



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel insights into old anticancer drugs

Zanden, S.Y. van der

Citation

Zanden, S. Y. van der. (2021, March 2). *Novel insights into old anticancer drugs*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3135058>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3135058>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden

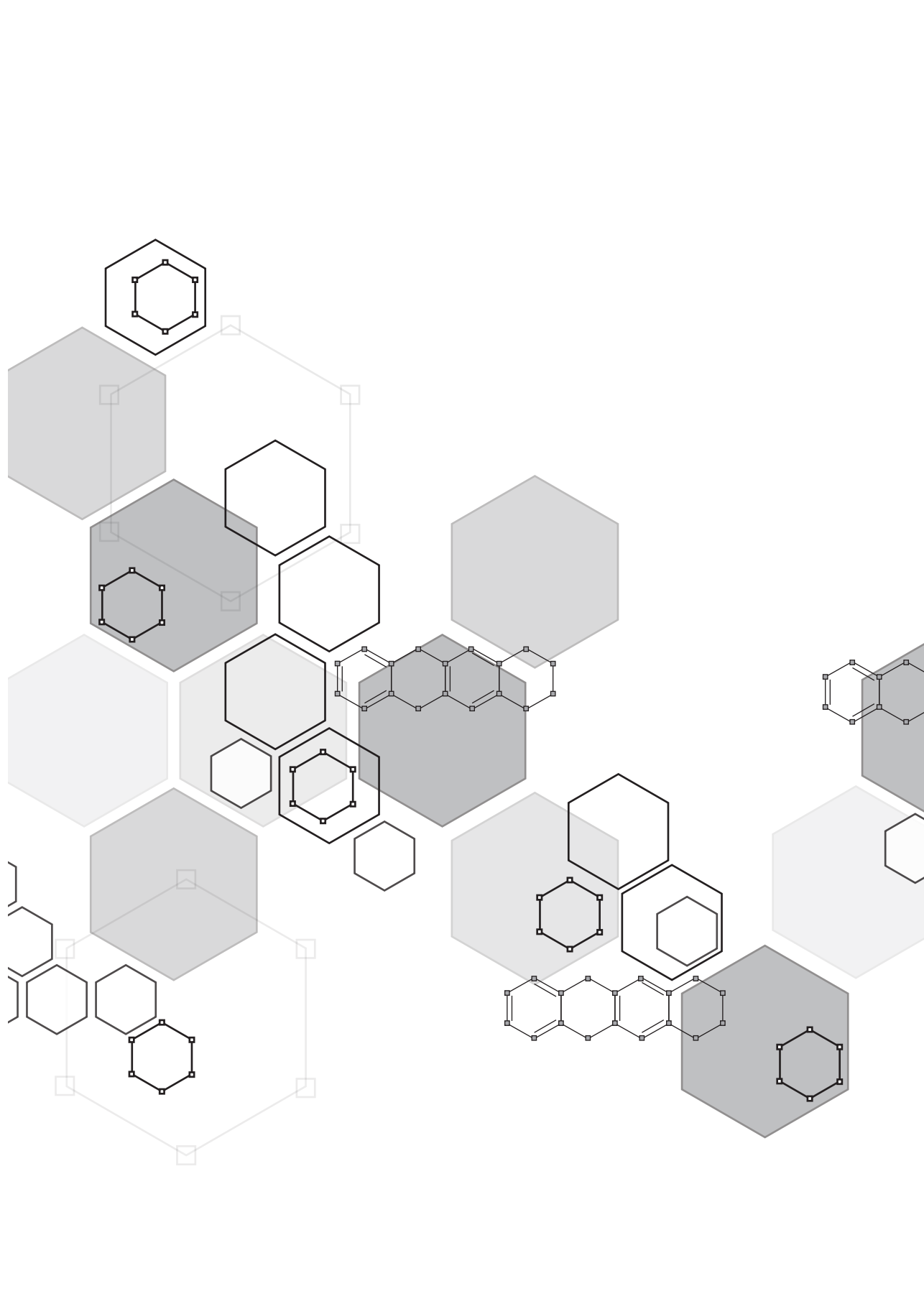


The handle <http://hdl.handle.net/1887/3135058> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zanden, S.Y. van der

Title: Novel insights into old anticancer drugs

Issue date: 2021-03-02



Nederlandse samenvatting
List of publications
Curriculum vitae
Acknowledgements

A



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Na infectieziekten sterven wereldwijd de meeste mensen aan kanker. Eén op de vijf mannen en één op de zes vrouwen krijgt tijdens zijn of haar leven deze diagnose [1]. Een tumor ontstaat wanneer normale cellen ongecontroleerd beginnen te delen, met als gevolg ontregelde weefselgroei. Deze ongecontroleerde celdeling kan ontstaan door veranderingen in genen die de celcyclus en celgroei reguleren, als gevolg van mutaties in of deleties van de zogenoemde oncogenen of tumor suppressie genen [2]. Er zijn veel verschillende therapieën om kankerpatiënten te behandelen, en met de groeiende medische kennis worden er voortdurend nieuwe behandelopties ontwikkelend en geïmplementeerd. Tot deze nieuwe behandelingen behoren doelgerichte therapieën en immunotherapie, welke beide erg effectief zijn voor specifieke tumor types. Maar ondanks deze ontwikkelingen zijn radiotherapie, het operatief verwijderen en/of chemotherapie nog steeds de primaire behandelopties voor de meeste tumoren. Een van de meest gebruikte chemotherapieën voor de behandeling van solide en hematologische tumoren zijn moleculen uit de anthracycline klasse. [3]. Daunorubicine was de eerste anthracycline die werd ontdekt in 1960, waar het werd gevonden en geïsoleerd uit een grondmonster [4, 5]. Dit molecuul wordt geproduceerd door de actino-bacterie *Streptomyces peucetius* en wordt gewonnen door middel van fermentatie. Daunorubicine werd in eerste instantie bestudeerd voor zijn antibacteriële werking, maar er werd al snel ontdekt dat het ook antitumor activiteit heeft [5]. Kort na de ontdekking van daunorubicine werd doxorubicine, een anthracycline met vergelijkbare chemische structuur, geïsoleerd uit een andere *S. peucetius* bacteriestam [6]. Daunorubicine en doxorubicine werken door te interfereren met de katalytische cyclus van topoisomerase II α (Topo II α), met de formatie van DNA dubbelstrengs breuken tot gevolg [7]. Cellen activeren dan hun DNA schade reparatie mechanisme om de breuk te repareren of om celdood te initiëren als de schade te groot is [8]. Snel delende cellen, zoals tumor cellen, zijn over het algemeen gevoeliger voor DNA schade vergeleken met normale cellen, wat zorgt voor een therapeutisch venster [8]. Een tweede antitumor mechanisme van anthracyclines is via de verwijdering van histonen uit het chromatine [9, 10]. Dit heeft verschillende gevolgen, zoals epigenetische en transscriptionele veranderingen, welke samen worden omschreven als chromatine schade.

Tegenwoordig worden er ieder jaar meer dan één miljoen patiënten behandeld met anthracyclines, ondanks dat het exacte mechanisme waarmee deze medicijnen tumorcellen doden nog steeds niet volledig bekend is. Verder geven deze medicijnen hevige bijwerkingen, zoals hartfalen, het vormen van nieuwe tumoren en onvruchtbaarheid. Inzicht hoe deze zeer effectieve antikanker medicijnen werken en wat de hevige bijwerkingen veroorzaakt kan een enorme bijdrage leveren aan de behandeling en algehele gezondheid van veel patiënten. Het bestuderen van oude medicijnen kan daarom, ook tegenwoordig nog, voor nieuwe kennis en inzichten zorgen die een bijdrage leveren aan het verbeteren van de huidige behandelopties voor kankerpatiënten.

Hevige bijwerkingen door doxorubicine: oorzaken en hoe kunnen deze overkomen worden

Doxorubicine is een zeer effectief medicijn voor de behandeling van kanker, maar patiënten worden geteisterd door zware bijwerkingen. Deze bijwerkingen kunnen verdeeld worden in twee groepen (*i.*) acute bijwerkingen zoals misselijkheid, overgeven, diarree en beenmerg suppressie die over het algemeen tijdelijk zijn, en (*ii.*)

langdurige en onomkeerbare bijwerkingen zoals onvruchtbaarheid, de ontwikkeling van nieuwe tumoren als gevolg van de therapie, en cumulatieve hartschade. Juist deze laatste categorie bijwerkingen beperkt de behandeling en is erg zwaar voor (gezezen) patiënten [11, 12]. In de hoop om deze tweede categorie bijwerkingen te verzachten is er in het verleden, en wordt er nog steeds, uitvoerig onderzoek gedaan naar het onderliggende mechanisme. Ook zijn er doxorubicine varianten gemaakt en getest in de hoop dat deze minder bijwerkingen geven. Helaas worden slechts een aantal van deze nieuwe anthracycline varianten op dit moment gebruikt als behandeling, met vergelijkbare bijwerkingen. In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de verschillende werkingsmechanismen van doxorubicine, en de verschillende mogelijke oorzaken voor de bijwerkingen zoals beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Verder geven wij ons perspectief op de oorzaak van de verschillende bijwerkingen, en geven wij suggesties hoe de bijwerkingen van deze type medicijnen kunnen worden verminderd om de gezondheid van de patiënten te verbeteren.

Identificatie van nieuwe factoren voor doxorubicine resistentie

Doxorubicine behandeling gaat niet alleen gepaard met hevige bijwerkingen, maar kan ook belemmerd worden doordat er resistentie optreedt. Er is nog veel onbekend over hoe tumoren precies resistentie ontwikkelen tegen doxorubicine. Daarom hebben we een genoom-breed mutagenese-experiment uitgevoerd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een virus om willekeurige genen uit te schakelen, om op deze manier mechanisme te identificeren die betrokken zijn bij de ontwikkeling van resistentie tegen doxorubicine. In **Hoofdstuk 2** beschrijven we de identificatie van drie nieuwe factoren (Keap1, het SWI/SNF complex en C9orf82) die onafhankelijk van elkaar een rol spelen in doxorubicine resistentie door te interfereren met het DNA-schade en -reparatiemechanisme. Zowel Keap1 als het SWI/SNF complex hebben een effect op het ontstaan van DNA-breuken door doxorubicine via Topo II α . Keap1 reguleert de expressie van Topo II α , terwijl afwezigheid van een functioneel SWI/SNF complex er voor zorgt dat Topo II α minder actief is omdat het niet kan binden aan het chromatine. In beide gevallen zorgt dit ervoor dat er minder DNA-breuken plaatsvinden na behandeling met doxorubicine. Anderzijds remt C9orf82 (ook wel bekend als CAAP1) het DNA reparatiemechanisme. Afwezigheid van C9orf82 zorgt ervoor dat DNA-schade sneller hersteld wordt. Hierdoor kunnen deze tumorcellen beter omgaan met de DNA-breuken die worden veroorzaakt door behandeling met doxorubicine of etoposide. Wat we gevonden hebben in het lab is ook relevant voor patiënten in de kliniek. Zo laten we zien dat er een correlatie is tussen effectiviteit van doxorubicine-behandeling bij borstkankerpatiënten, en de expressie van Keap1 en SWI/SNF complex subonderdelen SMARCB1 en SMARCA4 in de tumor van deze patiënten. Er zijn verschillende mutaties gevonden in subonderdelen van het SWI/SNF complex, Keap1 en C9orf82 afhankelijk van het tumortype [13-19], en het zou interessant zijn om vooraf te bepalen of patiënten wel baat zullen hebben bij de behandeling met Topo II α remmers zoals doxorubicine of etoposide. Met deze informatie kan dan voorkomen worden dat patiënten onnodig worden behandeld, en kan er gezocht worden naar alternatieve behandelmethodes die niet aangrijpen op Topo II α , zoals de topoisomerase I remmer topotecan of andere anthracyclines die alleen werken via chromatine schade zoals aclarubicine of diMe-Doxo.

Chromatine schade als voornaamste antitumor mechanisme van anthracyclines

De anthracyclines doxorubicine, daunorubicine, epirubicine en idarubicine zijn Topo II α remmers die DNA-breken veroorzaken door DNA-Topo II α -anthracycline complexen te vormen, waarbij de katalytische cyclus van Topo II α wordt belemmerd [7]. Als gevolg van deze DNA-schade wordt het DNA-reparatiemechanisme geactiveerd, wordt de celcyclus geremd en wordt celdood geïnduceerd [20]. Lang werd gedacht dat het veroorzaken van DNA-breken door Topo II α remming het voornaamste mechanisme is waarmee deze medicijnen celdood induceren in de tumor. Echter, recentelijk is er een tweede werkingsmechanisme ontdekt, namelijk verwijdering van histonen met als gevolg chromatine schade [9, 21]. In **Hoofdstuk 3** beschrijven we onze bevindingen die erop duiden dat juist de chromatine schade het voornaamste antitumor mechanisme van anthracyclines is. Hiervoor hebben we de biologische activiteit van verschillende anthracyclines bestudeerd; doxorubicine zorgt voor zowel DNA- als chromatine schade, terwijl anthracycline amrubicine en de structureel ongerelateerde Topo II α remmer etoposide alleen DNA-schade veroorzaken. Anderzijds veroorzaken aclarubicine en de nieuw gesynthetiseerde doxorubicine variant ,diMe-Doxo, chromatine schade zonder dat ze ook DNA-schade veroorzaken. De varianten die enkel chromatine schade veroorzaken (aclarubicine en diMe-Doxo) zijn effectief als antikanker medicatie in weefselkweek en muismodellen. Daarnaast vinden wij dat juist de combinatie van DNA- én chromatine schade de oorzaak is van doxorubicine geïnduceerde hartfalen. De varianten die ofwel alleen DNA-breken veroorzaken (etoposide en amrubicine) ofwel alleen chromatine schade veroorzaken (aclarubicine en diMe-Doxo), geen schade aanbrengen aan het hart van muizen. Behandeling van menselijke mini-harten met amrubicine (alleen DNA-schade) of aclarubicine (alleen chromatine schade) hebben geen effect op het contractievermogen van deze mini-harten. Echter, combinatie van deze twee stoffen zorgt voor een afname van de hartfunctie, vergelijkbaar met doxorubicine behandeling.

Andere langdurige bijwerkingen zoals het ontstaan van nieuwe tumoren als gevolg van de therapie, en verminderde vruchtbaarheid zijn ook afwezig of verminderd bij behandeling met anthracycline varianten die slechts één van de twee activiteiten bezitten. We laten hier zien dat het mogelijk is om de hevige bijwerkingen van doxorubicine te scheiden van de antikanker activiteit. Deze varianten zijn werkzaam als antikanker medicijn in verschillende tumor muismodellen, wat impliceert dat deze varianten gebruikt zouden kunnen worden voor patiënten die op het moment uitgesloten worden van behandeling vanwege de cardiovasculaire bijwerkingen, zoals (oude) patiënten met een zwak hart en/of patiënten die al eerder met anthracyclines behandeld zijn.

Chemische kenmerken bepalen de biologische activiteit van de anthracyclines

Naar aanleiding van onze bevindingen beschreven in **Hoofdstuk 3** onderzochten wij of een specifieke deel van de chemische structuur verantwoordelijk is voor de DNA-schade activiteit, zonder te interfereren met de chromatine schade activiteit om zo bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe anthracycline varianten met minimale bijwerkingen. Om dit te bewerkstelligen hebben we drie sets van anthracycline varianten gesynthetiseerd en getest voor hun activiteiten in weefselkweek. In **Hoofdstuk 4** evalueren we de DNA- en chromatine schade activiteit van tien doxorubicine/aclarubicine hybride varianten, en of tumorcellen in weefselkweek gevoelig zijn voor deze medicijnen. Structureel verschillen de tien varianten op drie punten: de anthraquinone aglycon, de lengte van de suikerketen en de modificatie van het

amine op de eerste suikergroep. Vergelijking van deze varianten laat een duidelijke correlatie zien tussen de efficiëntie van chromatine schade en de cytotoxiciteit in weefselkweek, wat overeenkomt met onze bevindingen in **Hoofdstuk 3**. We vinden dat de chromatine schade (en dus de cytotoxiciteit) sterk wordt verbeterd door *N,N*-dimethylering van de eerste suikergroep, dat het anthraquinone aglycon van doxorubicine iets effectiever is in het doden van tumorcellen in weefselkweek dan het aclarubicine aglycon, en dat de aclarubicine suikerketen beter is dan die van doxorubicine. Deze bevindingen resulteren in de identificatie van drie varianten (3, 8 en 11) (**Hoofdstuk 4**), die effectief tumorcellen doden in weefselkweek vergeleken met doxorubicine. Variant 11 combineert de drie optimale structurele eigenschappen, en is inderdaad de meest cytotoxische variant in dit rijtje. Deze drie (3, 8 en 11) varianten veroorzaken geen DNA-breuken, maar doden tumorcellen door het induceren van chromatine schade, wat het argument versterkt dat chromatine schade het belangrijkste antikanker mechanisme is van anthracyclines.

Onze bevindingen hebben ertoe geleid dat we de structuur-activiteit relatie van doxorubicine verder hebben onderzocht. Om dit te testen hebben we een tweede set met epimeren van de doxorubicine varianten gemaakt en geëvalueerd (**Hoofdstuk 5**). Hieruit concluderen we dat zowel de amine modificatie als de stereochemie van het 3'-amine essentieel zijn voor de biologische activiteit. De oriëntatie van de 4'-hydroxyl groep heeft weinig effect, terwijl varianten met een gedimethyleerd amine in de equatoriale positie een verbeterde cellulaire opname vertonen en effectievere chromatine schade activiteit hebben, met als gevolg een verbeterde cytotoxiciteit.

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we de evaluatie van een derde set doxorubicine varianten die we hebben gesynthetiseerd om meer inzicht te krijgen in de mechanische interacties met de 3'-amine groep. Naast diMe-Doxo hebben we drie doxorubicine varianten met een niet-basische 3'-amine substitutie en vier doxorubicine varianten met een cyclische 3'-amine substitutie bestudeerd. De drie niet-basische doxorubicine varianten bleken allemaal goed te zijn in het veroorzaken van DNA-breuken zonder dat ze chromatine schade activiteit hebben, terwijl de vier cyclische doxorubicine varianten juist de tegenovergestelde activiteit vertonen. Ondanks dit verschil in werkingsmechanisme hebben deze doxorubicine varianten allen de capaciteit om, net als doxorubicine, Topo IIα te herlokalisieren. Door middel van ChIP-sequencing van endogeen gelabeld Topo IIα hebben we ontdekt dat de anthracycline (varianten) op verschillende locaties in het genoom Topo IIα op het DNA binden. Dit verschil lijkt te worden bepaald door de specifieke structuur (modificatie op amino suiker) en de biologische activiteit. Daarnaast hebben we een vergelijkbare observatie gedaan voor verschillen in de locatie in het genoom waar deze varianten hun chromatine activiteit hebben (door middel van ATAC-sequencing); varianten die naast chromatine schade ook DNA-breuken veroorzaken doen dit op een andere locatie in het genoom dan de doxorubicine varianten die alleen chromatine schade veroorzaken.

Samenvattend, de modificatie op de 3' positie van het suiker is bepalend voor de biologische activiteit en genomische selectiviteit van anthracycline varianten. Het bestuderen van de effectiviteit en toxiciteit in proefdiermodellen van de meest veelbelovende varianten beschreven in **Hoofdstuk 3 – 6** zal in de toekomst hopelijk bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen met verminderde bijwerkingen. Daarnaast laten we zien dat de verschillende varianten selectiviteit hebben voor regio's in het genoom voor zowel Topo IIα remming als chromatine schade. Echter, er is meer kennis nodig over de exacte genoom locatie waar deze varianten werken, en wat de biologische gevolgen hiervan zijn. Uiteindelijk kan dergelijke informatie helpen bij de selectie van specifieke varianten ten opzichte van andere, voor het

verfijnen van de behandeling van bepaalde tumor types.

Spelen DNA-sensoren een rol in het celdood mechanisme ten gevolge van chromatine schade?

Chromatine schade als gevolg van de verwijdering van histonen is het voornaamste mechanisme waarmee anthracyclines tumorcellen doden [22]. Het is echter nog onduidelijk hoe deze chromatine schade precies leidt tot celdood. Onder fysiologische omstandigheden is DNA zeer compact opgevouwen in zogenaamde nucleosomen, zodat onder andere genexpressie gereguleerd kan worden [23]. Lange stukken met eiwitvrij DNA zijn daarom ongebruikelijk in menselijke cellen, en we verwachten dat chromatine schade en ontvouwing van het DNA veroorzaakt door anthracyclines gedetecteerd kan worden door speciale eiwitten in de celkern, die vervolgens de normale situatie kunnen herstellen of celdood initiëren. In **Hoofdstuk 7** beschrijven we drie DNA sensor eiwitten van de PYHIN family (IFI16, IFI16 en MNDA) die tot expressie komen in de celkern, en waarvan bekend is dat ze een rol spelen in de reactie op virale infecties [24-26]. We vinden dat de drie DNA-sensoren zich specifiek kunnen herlokalisieren in de celkern als gevolg van behandeling met anthracyclines die chromatine schade activiteit hebben. Verder vinden we dat binding van IFI16 aan DNA verhoogd is na behandeling met doxorubicine (DNA- en chromatine schade) of aclarubicine (enkel chromatine schade), maar niet met etoposide (enkel DNA-schade). Deze data impliceert dat het eiwitvrije DNA als gevolg van de chromatine schade kan worden herkend en gebonden door de DNA-sensoren. Met behulp van massa spectrometrie analyses hebben we een aantal nieuwe interactiepartners van de drie DNA-sensoren geïdentificeerd, waarvan twee tot het ubiquitinerings systeem behoren (deubiquitinerend enzym USP7 en E3-ligase TRIM26), en een ander is DNA helicase XRCC6. Alle drie deze eiwitten zijn beschreven in de context van virale infecties en celdood [27-29]. Het is echter onbekend of, en hoe, de interactie van deze eiwitten met de DNA-sensoren vervolgens leidt tot celdood als gevolg van chromatine schade. Johnstone en collega's hebben aangetoond dat de DNA-sensor IFI16 een interactie kan aangaan met p53 om vervolgens de celcyclus en apoptose signalering te reguleren [30]. Verder is er beschreven dat deze interactie zorgt voor p53-gemedieerde celcyclus regulatie door transcriptie van p21 in U2Os tumorcellen [31]. Aangezien bekend is dat zowel IFI16 als USP7 een interactie aan kunnen gaan met p53 [30, 32], veronderstellen we dat USP7 naar het histonvrije DNA gerekruteerd kan worden via IFI16, om vervolgens p53 te deubiquitineren en een stress reactie te initiëren. Een andere mogelijkheid zou kunnen zijn dat herkenning van het histonvrije DNA resulteert in activatie van het aangeboren immuunsysteem door het rekruteren van TRIM26. Ondanks dat er niet veel bekend is van de functie van TRIM26, is er beschreven dat TRIM26 kan binden aan TBK1 om deze vervolgens te activeren in de context van RNA-virusinfecties. TBK1 kan dan op zijn beurt IRF3 en NK- κ B activeren en IFN- β expressie induceren [28]. Activatie van het aangeboren immuunsysteem als gevolg van het rekruteren van TRIM26 naar het histonvrije DNA zou wellicht een rol kunnen spelen in de antitumor activiteit van anthracyclines *in vivo*. Echter, meer onderzoek is nodig naar het exacte moleculaire mechanisme waardoor celdood wordt geïnduceerd na herkenning van het histonvrije DNA door de DNA-sensoren, en de rol van de interactie van de sensoren met USP7 en/of TRIM26. Een veelbelovende richting voor verder onderzoek is de rol van p53-gestuurde activatie van het apoptose mechanisme als gevolg van complex formatie van de DNA-sensoren met USP7, TRIM26 of nog onbekende interactiepartners. Het is bekend dat de expressie van eiwitten in de PYHIN family in hematopoëtische

cellen positief gereguleerd wordt door type I en/of type II interferon stimulatie [33]. Wij laten zien dat stimulatie van MelJuSo cellen met IFN β of IFN γ ook zorgt voor een verhoogde expressie van IFI16, en dat IFN β stimulatie deze cellen gevoeliger maakt voor de behandeling met anthracyclines. Wellicht steelt IFI16 een rol in de reactie op DNA-stress in het algemeen, want Fijjuchi en collega's laten zien dat verhoogde expressie van IFI16 in MCF-7 cellen zorgt voor meer celdood door ioniserende bestraling [34].

'Small molecules' geneesmiddelen voor de verbetering van kanker immunotherapie

Terwijl chemotherapie al enkele decennia gebruikt wordt voor de behandeling van kanker, is juist kanker immunotherapie een relatief nieuwe behandelmethode [35, 36]. Kanker immunotherapie behoort tot de zogeheten doelgerichte therapieën, en werk door een systemische CD8⁺ T-cel reactie op te wekken tegen de tumorcellen, welke in het gunstigste geval ook uitzaaiingen aanvalt [37]. Er zijn verschillende immuuntherapie strategieën, maar vooral monoklonale antilichaam therapie gericht tegen CTLA-4, PD-1 of PD-L1 heeft recentelijk gezorgd voor een doorbraak in het veld. Deze zogeheten 'checkpoint blokkade' therapieën vertonen indrukwekkende prestaties, maar zijn slechts succesvol bij een deel van de patiënten [36]. Dit wordt over het algemeen veroorzaakt doordat specifieke cellen of andere remmende mechanisme het effect van de T-cellen op de tumor remmen. Om deze remmende mechanismen tegen te gaan zijn verschillende combinatietherapieën getest, waarbij met name combinatietherapieën met 'small molecules' veelbelovend zijn in het verhogen van de effectiviteit van kanker immunotherapie. Een overzicht van deze nieuwe small molecule combinatietherapieën wordt beschreven in **Hoofdstuk 8**.

Concluderend beschrijft dit proefschrift dat de combinatie van DNA- en chromatine schade de oorzaak is van de hevige bijwerkingen die gepaard gaan met de meeste anthracycline behandelingen, zoals doxorubicine. Verder laten we zien dat niet het maken van DNA-schade, maar juist de chromatine schade via het verwijderen van de histonen het voornaamste antitumor mechanisme is van deze anthracyclines. Door verschillende varianten te synthetiseren en te testen hebben we chemische eigenschappen kunnen identificeren die verantwoordelijk zijn voor de biologische activiteit van deze medicijnen. Daarnaast hebben we nieuwe varianten ontwikkeld met een verbeterde cytotoxiciteit in weefselkweek en in muismodellen. Het exacte moleculaire mechanisme waardoor chromatine schade zorgt voor tumor celdood is nog niet volledig bekend, maar wij veronderstellen dat DNA-sensoren hier een rol in spelen. De data beschreven in dit proefschrift illustreert dat het bestuderen van bestaande antikanker medicijnen met behulp van nieuwe inzichten en technieken nog onbetreden wegen kan openen ter verbetering van de huidige kankertherapieën.

REFERENTIES

1. (2018) Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. www.iarc.fr.
2. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. (2010) *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2.
3. Hortobagyi, G. N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview, *Drugs*. 54, 1-7.
4. Camerino B, P. G. (1960) Derivati della parazina II. Sulfonamodopir (in Italian). ,

Gazz Chim Ital 90: 1802–1815.

5. Di Marco, A., Cassinelli, G. & Arcamone, F. (1981) The discovery of daunorubicin, *Cancer Treat Rep.* 65 Suppl 4, 3-8.

6. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. & Spalla, C. (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*, *Biotechnol Bioeng.* 11, 1101-10.

7. Nitiss, J. L. (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer.* 9, 338-50.

8. Misteli, T. & Soutoglou, E. (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 10, 243-254.

9. Pang, B., Qiao, X., Janssen, L., Velds, A., Groothuis, T., Kerkhoven, R., Nieuwland, M., Ovaa, H., Rottenberg, S., van Tellingen, O., Janssen, J., Huijgens, P., Zwart, W. & Neefjes, J. (2013) Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin, *Nature communications.* 4, 1908.

10. Pang, B., de Jong, J., Qiao, X., Wessels, L. F. & Neefjes, J. (2015) Chemical profiling of the genome with anti-cancer drugs defines target specificities, *Nat Chem Biol.* 11, 472-80.

11. Lotrionte, M., Biondi-Zoccai, G., Abbate, A., Lanzetta, G., D'Ascenzo, F., Malavasi, V., Peruzzi, M., Frati, G. & Palazzoni, G. (2013) Review and meta-analysis of incidence and clinical predictors of anthracycline cardiotoxicity, *Am J Cardiol.* 112, 1980-4.

12. Mistry, A. R., Felix, C. A., Whitmarsh, R. J., Mason, A., Reiter, A., Cassinat, B., Parry, A., Walz, C., Wiemels, J. L., Segal, M. R., Ades, L., Blair, I. A., Osherooff, N., Peniket, A. J., Lafage-Pochitaloff, M., Cross, N. C., Chomienne, C., Solomon, E., Fenaux, P. & Grimwade, D. (2005) DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia, *N Engl J Med.* 352, 1529-38.

13. Chin, L., Meyerson, M., Aldape, K., Bigner, D., Mikkelsen, T., VandenBerg, S., Kahn, A., Penny, R., Ferguson, M. L., Gerhard, D. S., Getz, G., Brennan, C., Taylor, B. S., Winckler, W., Park, P., Ladanyi, M., Hoadley, K. A., Verhaak, R. G. W., Hayes, D. N., Spellman, P. T., Absher, D., Weir, B. A., Ding, L., Wheeler, D., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Mardis, E., Zhang, J. H., Wilson, R. K., Donehower, L., Wheeler, D. A., Purdom, E., Wallis, J., Laird, P. W., Herman, J. G., Schuebel, K. E., Weisenberger, D. J., Baylin, S. B., Schultz, N., Yao, J., Wiedemeyer, R., Weinstein, J., Sander, C., Gibbs, R. A., Gray, J., Kucherlapati, R., Lander, E. S., Myers, R. M., Perou, C. M., McLendon, R., Friedman, A., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogiannis, G. M., Olson, J. J., Lehman, N., Yung, W. K., A. Bogler, O., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., Sabo, A., Nazareth, L., Lewis, L., Hall, O., Zhu, Y., M. Ren, Y., R. Alvi, O., Yao, J. Q., Hawes, A., Jhangiani, S., Fowler, G., San Lucas, A., Kovar, C., Cree, A., Dinh, H., Santibanez, J., Joshi, V., Gonzalez-Garay, M. L., Miller, C. A., Milosavljevic, A., Sougnez, C., Fennell, T., Mahan, S., Wilkinson, J., Ziaugra, L., Onofrio, R., Bloom, T., Nicol, R., Ardlie, K., Baldwin, J., Gabriel, S., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Larson, D. E., Shi, X. Q., Abbott, R., Fulton, L., et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature.* 455, 1061-1068.

14. Kadoch, C., Hargreaves, D. C., Hodges, C., Elias, L., Ho, L., Ranish, J. & Crabtree, G. R. (2013) Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy, *Nature Genetics.* 45, 592-+.

15. Hornick, J. L., Dal Cin, P. & Fletcher, C. D. M. (2009) Loss of INI1 Expression is

Characteristic of Both Conventional and Proximal-type Epithelioid Sarcoma, *American Journal of Surgical Pathology*. 33, 542-550.

16. Gasparini, P., Facchinetti, F., Boeri, M., Lorenzetto, E., Livio, A., Gronchi, A., Ferrari, A., Massimino, M., Spreafico, F., Giangaspero, F., Forni, M., Maestro, R., Alaggio, R., Pilotti, S., Collini, P., Modena, P. & Sozzi, G. (2011) Prognostic determinants in epithelioid sarcoma, *European Journal of Cancer*. 47, 287-295.

17. Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S. & Getz, G. (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types, *Nature*. 505, 495-+.

18. Barbano, R., Muscarella, L. A., Pasculli, B., Valori, V. M., Fontana, A., Coco, M., la Torre, A., Balsamo, T., Poeta, M. L., Marangi, G. F., Maiello, E., Castelveter, M., Pellegrini, F., Murgo, R., Fazio, V. M. & Parrella, P. (2013) Aberrant Keap1 methylation in breast cancer and association with clinicopathological features, *Epigenetics*. 8, 105-112.

19. Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S. Y., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C. J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L. H., Vegesna, R., Shukla, S. A., Ciriello, G., Yung, W. K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D. D., Van Meir, E. G., Prados, M., Sloan, A., Black, K. L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D. W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B. P., Foltz, G., Myers, J., Weisenberger, D. J., Penny, R., Kucherlapati, R., Perou, C. M., Hayes, D. N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G. B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P. W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L. & Network, T. R. (2013) The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma, *Cell*. 155, 462-477.

20. Perego, P., Corna, E., De Cesare, M., Gatti, L., Polizzi, D., Pratesi, G., Supino, R. & Zunino, F. (2001) Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines, *Curr Med Chem*. 8, 31-7.

21. Yang, F., Kemp, C. J. & Henikoff, S. (2013) Doxorubicin Enhances Nucleosome Turnover around Promoters, *Curr Biol*. 23, 782-787.

22. Qiao, X., van der Zanden, S. Y., Wander, D. P. A., Borrás, D. M., Song, J. Y., Li, X., van Duikeren, S., van Gils, N., Rutten, A., van Herwaarden, T., van Tellingen, O., Giacomelli, E., Bellin, M., Orlova, V., Tertoolen, L. G. J., Gerhardt, S., Akkermans, J. J., Bakker, J. M., Zuur, C. L., Pang, B., Smits, A. M., Mummery, C. L., Smit, L., Arens, R., Li, J., Overkleeft, H. S. & Neefjes, J. (2020) Uncoupling DNA damage from chromatin damage to detoxify doxorubicin, *Proc Natl Acad Sci U S A*.

23. McGinty, R. K. & Tan, S. (2015) Nucleosome Structure and Function, *Chem Rev*. 115, 2255-2273.

24. Monroe, K. M., Yang, Z. Y., Johnson, J. R., Geng, X., Doitsh, G., Krogan, N. J. & Greene, W. C. (2014) IFI16 DNA Sensor Is Required for Death of Lymphoid CD4 T Cells Abortively Infected with HIV, *Science*. 343, 428-432.

25. Kerur, N., Veettil, M. V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P. & Chandran, B. (2011) IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection, *Cell Host Microbe*. 9, 363-375.

26. Dell'Oste, V., Gatti, D., Gugliesi, F., De Andrea, M., Bawadekar, M., Lo Cigno, I., Biolatti, M., Vallino, M., Marschall, M., Gariglio, M. & Landolfo, S. (2014) Innate Nuclear Sensor IFI16 Translocates into the Cytoplasm during the Early Stage of In Vitro Human Cytomegalovirus Infection and Is Entrapped in the Egressing Virions during the Late Stage, *J Virol*. 88, 6970-6982.

27. Johnson, K. E., Bottero, V., Flaherty, S., Dutta, S., Singh, V. V. & Chandran, B. (2014) IFI16 Restricts HSV-1 Replication by Accumulating on the HSV-1 Genome, Repressing HSV-1 Gene Expression, and Directly or Indirectly Modulating Histone Modifications, *Plos Pathog.* 10.
28. Ran, Y., Zhang, J., Liu, L. L., Pan, Z. Y., Nie, Y., Zhang, H. Y. & Wang, Y. Y. (2016) Autoubiquitination of TRIM26 links TBK1 to NEMO in RLR-mediated innate antiviral immune response, *J Mol Cell Biol.* 8, 31-43.
29. Frost, J. R., Olanubi, O., Cheng, S. K. H., Soriano, A., Crisostomo, L., Lopez, A. & Pelka, P. (2017) The interaction of adenovirus E1A with the mammalian protein Ku70/XRCC6, *Virology.* 500, 11-21.
30. Johnstone, R. W., Wei, W., Greenway, A. & Trapani, J. A. (2000) Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16, *Oncogene.* 19, 6033-6042.
31. Kwak, J. C., Ongusaha, P. P., Ouchi, T. & Lee, S. W. (2003) IFI16 as a negative regulator in the regulation of p53 and p21(Waf1), *J Biol Chem.* 278, 40899-40904.
32. Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S. L., Wu, T. N., Arrowsmith, C. H. & Frappier, L. (2006) Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP, *Nat Struct Mol Biol.* 13, 285-291.
33. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G. & Lembo, D. (1998) The Ifi 200 genes: An emerging family of IFN-inducible genes, *Biochimie.* 80, 721-728.
34. Fujiuchi, N., Aglipay, J. A., Ohtsuka, T., Maehara, N., Sahin, F., Su, G. H., Lee, S. W. & Ouchi, T. (2004) Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation, *J Biol Chem.* 279, 20339-20344.
35. Sharma, P. & Allison, J. P. (2015) The future of immune checkpoint therapy, *Science.* 348, 56-61.
36. Ribas, A. & Wolchok, J. D. (2018) Cancer immunotherapy using checkpoint blockade, *Science.* 359, 1350-1355.
37. Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J. & Schreiber, R. D. (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state, *Nature.* 450, 903-7.

