID-sortierter JURKAT-Zellen	62

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendetes Material und Geräte	29
Tabelle 2:	Verwendete Reagenzien und Kits	30
Tabelle 3:	Zelldichte pro Well in den durchgeführten Experimenten	35
Tabelle 4:	Eingesetzte Autophagie-Modulatoren und Chemotherapeutika	36
Tabelle 5:	Entwicklungsprozess der Methode der Zellsortierung nach Cyto-ID bezüglich der gesammelten Zellzahl	41
Tabelle 6:	Cyto-ID-Fluoreszenzabnahme während des Sortiervorgangs	42

9.3 Danksagung

Der Einblick in die Forschungswelt und die Arbeit an meiner Dissertation haben mich sowohl persönlich bereichert als auch für meinen beruflichen Lebensweg geprägt.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. James Beck und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die regelmäßigen Treffen und den regen Austausch, sowie die kritische Erörterung der neuesten Versuchsergebnisse, bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Sonnemann für die intensive Betreuung, sowie die wertvollen Hinweise und Vorschläge.

Bei Sabine Becker und Yvonne Schlenker bedanke ich mich herzlich für das sorgfältige Einarbeiten in die methodischen Grundlagen, sowie für die Hilfe bei den Versuchsdurchführungen.

Zudem danke ich dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums während meiner Forschungszeit.

Und zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Familie, die mir geholfen haben dieses Forschungsprojekt zu realisieren, für den Beistand und die vielseitige Unterstützung danken.

9.4 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. James Beck, Dr. Jürgen Sonnemann 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.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers
