

Abschlussbericht

Neue Strategien zur Tumorthherapie durch Kombination mit CDK4/6-Kinase-Inhibitoren

gefördert durch die

Roland-Ernst-Stiftung

Projektleiter

Prof. Dr. Kurt Engeland
Leiter Abteilung Molekulare Onkologie
Universitätsfrauenklinik, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Achim Aigner
Leiter Selbständige Abteilung für Klinische Pharmakologie
Rudolf-Boehm-Institut, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Bisherige Publikationen aus dem geförderten Projekt:

1.) *A-MYB substitutes for B-MYB in activating cell cycle genes and in stimulating proliferation*
Robin Kohler und Kurt Engeland
Nucleic Acids Res. 2024 Jul 8;52(12):6830-6849 (Impact Factor: 16,7)

2.) *CeDaD – A Novel Assay for Simultaneous Tracking of Cell Death and Division in a Single Population*
Lukas Nöltner, Kurt Engeland und Robin Kohler
Cell Death Discovery 2025, *im Druck* (Impact Factor: 6,1)

3.) *The DREAM-mediated downregulation of the DNA repair proteins BRCA1/2 offers novel options for combination therapies*
Tamara Zenz, Thomas Büch, Kurt Engeland und Achim Aigner
(*in Vorbereitung*)

Populärwissenschaftlicher Abstract

Eine übermäßige Zellteilung ist das zentrale Merkmal jeder Krebserkrankung. Daher zielen Tumorbehandlungen in der Regel darauf ab, die Zellteilung zu stoppen. Moderne Therapieansätze versuchen, die bekannten Steuermechanismen der Zellteilung gezielt zu nutzen, um Nebenwirkungen für Patienten zu minimieren. Eine wichtige Rolle spielen hierbei bestimmte Kinasen, insbesondere die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), die essenziell für die Initiierung der Zellteilung sind. Seit der Zulassung des ersten CDK4/6-Inhibitors im Jahr 2015 werden diese Wirkstoffe ausschließlich in Kombination mit klassischen Chemotherapien eingesetzt. Dies wirft die entscheidende Frage auf: Wie gelingt es Tumoren, die Blockade der Zellteilung durch CDK4/6-Inhibitoren zu umgehen?

DREAM, RB und p53 sind zentrale sog. Transkriptionsfaktoren bzw. -kofaktoren, die die Zellteilung und auch den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren. Auch weitere kritische (Tumor-) Zellfunktionen wie die Reparatur von DNA-Schäden werden durch DREAM reguliert. In Zusammenarbeit mit anderen Forschenden haben wir untersucht, wie CDK4/6-Inhibitoren die Funktionen dieser Tumorsuppressoren unterstützen. Zudem konnten wir zeigen, wie die Onkogene FOXM1 und B-MYB die Hemmung der Zellteilung durch CDK4/6-Inhibitoren umgehen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese Onkogene alternative Signalwege nutzen, um die Zellteilung unabhängig von CDK4/6-Kinasen anzutreiben.

Das geförderte Projekt war äußerst erfolgreich. Ein bedeutender Meilenstein war die Identifizierung des Transkriptionsfaktors A-MYB als Onkogen. Wir konnten nachweisen, dass A-MYB die Funktion von B-MYB ersetzen kann. Dies bedeutet, dass künftige Therapieansätze nicht nur auf B-MYB abzielen dürfen, sondern auch die Aktivität von A-MYB hemmen müssen, um diesen onkogenen Signalweg effektiv zu blockieren. Mithilfe eines RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelten Gen-Knockdowns ist es uns gelungen, die Expression beider Transkriptionsfaktoren zu reduzieren und so die Zellteilung erfolgreich zu stoppen.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass eine durch DREAM-vermittelte Herunterregulierung der u. a. für die DNA-Reparatur kritischen Proteine BRCA1 und BRCA2 eine wesentliche Rolle bei der zellulären Wirkung einer anderen wichtigen Klasse von Krebsmedikamenten, den sogenannten HDAC-Inhibitoren, spielt.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war die Entwicklung eines kombinierten Tests, der Zellteilungs- und Apoptoseraten parallel und ohne großen Aufwand misst. Darüber hinaus haben wir die Wirkung verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die Transkriptionsregulation und die Zellteilung untersucht. Dabei kamen Volasertib (PLK1-Inhibitor), YKL-5-124 (CDK7-Inhibitor), NU-6102 (CDK1/2-Inhibitor) und Abemaciclib (CDK4/6-Inhibitor) zum Einsatz. Unsere Studien zeigen, dass alle untersuchten Inhibitoren die Expression von Zellzyklusgenen reduzieren und dadurch einen Arrest der Zellteilung bewirken. Interessanterweise benötigt die Wirkung der Inhibitoren YKL-5-124 und Abemaciclib sog. CDE/CHR-Tandem-Promotorelemente, die wir zuvor identifiziert und charakterisiert hatten. Darüber hinaus führen die meisten Inhibitoren zu einer Verringerung der Zellzahlen in einer kritischen Phase des Zellzyklus, der sog. S-Phase. Für die Induktion des Zellzyklusarrests sind jedoch RB und DREAM notwendig, insbesondere bei einer Behandlung der Zellen mit Volasertib.

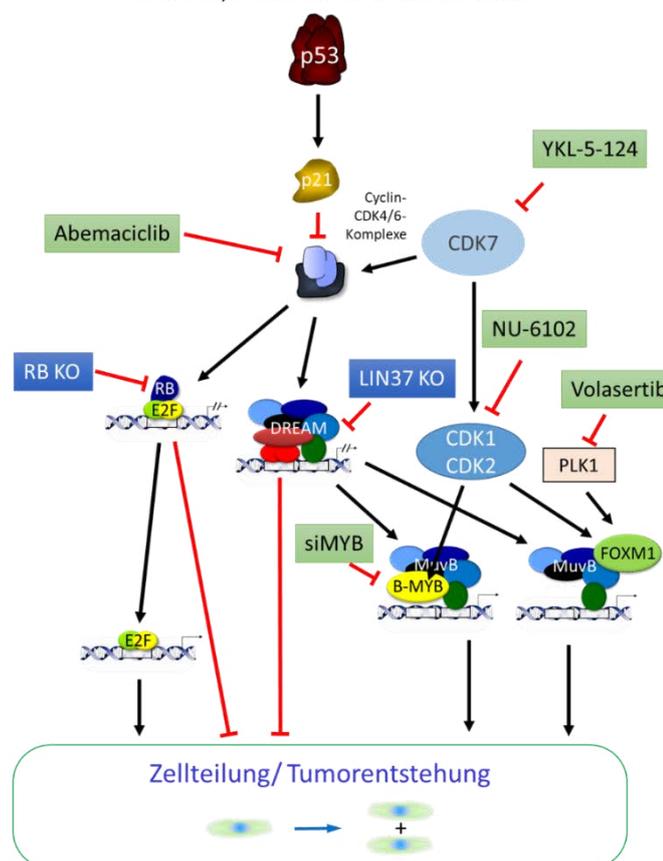
Zusammenfassend präsentieren wir neue Erkenntnisse zu den Mechanismen, die zur Induktion und zum Stopp der Zellteilung beitragen. Darüber hinaus schlagen wir Alternativen zu den Therapien von Tumorerkrankungen mit CDK4/6-Inhibitoren vor.

Transkriptionsfaktoren E2F, B-MYB und FOXM1 hervorgerufen (Abb. 1). Diese Transkriptionsfaktoren wirken alle als Onkogene (1,2). Wir haben gezeigt, dass sowohl B-MYB als auch FOXM1 ihre onkogene Wirkung durch eine indirekte Bindung an die Promotoren der Zellzyklus-Zielgene ausüben (4,5). Die Aktivität der CDK4 und CDK6 dienen in diesem System als Umschalter zwischen Tumorsuppression und Onkogenese. Daher wurden Inhibitoren dieser beiden Kinasen für die Tumorthherapie entwickelt. Allerdings besitzen CDK4/6-Inhibitoren nicht das breite Anwendungsspektrum, welches man aufgrund der Bedeutung der CDK4/6-Kinasen für die Zellteilung eigentlich erwarten konnte.

Die Erweiterung der therapeutischen Ansätze über die CDK4/6-Kinase-Inhibitoren hinaus war das Ziel unserer Untersuchungen. Im Rahmen des Projekts haben wir untersucht, welche weiteren Regulationswege zusätzlich zur Hemmung von CDK4/6 moduliert werden könnten (Abb. 2). Diese Arbeiten zielen darauf ab, Alternativen zu oder Kombinationen mit CDK4/6-Inhibitoren für potenzielle Therapien zu erkunden.

Konkret haben wir die Funktion der Onkogene durch einen RNAi-vermittelten Knockdown über small interfering RNAs (siRNAs) untersucht, beispielsweise mit siMYB (Abb. 2). Weitere Beispiele für unsere Untersuchungen umfassen die Verwendung von Volasertib zur Hemmung des PLK1-Signalwegs, YKL-5-124 als CDK7-Inhibitor und NU-6102 zur Hemmung der Kinasen CDK1 und CDK2. Wir haben die Möglichkeiten der Interferenz mit CDK4/6-Inhibitoren untersucht und Abemaciclib als Repräsentanten dieser Klasse verglichen oder kombiniert.

Abb. 2
Parallele Signalwege und ihre Modulation durch
Pharmaka, Knockdowns und Knockouts



Einige der besonders bemerkenswerten Ergebnisse aus dem Projekt sind hier repräsentativ zusammengefasst.

2. Ergebnisse

2.1 Verschiedene CDK-Inhibitoren wirken hemmend auf die Expression von Zellzyklusgenen

Die Expression von Zellzyklusregulatoren ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung von Krebs. In nahezu allen Tumoren ist daher die Expression der meist onkogen wirkenden Faktoren dereguliert.

Wir haben untersucht, ob unterschiedlich wirkende Kinase-Inhibitoren die Expression von Zellzyklusregulatoren hemmen. Eine solche Hemmung würde dann einen der zentralen Mechanismen offenlegen, mit denen die Kinase-Inhibitoren die Zellteilung stoppen. Dazu haben wir sowohl Volasertib als PLK1-Inhibitor, YKL-5-124 als CDK7-Inhibitor, NU-6102 als Inhibitor der Kinasen CDK1 und CDK2 als auch Abemaciclib als Inhibitor von CDK4 und CDK6 untersucht (Abb. 3). Als Zielgene haben wir das frühe Zellzyklusgen ORC1 und als spätes Gen Cyclin B2 ausgesucht. Für beide Gene hatten wir gefunden, dass sie über RB/E2F bzw. DREAM/MuvB reguliert werden (6).

Wir haben gefunden, dass alle vier Kinase-Inhibitoren die mRNA-Level sowohl von ORC1 als auch von Cyclin B2 deutlich herunterregulieren (Abb. 3). Der CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der relativen mRNA-Expression. Im Vergleich zu YKL-5-124 zeigte Abemaciclib jedoch eine geringere Potenz. Der CDK1/2-Inhibitor NU-6102 führte erst bei der höchsten Konzentration zu einer Reduktion der relativen mRNA-Expression sowohl früher als auch später Zellzyklusgene. Bemerkenswert ist, dass die Wirkstoffe ihre Wirkung unabhängig von den unterschiedlichen Promotorstrukturen entfalten. Der CDK7-Inhibitor YKL-5-124 zeigte die größte

Abb. 3 Expressionshemmung von Zellzyklusgenen durch Kinase-Inhibitoren

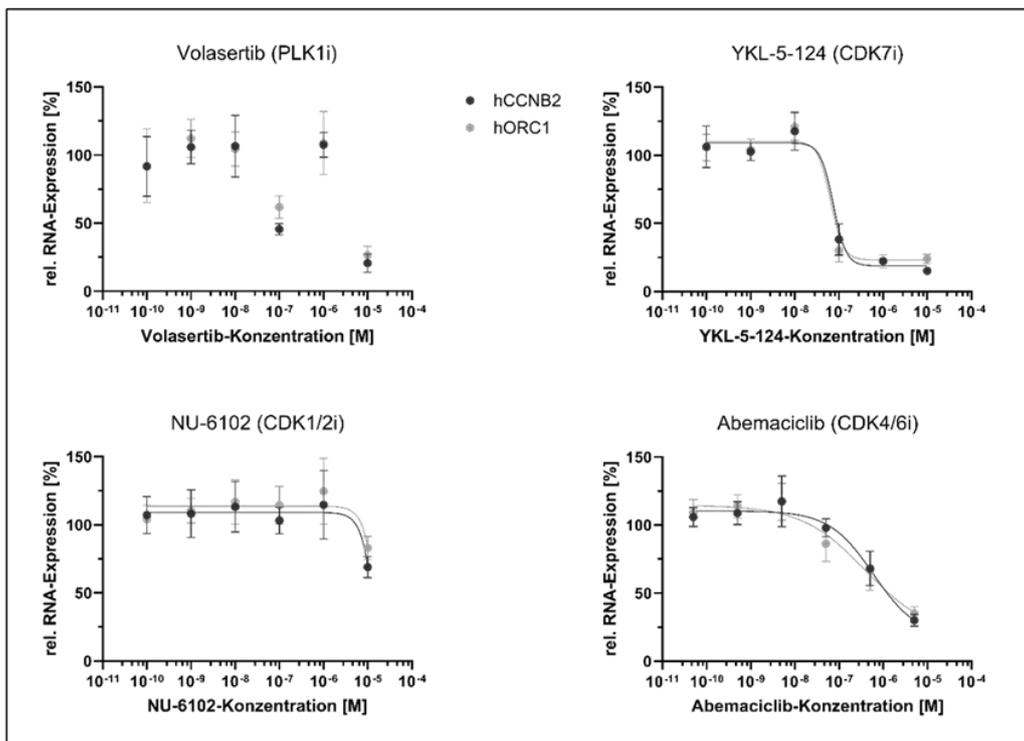


Abb. 3 Die Wirkstoffe Volasertib (PLK1-Inhibitor), YKL-5-124 (CDK7-Inhibitor), NU-6102 (Inhibitor von CDK1 und CDK2) und Abemaciclib (Inhibitor von CDK4 und CDK6) wurden in verschiedenen Konzentrationen für 48 Stunden auf HCT116 Wildtyp-Zellen gegeben. Die relative mRNA-Expression des späten humanen Zellzyklusgens Cyclin B2 (hCCNB2, dunkelgrau) und frühen humanen Zellzyklusgens Origin Recognition Complex subunit 1 (hORC1, hellgrau) wurde mittels RT-qPCR (n=3).

Potenz sowie den höchsten maximalen Effekt bei der Beeinflussung der relativen mRNA-Mengen von frühen und späten Zellzyklusgenen (Abb. 3).

Besonders wichtig ist, dass die beiden Zielgene als Repräsentanten für zentrale Zellzyklusregulatoren fungieren, die alle durch denselben Mechanismus reguliert werden. Damit sind die Inhibitoren in der Lage, die Expression einer Gruppe von mehreren hundert Zellregulatoren zu hemmen (1,2). Für die behandelten Zellen bedeutet dies, dass der Mangel an Faktoren, die die Zellteilung antreiben, zu einem Zellteilungsarrest führt.

2.2 Die Wirkung von YKL-5-124 und Abemaciclib benötigt das CDE/CHR-Tandem-Promotorelement

Nach der Untersuchung der allgemeinen Wirkung von CDK-Inhibitoren auf die mRNA-Expression der Zielgene Cyclin B2 (CCNB2) und Origin Recognition Complex Subunit 1 (ORC1) richteten wir unser Augenmerk auf die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Regulation. Hierfür wurde exemplarisch der Promotor des Cyclin B2-Gens analysiert. Promotor-Luziferase-Reporter-Gen-Assays wurden mit der Wildtyp- und der CDE/CHR-Mutanten-Variante des Cyclin-B2-Gens durchgeführt (Abb. 4). Die CDE/CHR-Elemente vermitteln die Bindung des DREAM-Komplexes und die darauffolgende Transkriptionsrepression (1).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl YKL-5-124 als auch Abemaciclib in einer konzentrationsabhängigen Weise zu einer deutlichen Reduktion der Cyclin B2-Promotoraktivität führen (Abb. 4). Diese Regulation wird durch die Hemmung der CDK4/6-Komplexe durch die Wirkstoffe erklärt (Abb. 2). Von entscheidender Bedeutung ist, dass diese Regulation nahezu vollständig entfällt, wenn die CDE/CHR-Tandemelemente des Cyclin B2-Promotors mutiert sind (Abb. 4). Die CDE/CHR-Elemente binden den DREAM-Komplex zur Transkriptionsrepression, während die Aktivierung durch das CHR-Element erfolgt, das die Komplexe aus A-MYB/MuvB, B-MYB/MuvB und FOXM1/MuvB für die Transaktivierung rekrutiert (4,5,7).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Regulation durch YKL-5-124 und Abemaciclib mechanistisch über das Umschalten von der DREAM-abhängigen Transkriptionsrepression an CDE/CHR-Elementen hin zur Aktivierung durch die Bindung der Komplexe A-MYB/MuvB, B-MYB/MuvB und FOXM1/MuvB an CHR-Elemente in den Promotoren vermittelt wird.

Abb. 4 Die Wirkung von YKL-5-124 und Abemaciclib benötigt das CDE/CHR-Tandem-Promotorelement

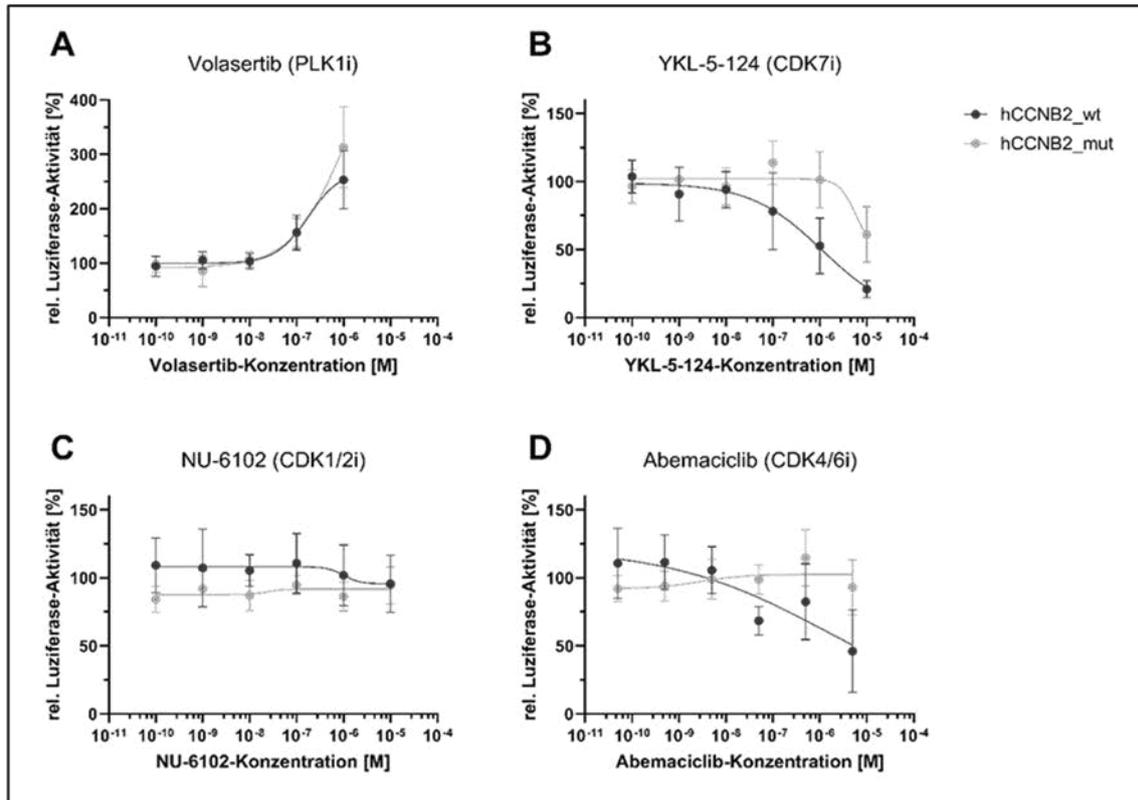


Abb. 4 Die Wirkung von YKL-5-124 und Abemaciclib benötigt das CDE/CHR-Tandem-Promotorelement. HCT-116 Wildtyp (WT)-Zellen wurden 24 h vor Behandlungsbeginn mit den unterschiedlichen Reporter-gen-Konstrukten transfiziert. Das eine Reporter-gen-Konstrukt hatte den Wildtyp-Cyclin B2-Promotor (hCCNB2_wt, dunkelgrau) und das andere Reporter-gen-Konstrukt den CDE/CHR-mutierten Cyclin B2-Promotor (hCCNB2_mut, hellgrau). Anschließend erfolgte für 48 h die Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen. Nach der Behandlung erfolgte die Analyse der rel. Luziferase-Aktivität mittels Reporter-gen-Assay (n=3). Alle Messwerte wurden auf die entsprechenden DMSO-Kontrollen normalisiert. Dargestellt sind die rel. Luziferase-Aktivität [%] in Abhängigkeit von der eingesetzten Wirkstoffkonzentration [M] für die Wirkstoffe Volasertib (A), YKL-5-124 (B), NU-6102 (C) und Abemaciclib (D).

2.3 Die meisten Inhibitoren führen zu einer Reduktion des Zellanteils in der S-Phase.

Neben der Genregulation ist die Kontrolle der Zellteilung ein wesentlicher Faktor für die Relevanz eines Therapieansatzes. Um die Auswirkungen auf die Zellzyklusregulation zu analysieren, wurden die Inhibitoren YKL-5-124 (CDK7-Inhibitor), NU-6102 (CDK1/2-Inhibitor), Abemaciclib (CDK4/6-Inhibitor) und Volasertib (PLK1-Inhibitor) in verschiedenen Konzentrationen auf Zellen appliziert. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung untersucht (Abb. 5).

Es wurde festgestellt, dass alle getesteten Inhibitoren die Zellzyklusverteilung signifikant beeinflussen. Die meisten Zellen treten entweder in einen G1/S- oder G2/M-Arrest ein. In beiden Fällen führt dies zu einer Abnahme der Zellpopulation in der S-Phase. Für Volasertib wurde festgestellt, dass neben einem ausgeprägten G2/M-Arrest zusätzlich Endoreduplikation und ein Pseudo-G2/M-Arrest auftreten. Dabei replizieren die Zellen ihr Genom teilweise oder vollständig, ohne sich jedoch in zwei Tochterzellen zu teilen (Abb. 5).

2.4 Volasertib-Behandlung führt zum G2/M-Zellzyklusarrest abhängig von RB und DREAM. Der Verlust von RB- und DREAM-Aktivität erlaubt den Zellen in die Endoreduplikation zu gehen.

Die Wirkung von Volasertib auf die Zellen haben wir auch mechanistisch genauer untersucht. Wir haben dabei geklärt, in welchem Maße die Effekte von RB und dem DREAM-Komplex abhängig sind.

Abb. 5 Die meisten Inhibitoren führen zu einer Reduktion des Zellanteils in der S-Phase.

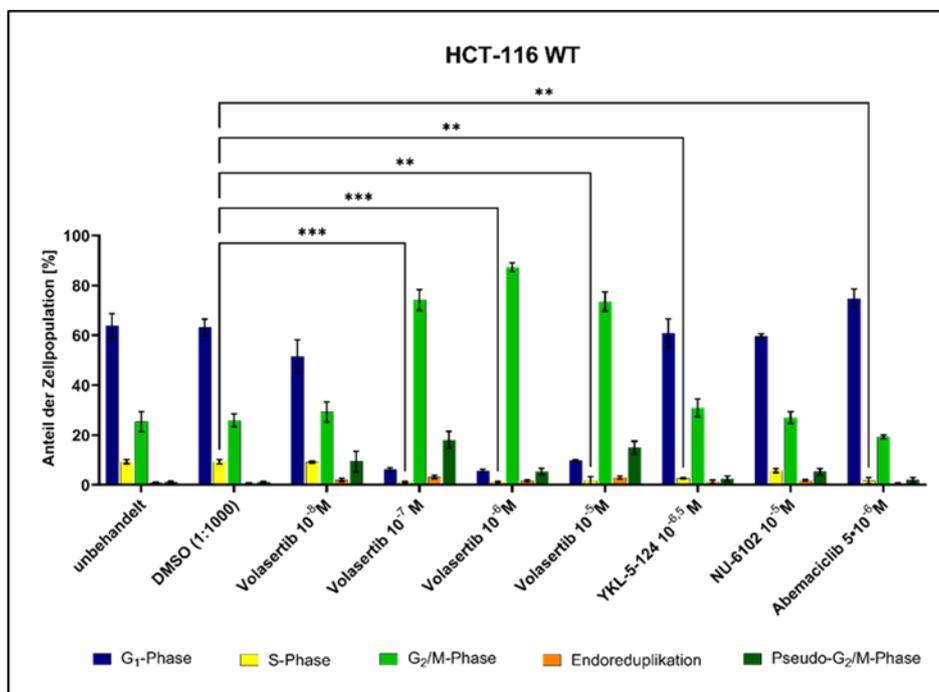


Abb. 5 Die meisten Inhibitoren führen zu einer Reduktion des Zellanteils in der S-Phase. Die HCT-116 WT Zellen wurden für 48 h mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt. Für die Ermittlung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen mit PI-gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der Anteil der Zellpopulation [%] in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G₁, blau; S, gelb; G₂-M, hellgrün; Endoreduplikation, orange; Pseudo-G₂/M, dunkelgrün) für die jeweilige Behandlungsbedingung (n=3). Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit DMSO behandelte HCT-116 WT Zellen. Es wurde ein beidseitiger ANOVA-Test für die Bestimmung der Signifikanz durchgeführt (*, p<0.05; *, p<0.01; ***, p<0.001).

Die Polo-Like Kinase 1 (PLK1) spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Übergangs von der G2-Phase zur Mitose. Wir hatten bereits gezeigt, dass die Expression dieses wichtigen Faktors von der DREAM-Bindung an CDE- und CHR-Elemente im Promotor des PLK1-Gens verantwortlich ist (8). Die zentrale Bedeutung von PLK1 für den G2/M-Übergang liegt wesentlich in der Phosphorylierung und der daraus folgenden Aktivierung von FOXM1 begründet (9). Wir hatten gezeigt, dass FOXM1 zunächst direkt an den MuvB-Komplex und dadurch an CHR-Elemente in Promotoren bindet (5). Diese indirekte Bindung ist für die onkogene Wirkung von FOXM1 von zentraler Bedeutung (1).

Das Einwirken von Volasertib auf die Wildtyp-Zellen führt zu einem deutlich ausgeprägten Zellzyklusarrest in der G2-Phase bzw. der Mitose. Die Krebszellen gehen hier also in einen Arrest und können sich nicht weiter teilen, solange das Medikament auf die Zellen einwirkt. Nach Absetzen von Volasertib werden die Zellen wahrscheinlich wieder in den Zellzyklus eintreten.

Interessanterweise ist das Verhalten Zellen, in denen sowohl die LIN37-Untereinheit des DREAM-Komplexes als auch der Tumorsuppressor RB deletiert worden waren, deutlich anders. Diese Doppelknockoutzellen teilen sich zwar ebenfalls nicht, aber sie replizieren weiterhin ihre DNA. Diese Endoreplikation oder Endoreduplikation führt zu Zellen, die ein Mehrfaches ihres regulären DNA-Gehalts besitzen. Leben solche Zellen unter Zellstress, sterben sie häufig durch Apoptose ab. Das geschieht auch nach Absetzen von Medikamenten wie Volasertib. Die Intaktheit der RB/E2F- und DREAM-Signalwege hat also einen deutlichen Einfluss auf das Zellverhalten unter Behandlung mit Volasertib.

Abb. 6 Volasertib-Behandlung führt zum G2/M-Zellzyklusarrest abhängig von RB und DREAM. Der Verlust von RB- und DREAM-Aktivität erlaubt den Zellen in die Endoreduplikation zu gehen.

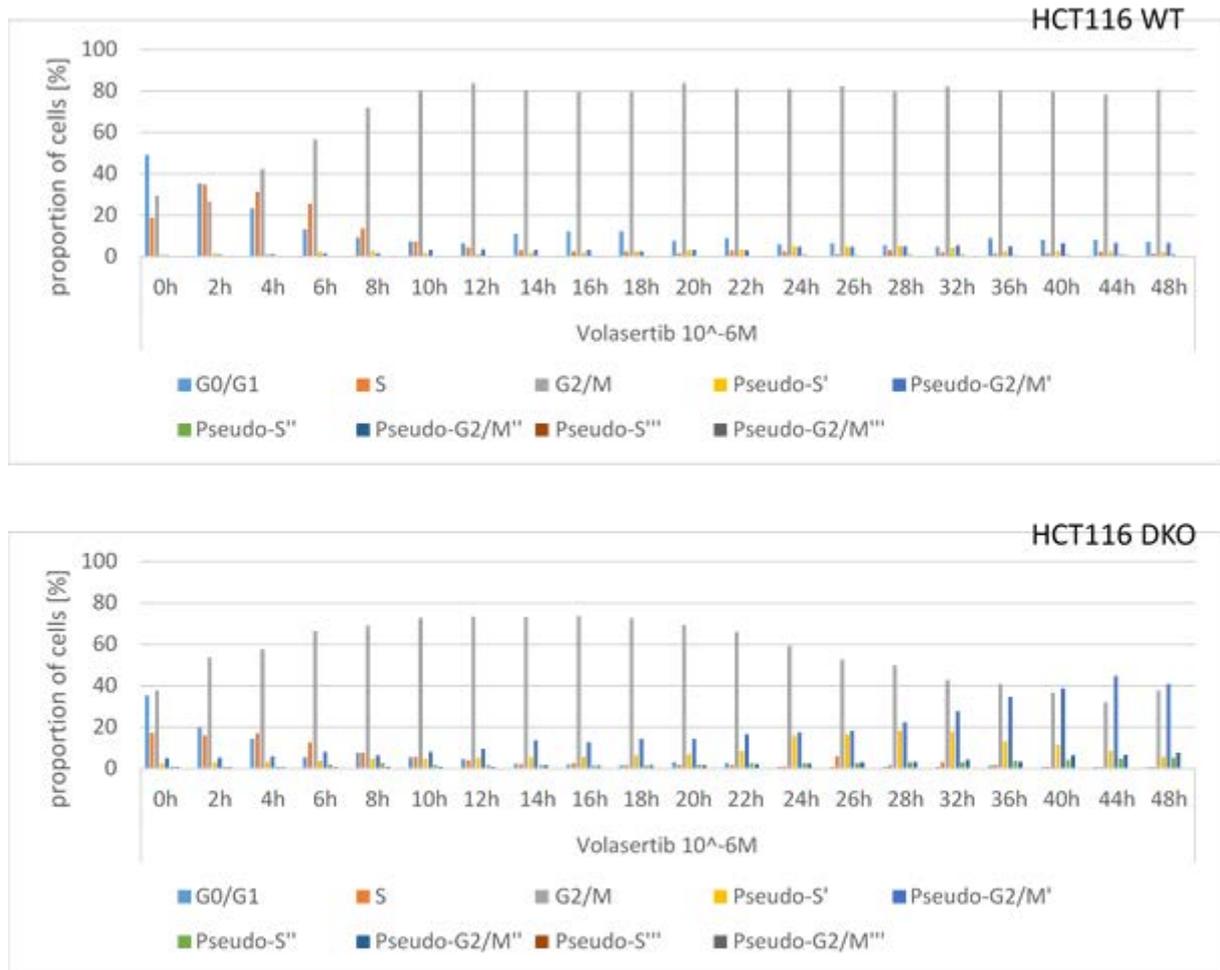


Abb. 6 Durchflusszytometrie-Analysen von HCT116 Wildtyp-Zellen (WT) und HCT116-Doppelknockoutzellen (DKO), die Deletionen in den RB- und LIN37/DREAM-Genen besitzen. Die Zellen wurden vor und nach Behandlung mit Volasertib zu verschiedenen Zeiten analysiert. Die Analysen geben Zellpopulationen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wieder. Zellen mit einem Chromosomensatz jenseits von 4n (Pseudo-Phasen) haben eine Endoreduplikation oder allgemein eine Endoreplikation durchlaufen.

2.5 HDAC-Inhibitoren bewirken über eine Aktivierung von p21 und DREAM eine Hemmung der Bildung von DNA-Reparaturproteinen wie BRCA1 und BRCA2

Wie oben bereits kurz erwähnt, ist DREAM als Integrator von p53-p21-Signalwegen ein wichtiger Repressor zahlreicher DNA-Reparaturproteine. Hierzu zählen die Proteine BRCA1 und BRCA2. Die zentrale Rolle von BRCA-Proteinen für die Integrität der DNA wird dadurch unterstrichen, dass inaktivierende Mutationen in diesen Genen eine kritische Rolle bei einer Reihe erblicher Tumorerkrankung wie vererbbarem Brustkrebs oder dem Ovarialkarzinom spielen. Auf der anderen Seite sind Tumore mit entsprechender Fehlfunktion von BRCA-Proteinen empfindlicher gegenüber DNA-schädigenden Therapeutika, was man in der Krebsbehandlung heute bereits ausnutzt.

Da sog. Histon-Deacetylasen mit DREAM-Komponenten interagieren können und in vielen anderen Fällen transkriptioneller Regulatoren für eine Repression von Zielgenen verantwortlich sind, wäre es prinzipiell vorstellbar, dass diese Funktion auch im Falle der Repressorwirkung von DREAM realisiert ist. Dies hat für uns die Frage aufgeworfen, ob Inhibitoren von HDACs, welche bereits in einer Reihe von Tumorerkrankungen therapeutisch verwendet werden, womöglich einen (für eine Therapie unerwünschten) induzierenden Effekt auf die DNA-Reparatur in Tumoren besitzen. Auf der anderen Seite ist aber auch bekannt, dass HDAC-Inhibitoren zu einer Aktivierung von p21 führen können, was wiederum einen DREAM-vermittelten Hemmeffekt auf die Expression von BRCA-Proteinen ausüben würde.

Um den Summeneffekt von HDAC-Inhibitoren auf die DREAM-regulierte Expression von DNA-Reparaturproteinen daher näher zu charakterisieren, testeten wir die Expression diverser DREAM-regulierter Proteine inklusive BRCA1 und BRCA2 nach Behandlung von diversen Tumorzellen mit HDAC-Inhibitoren.

Hierbei zeigte sich in unterschiedlichen Tumorzelllinien des Magens und des Dickdarms eine klar Dosis-abhängige Herunterregulierung von BRCA1 und BRCA2 (Abb. 7).

Bemerkenswerterweise war dieser Effekt auch in einer p53-defizienten Zelllinie (HCT116 p53^{-/-}) beobachtbar, während die entsprechende Wirkung in p21- oder Lin37-defizienten, sonst isogenetischen Zelllinien (HCT116 p21^{-/-} bzw. HCT116 Lin37^{-/-}) unterblieb. Folglich sind ein funktioneller DREAM-Komplex sowie eine Aktivierbarkeit von p21 notwendige Voraussetzungen für die Hemmwirkung von HDAC-Inhibitoren auf BRCA-Proteine.

Die biologische Relevanz dieser Effekte wurde dadurch unterstrichen, dass eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren tatsächlich die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber sog. PARP-Inhibitoren erhöhte, von denen bekannt ist, dass diese bei einer inhibierten BRCA-Funktion eine stärkere antineoplastische Wirkung besitzen. Auf diese Weise eröffnen unsere Untersuchungen wiederum neue Optionen für Kombinationstherapien mit verbesserter Antitumor-Wirkung.

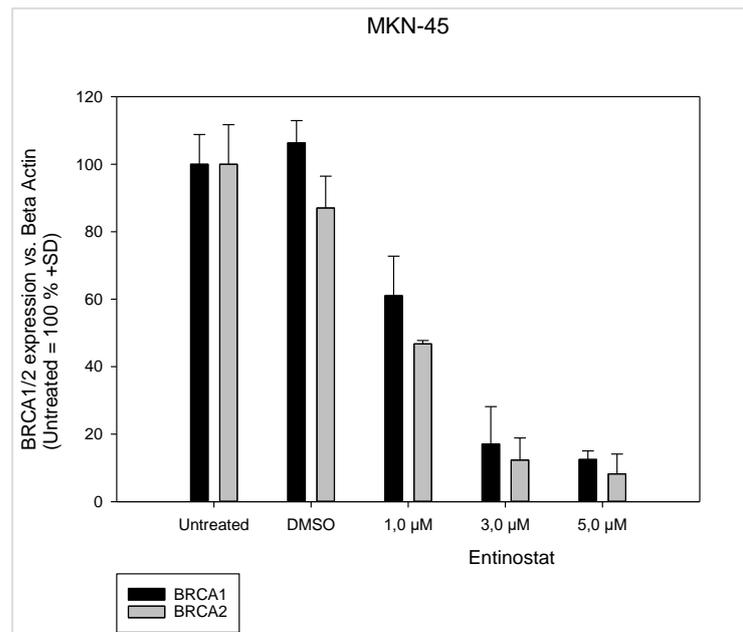


Abb. 7

Expression der Proteine BRCA1 und BRCA2 in Magenkarzinomzellen. Einfluss einer Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Entinostat (1 – 3 µM für 48 h) im Vergleich zu unbehandelten oder Vehikel-(DMSO)-behandelten Zellen.

2.6 CeDaD - Neuer Assay zur gleichzeitigen Messung von Zellteilung und Zelltod

Zur gleichzeitigen Messung von Zellteilung und Apoptose aus einer Probe haben wir einen Kombinations-Assay entwickelt.

Der Zellzyklus und die verschiedenen Formen des programmierten Zelltods sind eng miteinander verknüpft. Ein herausragendes Beispiel hierfür ist der Tumorsuppressor p53, der nicht nur Apoptose induziert, sondern auch eine zentrale Rolle beim Zellzyklusarrest spielt. Folglich ist die gleichzeitige Analyse von Zellteilung und Zelltod von erheblichem Interesse für die zellbiologische Forschung. Traditionell erfordern diese Prozesse jedoch unterschiedliche Assays, was eine parallele Untersuchung erschwert. Um dieses Problem zu lösen, stellen wir einen neuartigen kombinierten Assay vor, den sogenannten CeDaD-Assay (Cell Death and Division Assay), der die gleichzeitige Quantifizierung von Zellteilung und Zelltod innerhalb einer Zellpopulation ermöglicht. Dieser Assay basiert auf einer einfachen durchflusszytometrischen Methode, die eine Färbung mit Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) zur Überwachung der Zellteilung mit einer Annexin-V-basierten Färbung zur Quantifizierung des Zelltods kombiniert.

Für die Ergebnisse erfolgte bereits eine Einreichung zur Publikation:

CeDaD – A Novel Assay for Simultaneous Tracking of Cell Death and Division in a Single Population
Lukas Nöltner, Kurt Engeland und Robin Kohler (zur Veröffentlichung eingereicht)

2.7 A-MYB ist ebenso wie B-MYB ein Onkogen

Mit unseren Untersuchungen zum Transkriptionsfaktor A-MYB ist ein wesentlicher Teil unserer Arbeiten auf dem Projekt bereits veröffentlicht.

A-MYB (MYBL1) ist ein Transkriptionsfaktor, der primär für seine Rolle in der Meiose von Spermatozyten bekannt ist. Sein Homolog, B-MYB, ist ein zentrales Onkogen und ein Hauptregulator für die Aktivierung später Zellzyklusgene (1,4). Zur Genaktivierung bildet B-MYB einen Komplex mit MuvB und wird indirekt an Promotorstellen der Zielgene, den sogenannten Cell Cycle Genes Homology Region (CHR)-Sequenzen, rekrutiert. Die Aktivierung durch den B-MYB-MuvB (MMB)-Komplex ist essenziell für den erfolgreichen Ablauf der Mitose.

In unseren Arbeiten zeigen wir eine neue Funktion von A-MYB bei der transkriptionellen Regulation des mitotischen Zellzyklus und belegen, dass A-MYB die Funktion von B-MYB übernehmen kann. Knockdown-Experimente in nicht spermatogenen Zellen zeigen, dass der Verlust von B-MYB allein lediglich zu einer Verzögerung des Zellzyklus führt (Abb. 8). Erst der doppelte Knockdown von B-MYB und A-MYB führt zu einem G2/M-Zellzyklusarrest, Endoreduplikation und Apoptose. Mechanistisch gesehen kann A-MYB B-MYB durch Bindung an MuvB ersetzen und bildet einen A-MYB-MuvB-Komplex, der über CHR-Sequenzen Zielgene aktiviert (Abb. 9). Unsere Analysen zeigen, dass A-MYB dieselben Zielgene wie B-MYB reguliert, von denen viele zentrale Regulatoren des Zellteilungszyklus codieren.

Abb. 8 Erst der Knockdown von A-MYB und B-MYB stoppt die Zellteilung.

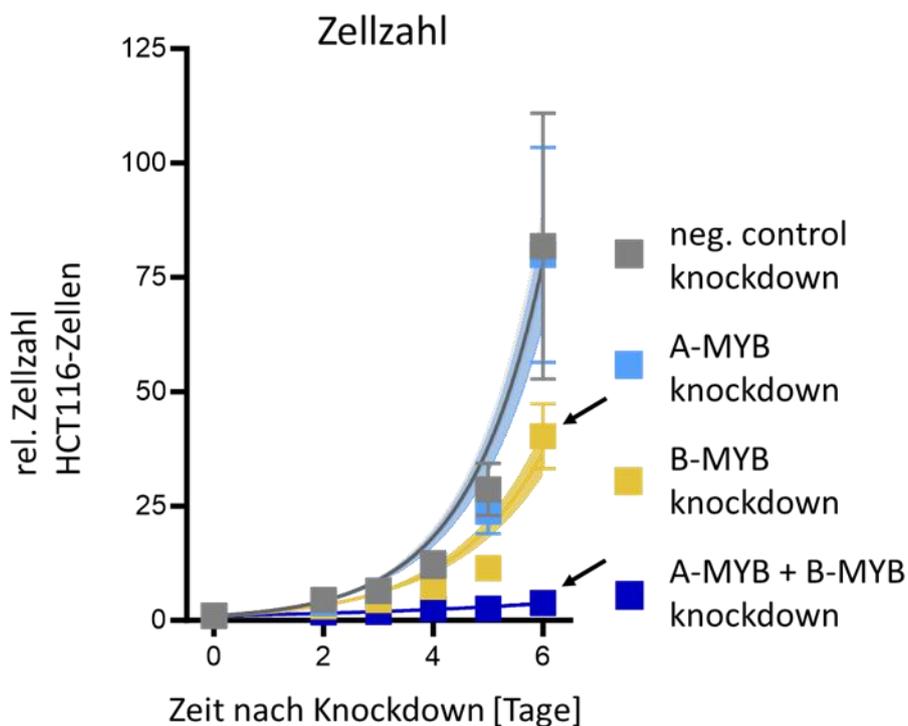


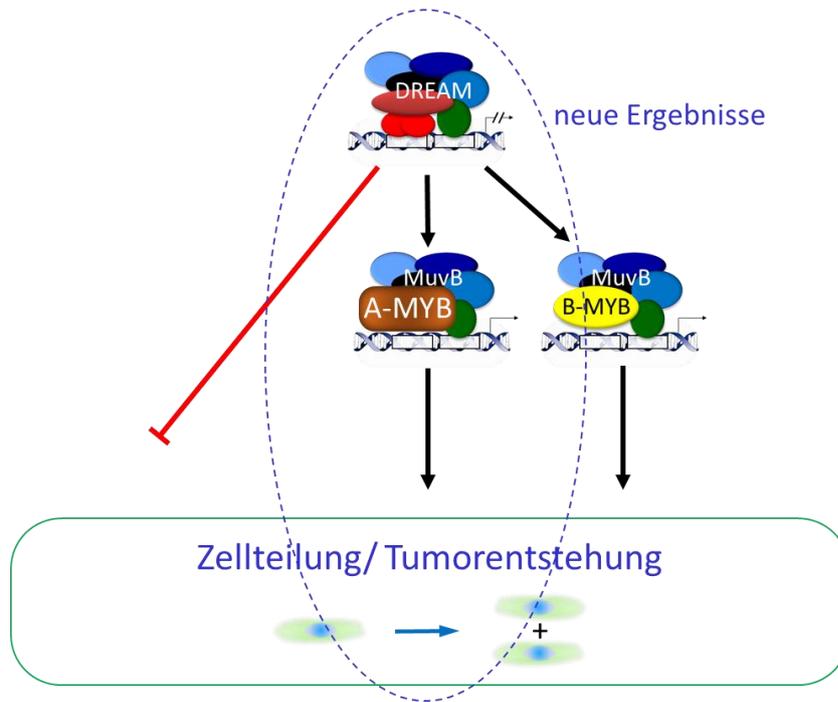
Abb. 8 Erst der Knockdown von A-MYB und B-MYB stoppt die Zellteilung.

HCT116-Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von siRNAs gerichtet gegen A-MYB oder B-MYB transfiziert. Nach bestimmten Zeiten wurde die Zellzahl bestimmt.

Zusammenfassend zeigen wir, dass A-MYB als Aktivator des mitotischen Zellzyklus fungiert, indem es späte Zellzyklusgene aktiviert, und damit eine über seine bekannte Rolle in der Meiose hinausgehende Bedeutung für die Zellproliferation besitzt. Damit fungiert A-MYB als Onkogen. Seine Hemmung beispielsweise durch siRNA ist für einen auf B-MYB basierenden Therapieansatz unerlässlich (Abb. 2, 8 und 9).

Abb. 9

A-MYB ist ein Onkogen und
kann B-MYB ersetzen



Veröffentlichung zu A-MYB-Funktion:

A-MYB substitutes for B-MYB in activating cell cycle genes and in stimulating proliferation

Robin Kohler und Kurt Engeland

Nucleic Acids Res. 2024 Jul 8;52(12):6830-6849 (Impact Factor: 16,7)

4. Zusammenfassung und Ausblick

Unsere Ergebnisse zeigen, dass einige Kinase-Inhibitoren in der Lage sind, die Zellteilung effektiv zu stoppen. Darüber hinaus konnten wir A-MYB als bisher unbekanntes Onkogen identifizieren. Der siRNA-basierte Knockdown von A-MYB sowie des verwandten Onkogens B-MYB resultiert in einer effektiven Hemmung der Zellteilung. Diese Ergebnisse wurden bereits in einem renommierten Fachjournal veröffentlicht.

Ein neuartiger kombinierter Assay zur simultanen Analyse von Zellteilung und Apoptose wurde entwickelt und zur Publikation eingereicht. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass der Mechanismus des Zellteilungsstopps über Signalwege vermittelt wird, die weitgehend von uns charakterisiert wurden. Diese Signalwege verlaufen über eine Kombination der DREAM/MuvB- und der RB/E2F-Signalwege. In Verbindung mit dem Tumorsuppressor p53 werden die p53-p21-RB- und p53-p21-DREAM-Signalwege aktiviert. Bei einem Verlust von p53 können diese tumorsuppressiven Signalwege durch die untersuchten Medikamente teilweise reaktiviert werden.

Die hier präsentierten Daten repräsentieren lediglich einen Teil der von uns erzielten Resultate. Darüber hinaus bilden diese Resultate die Grundlage für weitere Untersuchungen, die potenzielle klinische Anwendungen dieser Erkenntnisse erforschen werden.

Referenzen

1. Engeland, K. (2018) Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death. Differ*, **25**, 114-132.
2. Engeland, K. (2022) Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*, **29**, 946-960.
3. Fischer, M., Steiner, L. and Engeland, K. (2014) The transcription factor p53: Not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle*, **13**, 3037-3058.
4. Müller, G.A., Quaas, M., Schümann, M., Krause, E., Padi, M., Fischer, M., Litovchick, L., DeCaprio, J.A. and Engeland, K. (2012) The CHR promoter element controls cell cycle-dependent gene transcription and binds the DREAM and MMB complexes. *Nucleic Acids Res*, **40**, 1561-1578.
5. Chen, X., Müller, G.A., Quaas, M., Fischer, M., Han, N., Stutchbury, B., Sharrocks, A.D. and Engeland, K. (2013) The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism. *Mol. Cell Biol*, **33**, 227-236.
6. Müller, G.A., Stangner, K., Schmitt, T., Wintsche, A. and Engeland, K. (2016) Timing of transcription during the cell cycle: Protein complexes binding to E2F, E2F/CLE, CDE/CHR, or CHR promoter elements define early and late cell cycle gene expression. *Oncotarget*, **8**, 97736-97748.
7. Kohler, R. and Engeland, K. (2024) A-MYB substitutes for B-MYB in activating cell cycle genes and in stimulating proliferation. *Nucleic Acids Res*, **52**, 6830-6849.
8. Fischer, M., Quaas, M., Nickel, A. and Engeland, K. (2015) Indirect p53-dependent transcriptional repression of Survivin, CDC25C, and PLK1 genes requires the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/CDKN1A and CDE/CHR promoter sites binding the DREAM complex. *Oncotarget*, **6**, 41402-41417.
9. Fu, Z., Malureanu, L., Huang, J., Wang, W., Li, H., van Deursen, J.M., Tindall, D.J. and Chen, J. (2008) Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat. Cell Biol*, **10**, 1076-1082.