

Aus dem Molekularen Krebsforschungszentrum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zelluläre Seneszenz induziert durch neue zielgerichtete
Therapien

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Schömig
aus Würzburg

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	9
1 Zusammenfassung/Abstract.....	11
2 Einleitung.....	14
2.1 Therapie-induzierte zelluläre Seneszenz.....	14
2.2 Senolytische und senomorphische Therapieansätze.....	20
2.3 Zielgerichtete Medikamente als antineoplastische Therapie.....	21
2.4 Zelluläre Seneszenz durch zielgerichtete Therapien.....	30
3 Methodik.....	32
3.1 Eingesetzte Materialien und Lösungen.....	32
3.2 Geräte und Software.....	35
3.3 Kultivierung humaner Zelllinien.....	36
3.4 Wachstums- und Viabilitätskurven.....	37
3.5 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase.....	38
3.6 Isolation zellulärer RNA.....	39
3.7 cDNA-Synthese.....	39
3.8 Quantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR)	40
3.9 Statistische Datenanalyse.....	41
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Die Behandlung mit dem Anthracyclin Adriamycin löst zelluläre Seneszenz in humanen Lymphom- und Leukämie-Zelllinien aus.....	43
4.2 Klinisch eingesetzte zielgerichtete Therapien lösen zelluläre Seneszenz in humanen Lymphom- und Leukämie-Zelllinien aus.....	45
4.3 Erhöhte Expression von SASP- und Stemness-Genen nach Adriamycin-Behandlung.....	70
4.4 Gering erhöhte Expression von SASP-Genen nach Seneszenz- auslösung durch zielgerichtete Therapien.....	70
4.5 Seneszenzauslösung durch zielgerichtete Therapien führt zum Anstieg der Expression von Stemness-Genen.....	71
5 Diskussion.....	79
6 Literaturverzeichnis.....	87
7 Eidesstattliche Versicherung.....	101

9	Lebenslauf.....	102
8	Danksagung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene-homolog
ADR	Adriamycin, Doxorubicin
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of variance
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL-2-associated death promotor
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BCL-w	B-cell lymphoma w
BCL-xL	B-cell lymphoma extra-large
BCR	Breakpunkt-Cluster Region / Breakpoint-cluster region
BCR	B-cell-receptor
BFL-1	BCL-2-related gene expressed in fetal liver
BID	BH3-interacting domain
BIK	BCL-2-interacting killer
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BMF	BCL-2-modifying factor
BOK	BCL-2 homologous antagonist killer
BR	Bendamustin plus Rituximab
BrdU	5-Bromodeoxyuridin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
C ₁₂ FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CCL	Chemokin-Ligand (C-C-Motif)

CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CXCL	Chemokin-Ligand (C-X-C-Motif)
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E2F	E2 transcription factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alia (und andere)
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Forward scatter (Vorwärtsstreuung am Durchflusszytometer)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor / Fibroblast growth factor
FOXM1	Forkhead box M1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTPase	Guanosintriphosphatase
H3K9me	Histon H3 mit Trimethylierung von Lysin 9
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene-homolog
HRK	Harakiri
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül / Intracellular adhesion molecule
IFN- α	Interferon- α
IGFBP3	Insulin-like growth-factor-binding protein 3
I κ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
ITK	Interleukin-2-inducible T-cell kinase

JAK2	Janus-Kinase 2
KGF	Keratinozyten-Wachstumsfaktor / Keratinocyte growth factor
Klf4	Kruppel-like factor 4
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia-1
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MIF	Makrophage migration inhibitory factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nM	Nanomolar
NOXA	Phorbol-12 myristate-13-acetate-induced protein 1
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIGF	Phosphatidylinositolglykan-Biosynthese-Klasse-F-Protein
PIP-2	Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat
PIP-3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat
PM	Photomultiplier Tube
PML	Promyelocytic leukaemia
PROM1	Prominin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom-Protein

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RQ-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatinfokusse
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SGP130	Soluble glycoprotein 130
SCF	Stem cell factor
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SLAMF1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
Sox2	(Sex determining region Y)-box 2
Src	Sarcoma tyrosine kinase
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreuung am Durchflusszytometer)
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
sTNFRI	Soluble tumor necrosis factor receptor I
Tab.	Tabelle
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
uPA	Urokinase
uPAR	Urokinase receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VR	Venetoclax plus Rituximab
vs.	Versus
Wnt	Wingless-related integration site
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Verschiedene Stimuli und Stressoren lösen Seneszenz in zuvor mitotisch aktiven Zellen aus und führen so zu typischen Seneszenz-assoziierten Veränderungen in der Zelle.....	15
Tabelle 1. Im Rahmen des Seneszenz-assoziierten Phänotyps (SASP) hochregulierte Faktoren.....	18-19
Abbildung 2. Zielgerichtete Therapien greifen an verschiedenen Punkten in das zelluläre Signaltransduktionsnetzwerk, welches bei Störungen zur malignen Entartung der Zelle führen kann, ein.....	22
Tabelle 2. Untersuchte Zelllinien, deren jeweilige Tumorentität und genetische Charakteristika.....	30
Tabelle 3. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse untersuchte SASP- bzw. Stemness-Gene.....	31
Tabelle 4. Eingesetzte Inhibitoren mit Angabe der jeweils verwendeten Konzentrationen in Anlehnung an die angestrebten Plasmakonzentrationen sowie des verwendeten Lösungsmittels.....	36-37
Abbildung 3. Histochemische SA- β -Gal-Färbung nach Adriamycin-Behandlung der Zelllinien K562, RC-K8, SD-1 und Mec1 nach sechs Tagen.....	44
Tabelle 5. Eingesetzte Inhibitoren, deren Zielstruktur und das zugrunde liegende Wirkprinzip sowie das Vorkommen der Zielstrukturen in den eingesetzten Zelllinien.....	45-46
Abbildung 4. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenter Zellen nach Behandlung der Zelllinie K562 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren... ..	48-52
Abbildung 5. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenter Zellen nach Behandlung der Zelllinie RC-K8 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren.....	42-57
Abbildung 6. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenter Zellen nach Behandlung der Zelllinie SD-1 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren.....	58-62
Abbildung 7. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenter Zellen nach Behandlung der Zelllinie Mec1 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren.....	63-67

Abbildung 8. Fluoreszenz-basierte SA- β -Gal-Färbung der Zelllinien K562, RC-K8, SD-1 und Mec1 nach sechs Tagen.....68-70

Abbildung 9. Genexpressionsanalysen der Zelllinien K562, RC-K8 und SD-1 nach Behandlung mit verschiedenen Seneszenz-auslösenden Inhibitoren oder Adriamycin.....72-78

Zusammenfassung

Einleitung: In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Therapie-induzierte zelluläre Seneszenz in der Behandlung maligner Erkrankungen eine zweischneidige Rolle einnimmt. Einerseits kommt es durch die Seneszenzauslösung zum Zellzyklusarrest und damit Proliferationsstopp maligne entarteter Zellen. Andererseits fördern persistierende seneszente Zellen über einen spezifischen sekretorischen Phänotyp und über die Akquirierung von Stammzellfunktionen (Stemness), verbunden mit der nicht völlig „terminalen“ Stabilität des Arrestzustandes bei Verlust Seneszenz-essentieller Genexpression, Tumor-Reinitiierungspotential und somit möglicherweise Metastasierung sowie Tumorprogression und Rezidiventwicklung. Trotz dieser weitreichenden biologischen Folgen zellulärer Seneszenz ist kaum untersucht, ob neue zielgerichtete Therapien, die in der personalisierten Krebstherapie bereits vielfach eingesetzt werden, Seneszenz auslösen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Seneszenzauslösung durch diese neuen Medikamente zu untersuchen und mittels Genexpressionsanalysen festzustellen, welche biologischen Folgen eine solche zelluläre Seneszenz hat.

Methodik: Vier Zelllinien maligner hämatologischer Erkrankungen (K562, Mec1, RC-K8 und SD-1) wurden mit neun verschiedenen zielgerichteten Inhibitoren (ABT-199, Bortezomib, Gefitinib, Ibrutinib, Idelalisib, Imatinib, Palbociclib, Tipifarnib und Vemurafenib) oder mit dem konventionellen Chemotherapeutikum Adriamycin behandelt und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens sowie ihrer Viabilität untersucht. Am sechsten Tag nach Behandlung erfolgten die histochemische und fluoreszenzbasierte Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase. Weiterhin wurde mittels RQ-PCR die Expression von Genen des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) und von Stammzell-Signaling-relevanten Genen quantifiziert.

Ergebnisse: Die Behandlungen mit verschiedenen Inhibitoren führten in den Zelllinien K562, RC-K8 und SD-1 jeweils zu statistisch signifikanten Anstiegen des Anteils seneszenten Zellen, wobei Inhibitoren, die über eine Interferenz mit zellulären Kontrollmechanismen wirken, am effektivsten waren. Zusätzlich konnte auch nach der Behandlung mit Seneszenz-auslösenden Inhibitoren ein Anstieg der Expression von Genen, die für Komponenten des SASP kodieren, und von Stemness-Genen gezeigt werden, welcher jedoch meist geringer war als nach Behandlung mit Adriamycin.

Diskussion: Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch die Behandlung mit neuen zielgerichteten, klinisch bereits eingesetzten Inhibitoren zur Auslösung zellulärer Seneszenz in verschiedenen Zelllinien führt. Da es auch hierbei zu einer gesteigerten Expression von SASP- und Stemness-Genen kam, ist zu erwarten, dass auch diese Form der Seneszenz weitreichende biologische Folgen im Rahmen der Tumorbehandlung hat. Sowohl die Ausschüttung von SASP-Faktoren als auch die Entwicklung von Stemness-Funktionen sind potentiell Tumor-promovierend. Gleichzeitig stellen diese seneszenten Zellen aufgrund der zuletzt entwickelten senolytischen und senomorphischen Therapieansätze ein neues Ziel in der Behandlung maligner Erkrankungen dar.

Abstract

Introduction: In the past few years it has been shown that therapy-induced senescence acts as a double-edged sword in the treatment of malignancies. On the one hand, senescence leads to a cell cycle arrest and thus a proliferative halt of malignant cells. On the other hand, due to the secretion of specific senescence-associated factors (senescence-associated secretory phenotype, SASP) and due to the acquisition of stemcell functions (stemness), combined with a loss of essential senescence gene expression and therefore a not entirely terminal stability of the cellular arrest, persistent senescence cells promote tumor reinitiation potential and thereby dissemination as well as tumor progression and relapse. Despite this crucial biological impact of cellular senescence, the ability of novel targeted therapies, which are already applied in the clinic, to induce senescence have hardly been studied. Therefore, it was this project's aim to investigate whether these targeted therapies induce cellular senescence and to study the biological impact of this therapy-induced senescence.

Methods: Four cell lines of hematological malignancies (K562, Mec1, RC-K8 and SD-1) were treated with nine different targeted inhibitors (ABT-199, Bortezomib, Gefitinib, Ibrutinib, Idelalisib, Imatinib, Palbociclib, Tipifarnib und Vemurafenib) or with the conventional chemotherapeutic Adriamycin and then studied regarding their growth behavior and viability. On day six after treatment, histochemical and fluorescence-based stainings of the senescence-associated β -galactosidase were performed. Additionally, the expression of SASP-genes and genes relevant for stemcell signaling was quantified via RQ-PCR.

Results: Treatment with different inhibitors led to a statistically significant increase of the fraction of senescent cells in K562, RC-K8 and SD-1 cell lines. Inhibitors, which intervene with cellular control mechanisms, were most effective. Furthermore, after treatment with senescence-inducing inhibitors an increase of the expression of SASP- and stemness-genes was shown, which however was also smaller than after Adriamycin treatment.

Discussion: These results show that treatment with novel targeted, clinically already established therapies leads to cellular senescence in different cell lines. Since this senescence also led to an increased expression of SASP- and stemness-genes, it is to be expected that this form of senescence also has major consequences regarding the treatment of malignant diseases. The secretion of SASP-factors as well as the acquisition of stemness functions are potentially tumor-promoting. At the same time, due to the development of new senolytic and senomorphic therapeutic approaches, these senescent cells themselves pose a novel target in the treatment of malignant diseases.

2 Einleitung

2.1 Therapie-induzierte zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz beschreibt eine komplexe zelluläre Stressantwort, die mit einem terminalen Zellzyklusarrest der zuvor teilungsfähigen Zellen einhergeht und durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden kann. Dabei kommt es zu Veränderungen auf der transkriptionellen Ebene der Zellen, was wiederum zur Aktivierung tumorsuppressiver Signaltransduktionswege sowie zur Sekretion verschiedener vorwiegend proinflammatorischer Faktoren führt.¹ Seneszenz spielt nicht nur während der embryonalen Entwicklung und beim Altern eine entscheidende physiologische Rolle, wurde als eine wesentliche pathogenetische Komponente typischer altersabhängiger Erkrankungen (wie beispielsweise Diabetes mellitus, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung oder Leberfibrosierung) sowie als essentieller Bestandteil der Wundheilung nach Gewebeschädigung identifiziert, sondern kann auch im Rahmen maligner Entartung oder durch exogene Stressoren ausgelöst werden und dient dabei primär der Verhinderung der Proliferation geschädigter Zellen. Neben der Apoptose stellt Seneszenz so einen wichtigen Mechanismus zum Ausschluss geschädigter Zellen von weiterer Propagierung dar.² Zu den Seneszenz-auslösenden Stressoren zählen unter anderem DNA-Schädigung, Bestrahlung, Chemotherapie sowie die Aktivierung von Onkogenen (s. Abb. 1).³

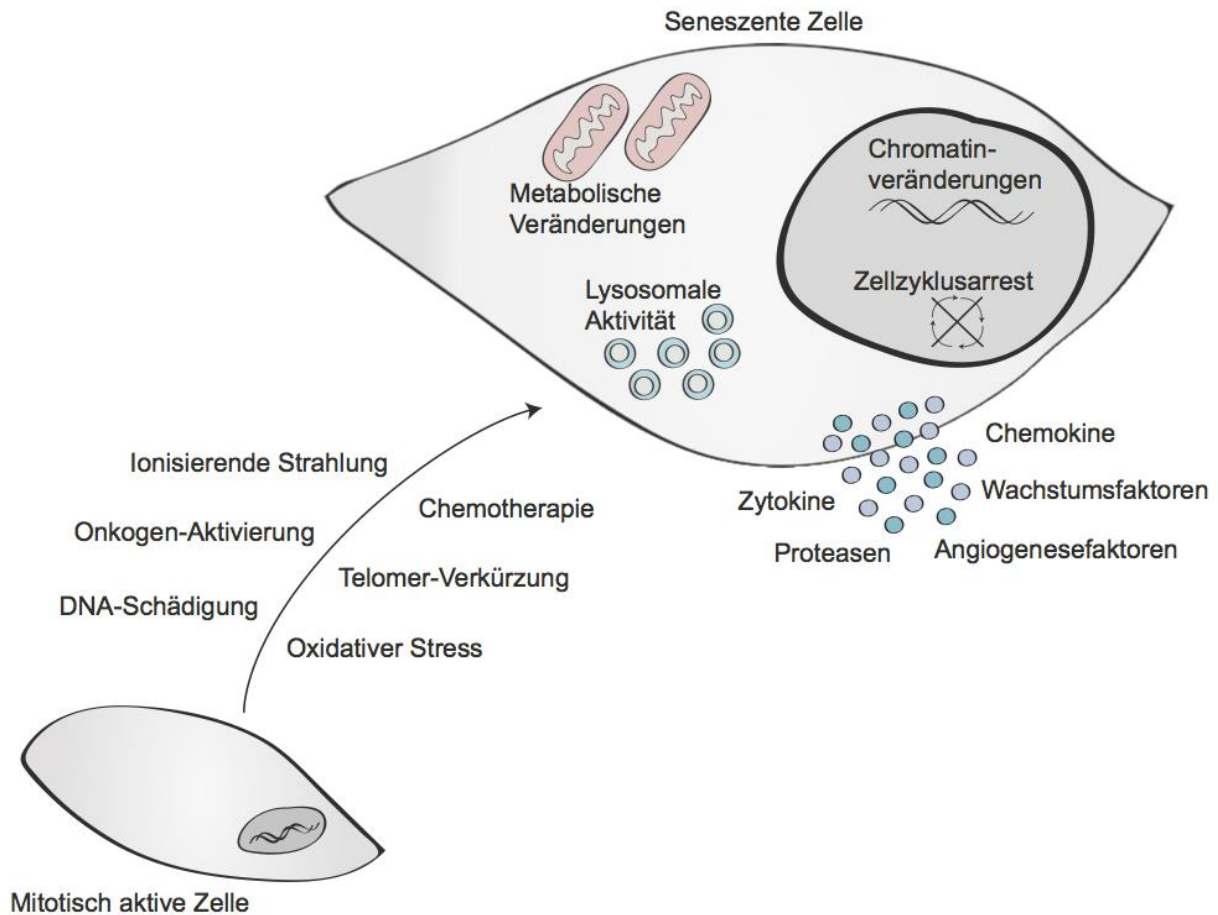


Abbildung 1. Verschiedene Stimuli und Stressoren lösen Seneszenz in zuvor mitotisch aktiven Zellen aus und führen so zu typischen Seneszenz-assoziierten Veränderungen in der Zelle.

1961 wurde zelluläre Seneszenz zuerst nach kontinuierlicher Kultivierung humaner Fibroblasten durch Leonard Hayflick und Paul Moorhead als „replikative Seneszenz“ beschrieben. Diese Form des terminalen Zellzyklus-Arrests wird durch die bei jeder Zellteilung progressive Verkürzung der Telomere und eine damit verbundene zelluläre Antwort auf die DNA-Schädigung („DNA Damage Response“) nach circa 40-60 mitotischen Teilungen ausgelöst und auch „Hayflick-Limit“ genannt.⁴

In den darauffolgenden Jahren wurden neben der replikativen Seneszenz weitere Formen der Seneszenz beschrieben, unter anderem die Therapie-induzierte und die Onkogen-induzierte Seneszenz. So kann es beispielsweise nach zytostatischer Behandlung durch Schädigung der zellulären DNA oder nach Aktivierung zellulärer Onkogene ebenfalls zum terminalen Wachstumsarrest der Zellen kommen. Zu diesem Wachstumsarrest können verschiedene Signaltransduktionskaskaden führen; die

Seneszenz-auslösenden Mechanismen variieren jedoch je nach Zelltyp und auslösendem Stressor. Meist wird der Zellzyklus-Blocker p21^{CIP1} aktiviert, welcher wiederum die vermehrte Expression des CDK4/6-Inhibitors p16^{INK4a} induziert. Dies führt zu einem Arrest der zellulären Proliferation in der G1-Phase des Zellzyklus.⁵⁻⁷ Weiterhin werden im Rahmen der Seneszenz die p53- und Retinoblastom (Rb)-Signalkaskaden aktiviert und promyelocytic leukaemia (PML)-Körper geformt, was über Chromatin-Remodelling zur Etablierung sogenannter Seneszenz-assoziiierter Heterochromatinfokusse (SAHF) führt. Zu diesen Chromatinmodifikationen zählt die transkriptionell repressive Trimethylierung von Lysin 9 des Histons H3 (H3K9me3), was zu einer verminderten Expression E2 Transkriptionsfaktor (E2F)-abhängiger Gene, die den zellulären Progress in die S-Phase treiben, führt und seneszente Zellen unempfindlich für mitogene E2F-Signale macht.^{6,8,9}

Seneszente Zellen weisen daher diverse morphologische, metabolische und funktionelle Veränderungen und Marker auf, wodurch sie von anderen sich nicht teilenden Zellen wie beispielsweise in der G0-Phase ruhenden Zellen (zelluläre *quiescence*), die sich in einem reversiblen Zellzyklusarrest befinden, oder terminal differenzierten Zellen unterschieden werden können. So werden seneszente Zellen im Vergleich zu mitotisch aktiven Zellen größer und flacher, haben ein vergrößertes lysosomales Kompartiment und weisen eine erhöhte Granularität auf. Ein spezifischer Marker zur Detektion seneszenten Zellen ist zwar bis heute nicht bekannt, jedoch kann die Kombination verschiedener Seneszenz-assoziiierter Eigenschaften zur Identifizierung seneszenten Zellen beitragen. Hierbei hat sich insbesondere die zytochemische bzw. auch histochemische oder fluoreszenzbasierte Färbung der lysosomalen Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase, deren Aktivität in seneszenten Zellen auf einer Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments beruht, als Standard in unfixiertem Frischmaterial etabliert.¹⁰ So lassen sich seneszente Zellen vor allem von solchen Zellen unterscheiden, die aufgrund von Kontaktinhibition wachstumsarretiert sind. Weiterhin sind seneszente Zellen durch die Abwesenheit proliferativer Marker wie Ki67 oder 5-Bromodeoxyuridin (BrdU) sowie durch eine Hochregulation verschiedener Mediatoren wie p53, p16, p21, p27 und hypophosphoryliertes Rb gekennzeichnet. Wie oben beschrieben kommt es in seneszenten Zellen außerdem zu Chromatin-Modifikationen, wie beispielsweise die Trimethylierung von Lysin 9 des Histons H3 (H3K9me3).²

Obwohl sich seneszente Zellen in einem permanenten Arrest des Zellzyklus befinden, nehmen sie weiterhin eine wichtige biologische Rolle ein, indem sie metabolisch aktiv

bleiben.¹¹ Es ist bekannt, dass seneszente Zellen einen sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) aufweisen, welcher mit der Sekretion verschiedener immunmodulatorischer Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, extrazellulärer Matrixproteine und Proteasen einhergeht (s. Tab. 1).³ Die Zusammensetzung der sezernierten Faktoren ist hierbei abhängig von dem Seneszenz-auslösenden Stimulus, dem Zelltyp sowie der Dauer der Seneszenz, sodass es keine universale Form des SASP gibt. Auch die Mechanismen, die zur Entwicklung und Progression des SASP führen, unterscheiden sich je nach Zelltyp. Verschiedene Signaltransduktionswege wie p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38MAPK), *cyclic GMP-AMP-Synthase-stimulator of interferon genes* (cGAS-STING), *transforming growth factor-β* (TGF-β), *Januskinase-signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT) und Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase B/AKT-*mechanistic target of Rapamycin* (PI3K-AKT-mTOR) sowie die Transkriptionsfaktoren *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB) und *CCAAT-enhancer-binding proteins-β* (C/EBP-β) regulieren die Transkription verschiedener SASP-Faktoren.¹² Die Faktoren können Phagozytose-fähige Immunzellen aktivieren und in die Tumorumgebung locken, was einerseits zur Beseitigung der seneszenten Zellen und zur Gewebeumstrukturierung beitragen kann. Andererseits kann dies auch zu einer persistierenden lokalen Inflammation sowie zur Anlockung von unreifen myeloiden Progenitorzellen führen. Außerdem können über die parakrine Wirkung der durch seneszente Zellen sezernierten Faktoren Seneszenz in sogenannten *Bystander*-Zellen ausgelöst werden oder durch autokrine Wirkung der seneszenten Phänotyp in der seneszenten Zelle verstärkt werden.¹³ Über die Ausschüttung der SASP-Faktoren können seneszente Zellen weiterhin ihre direkte Gewebeumgebung (*microenvironment*, Mikromilieu), welche aus verschiedenen nicht-tumorösen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen oder einwandernden Lymphozyten besteht, so verändern, dass durch das Mikromilieu Tumorentstehung, –wachstum und –metastasierung nicht mehr unterdrückt, sondern gefördert werden.¹² In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Kokultur seneszenten Fibroblasten mit verschiedenen Tumorzellen die Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen fördert.^{14,15} Wichtig ist jedoch, dass der SASP insbesondere im Rahmen kurzzeitiger Seneszenz eine physiologische Rolle unter anderem in der Heilung bzw. Reparatur von Geweben sowie in der embryonalen Entwicklung spielt und die Anlockung von Immunzellen in die Tumorumgebung auch zur Beseitigung von Tumorzellen führen kann.² Gleichzeitig wird dem SASP im Rahmen von persistierender Seneszenz aufgrund

der durch ihn ausgelösten chronischen Inflammation zunehmend auch eine Rolle sowohl in der Entstehung von altersabhängigen Erkrankungen und damit auch von Tumoren als auch in der Induktion von Therapieresistenzen zugeschrieben.²

Aufgrund dieser gegensätzlichen Effekte des SASP ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen nötig, um das spezifische *targeting* des SASP therapeutisch in der Tumorbehandlung nutzen zu können. So soll durch Unterdrückung des SASP eine chronische Inflammation verhindert werden und die Gewebefunktion erhalten bleiben. Hierfür wurden bereits verschiedene sogenannte senomorphische Agenzien entwickelt, die unter anderem durch Inhibition von NF-κB, mTOR oder des JAK-Signaltransduktionswegs die Entwicklung eines SASP unterdrücken. Insbesondere soll so auch die auf einer SASP-getriebenen Veränderung des Tumormikromilieus beruhende Therapieresistenz verhindert werden.¹²

Interleukine IL-1a, -1b IL-6 IL-7 IL-8 IL-13 IL-15	Chemokine CCL-2, -3, -8, -13, -16, -20 CXCL-1, -2 Eotaxin-3
Wachstumsfaktoren bFGF EGF HFG KGF VEGF Angiogenin SCF PIGF IGFBP	Lösliche Rezeptoren oder Liganden ICAM-1, -3 Osteoprotegerin sTNFR1 Decoy-Rezeptor 1 Fas uPAR SGP130 EGFR
Proteasen MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14 TIMP-2 PAI-1, -2, tPA, uPA	Andere SASP-Faktoren GM-CSF MIF Biglykan

Proteasen	Andere SASP-Faktoren
Cathepsin B	Decorin

Tabelle 1. Im Rahmen des Seneszenz-assoziierten Phänotyps (SASP) hochregulierte Faktoren.

Neben der Anschaltung eines SASP können seneszente Zellen auch selbst-erneuernde Eigenschaften, die zusammenfassend als Stemness beschrieben werden, im Zuge komplexer epigenetischer Reprogrammierung entwickeln.¹⁶ Demnach können zunächst seneszente Zellen aufgrund sich überschneidender Signalwege, die sowohl in der Entstehung von Seneszenz als auch von Stammzellfunktionen eine wichtige Rolle spielen, sowie durch die Überwindung des G1-Zellzyklusarrests wieder in den Zellzyklus eintreten.¹⁷ Hierzu zählen unter anderem Seneszenz-assoziierte Proteine wie p53, p16, p21, phosphoryliertes Rb und einige Transkriptionsfaktoren.^{18–20} Demnach exprimieren seneszente Zellen sowohl im Rahmen replikativer als auch im Rahmen Therapie- oder Onkogen-induzierter Seneszenz adulte Stammzellfaktoren und weisen eine gewisse Plastizität auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass seneszente Zellen über eine Induktion der sogenannten Yamanaka Faktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und Myc) und den SASP in Nachbarzellen eine Reprogrammierung initiieren können.²¹ Als ein wichtiger zugrunde liegender Treiber dieser Seneszenz-assoziierten Stemness wurde der *wingless-related-integration-site*-(Wnt-)Signaltransduktionsweg identifiziert.²³ Im nicht-tumorösen Kontext dient die Eigenschaft der Selbsterneuerung seneszenten Zellen insbesondere dem Wiederaufbau funktionellen Gewebes nach Ausschaltung Seneszenz-induzierender Stressoren, um den Gewebeverlust zu minimieren.²⁴ Im Rahmen von Tumorbiologie können diese selbst-erneuernden Eigenschaften post-seneszenten Zellen allerdings zur Förderung der Rezidiventwicklung mit aggressivem Proliferationsverhalten führen. So konnte gezeigt werden, dass ehemals seneszente Zellen, die wieder in den Zellzyklus eingetreten waren, ein deutlich höheres Potential zur Tumorentstehung aufwiesen.²²

Insgesamt wird seneszenten Zellen daher eine ambivalente Rolle in Tumorentstehung und –wachstum zugeschrieben. Zelluläre Seneszenz kann einerseits zu physiologischem Gewebeumbau führen und durch die Eliminierung seneszenten Zellen durch das Immunsystem kann dem unkontrollierten Wachstum von geschädigten Zellen vorgebeugt werden. Andererseits kann die Akkumulation seneszenten Zellen zu einer chronischen Inflammation führen und so zu Entstehung oder Progress verschiedener

altersassoziierter Erkrankungen wie Arthrose, chronischer Lungenerkrankungen, der koronaren Herzerkrankung und maligner Erkrankungen führen.^{24–26} Daher bestehen sowohl pro-seneszente als auch anti-seneszente Therapieansätze, um diesen Erkrankungen vorzubeugen bzw. sie zu behandeln. Dabei können pro-seneszente Therapien tumorsuppressiv wirken, indem die Entstehung und die vermehrte Proliferation aberranter Zellen gestoppt wird, während anti-seneszente Therapien eine chronische Inflammation durch Beseitigung seneszenten Zellen verhindern können.

2.2 Senolytische und senomorphische Therapieansätze

Insbesondere aufgrund der langfristig schädigenden Wirkungen seneszenten Zellen sind in den letzten Jahren die sogenannten senolytischen und senomorphischen Therapien in den Fokus gerückt, wobei *Senolytics* spezifisch seneszente Zellen eliminieren und *Senomorphics* Seneszenzmarker oder sekretorische Faktoren seneszenten Zellen unterdrücken, ohne seneszente Zellen direkt anzugreifen.^{27,28} Da in seneszenten Zellen verschiedene anti-apoptotische Signaltransduktionswege hochreguliert sind, zeigen sich seneszente Zellen als Apoptose-resistent. Werden nun diese anti-apoptotischen Proteine gezielt angegriffen, können selektiv seneszente Zellen eliminiert werden. Die ersten so entwickelten senolytischen Medikamente waren der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib und das Flavonol Quercetin. In den letzten Jahren wurden jedoch nach Identifizierung weiterer anti-apoptotischer Proteine in seneszenten Zellen noch weitere senolytisch wirkende Medikamente identifiziert.^{29,15} Der bisher vielversprechendste Ansatz ist hierbei die Inhibition der *B-cell lymphoma-2*-(BCL-2-)Familie, wobei insbesondere Navitoclax als Inhibitor von BCL-2, *B-cell lymphoma extra-large* (BCL-xL) und *B-cell lymphoma w* (BCL-w) senolytische Effekte zeigt.^{30,31} Senomorphische Therapien inhibieren dagegen die parakrinen Signale seneszenten Zellen, die vor allem im Rahmen des SASP entstehen. Hier konnte vor allem NF-κB-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren, Metformin aber auch diätetischer Restriktion eine Wirksamkeit nachgewiesen werden.^{32–35}

Da eine Vielzahl verschiedener Pathologien mit der Persistenz seneszenten Zellen einhergeht, konnte durch das gezielte *targeting* dieser seneszenten Zellen ein therapeutischer Effekt beispielsweise in Mausmodellen von Lungenfibrose, Arteriosklerose oder auch Arthrose beschrieben werden. Auch kann die senolytische Therapie in Mausmodellen den Beginn altersabhängiger Erkrankungen verzögern und

damit die Lebensdauer der Mäuse verlängern.³⁶ Im Rahmen der Tumorthherapie besteht außerdem die Möglichkeit, zunächst Seneszenz mittels Seneszenz-auslösender Mechanismen wie DNA-schädigender Chemotherapie oder Bestrahlung zu fördern und darauf folgend senolytische Therapien zur Beseitigung der seneszenten Zellen zu nutzen.

2.3 Zielgerichtete Medikamente als antineoplastische Therapie

In den letzten Jahren hat sich die Entwicklung neuer antineoplastischer Therapien stark gewandelt. Anstelle von breit zytostatisch wirkenden Chemotherapeutika gerieten Medikamente, die an spezifischen molekularen zellulären Zielstrukturen wirken, in den Fokus. Anstatt eine unspezifische zelluläre Reaktion hervorzurufen, ist das Ziel dieser Medikamente die Inhibition gestörter Signaltransduktionswege in Tumorzellen, um so die Proliferation dieser aberranten Zellen zu verhindern (s. Abb. 2). Da diese molekularen Zielstrukturen in normalen Zellen entweder nicht vorhanden oder nicht verändert sind, soll das *targeting* dieser Proteine zu einer selektiven Tötung der aberranten Zellen führen. Damit soll nicht nur die Tumorprogression verhindert, sondern auch die Nebenwirkungen klassischer Chemotherapie minimiert werden.

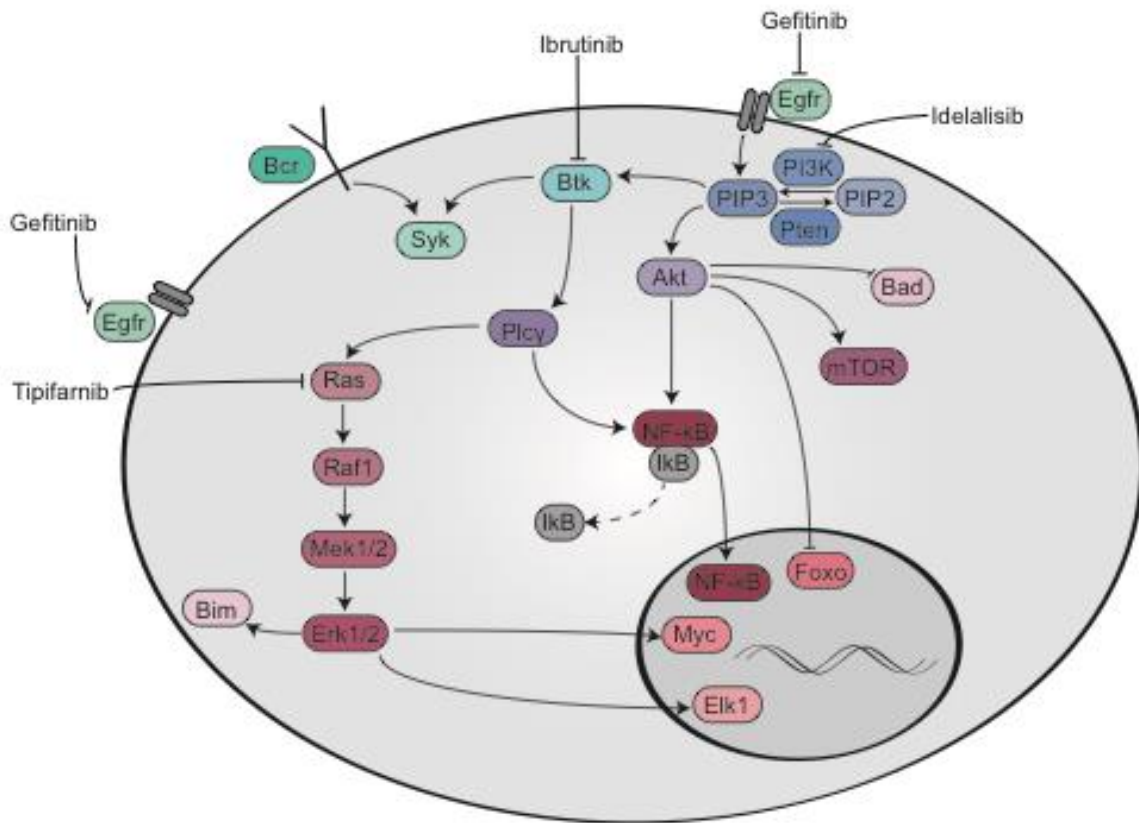


Abbildung 2. Zielgerichtete Therapien greifen an verschiedenen Punkten in das zelluläre Signaltransduktionsnetzwerk, welches bei Störungen zur malignen Entartung der Zelle führen kann, ein.

Da sich die medikamentöse Steigerung beispielsweise von Tumorsuppressorproteinen oder von Proteinen zur Reparatur von DNA-Schäden schwierig darstellt, spielt inzwischen vor allem die Inhibition hyperaktiver Onkogene oder nachgeschalteter Proteine eine wichtige Rolle. Hyperaktive Onkogene treiben die unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen durch die Hochregulation verschiedener Signaltransduktionswege. Insbesondere Tyrosinkinase sowie ihnen nachgeschaltete Proteine vermitteln Proliferations-assoziierte Signale an den Zellkern und beeinflussen dort die Genexpression. Die hochregulierte Proliferation von Tumorzellen beruht dabei auf einem Überschuss an Wachstumsfaktoren in der Tumorumgebung, einer Hochregulation von membranständigen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder auf einer konstanten Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege. Um durch zielgerichtete Therapien angreifbar zu sein, müssen diese Zielmoleküle katalytische Domänen aufweisen, welche spezifische Interaktionen mit den eingesetzten Therapeutika zulassen. Die hierbei gewünschte hohe Bindungsselektivität lässt sich

aufgrund von Ähnlichkeiten in der Struktur insbesondere von Tyrosinkinase nicht immer erreichen, was über *off-target* Effekte zum einen zu Nebenwirkungen aufgrund der Beeinträchtigung nicht-tumoröser Zellen führt und zum anderen die mögliche Applikation in initial nicht untersuchten Tumorentitäten erlaubt.³⁷

Der erste klinisch eingesetzte Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Imatinib Mesylat wurde 2001 für die Behandlung von resistenten chronischen myeloischen Leukämien (CML) sowie 2003 für die Behandlung neu diagnostizierter CML zugelassen. Die Entwicklung der CML basiert auf einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 – t(9;22)(q34;q11) – in einer hämatopoetischen Stammzelle, wodurch das Breakpoint cluster region/*Abelson murine leukemia viral oncogene-homolog* (BCR/ABL)-Fusionsgen entsteht. Das durch diese Translokation gekürzte Chromosom 22 wird auch Philadelphia-Chromosom genannt und kann in über 90% aller CML-Patienten nachgewiesen werden.³⁸ Das *BCR/ABL*-Fusionsgen führt zur Transkription des zytoplasmatischen Proteins p210^{BCR/ABL}, welches über eine konstitutiv aktive Tyrosinkinaseaktivität die maligne Transformation der Leukämiezellen treibt.³⁹ Die erhöhte Tyrosinkinaseaktivität führt wiederum über die Phosphorylierung verschiedener Substrate zur Aktivierung der *Rat sarcoma/Mitogen-activated protein kinase* (RAS/MAPK)-, JAK2/STAT-, *Sarcoma tyrosine kinase* (Src)- und PI3K-Signaltransduktionswege, was wiederum zu einer erhöhten Zellproliferation und –differenzierung sowie zu verminderter Apoptose und Adhäsion der CML-Progenitorzellen im Knochenmark führt.⁴⁰ Somit ist die CML durch ein einziges fehlreguliertes Protein getrieben, welches aufgrund seiner erhöhten Aktivität sowie aufgrund seines spezifischen Vorkommens ausschließlich in Leukämiezellen ein ideales Ziel medikamentöser Therapie darstellt. So wurde 1998 mit Imatinib der erste TKI in klinischen Studien eingesetzt. Durch kompetitive Bindung an der ATP-Bindungsstelle des BCR/ABL-Proteins verhindert Imatinib die Aktivierung der Kinase und damit die ungehemmte Proliferation leukämischer Zellen.⁴¹ Insbesondere verglichen mit dem damals als Standardtherapie der CML geltenden Interferon- α führte Imatinib zu weit geringeren unerwünschten Wirkungen bei gleichzeitiger Normalisierung des Blutbildes sowie Verschwinden des Philadelphia-Chromosoms. 2002 erfolgte in den Vereinigten Staaten daher die Zulassung von Imatinib als First-Line-Therapie aller CML-Patienten. Da unter laufender Imatinib-Therapie Resistenzen beschrieben wurden, die unter anderem auf Mutationen der Kinase oder auf der Überaktivierung kompensatorischer Signaltransduktionswege beruhen, wurden Zweit- und Drittgenerations-TKI entwickelt, zu denen Dasatinib, Nilotinib und Ponatinib zählen. So hat inzwischen ein Großteil der CML-

Patienten unter dauerhafter TKI-Therapie eine mit Gesunden vergleichbare Lebenserwartung und einige Patienten können die TKI-Therapie sogar abbrechen und sind so möglicherweise geheilt. Das BCR/ABL-Protein ist somit das erste erfolgreich gezielt therapierte Onkogen.^{38,42}

Noch während der erfolgreichen Entwicklung der BCR/ABL-Inhibitoren wurde an der Inhibition weiterer tumorspezifischer Zielstrukturen geforscht. Eine in einer Vielzahl verschiedener Tumoren häufig mutierte Zielstruktur ist der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der nach Bindung seiner Liganden über Aktivierung des Ras/MAPK- sowie des PI3K/AKT-Signaltransduktionswegs Proliferation, Angiogenese und Metastasierung der Zelle fördert. Nicht nur die Überexpression des EGFR kann dabei zu unkontrolliertem Zellwachstum führen, sondern auch eine vermehrte Produktion der Liganden des EGFR.⁴³ Zu diesen Liganden zählen der *epidermal growth factor* (EGF), *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), *transforming growth factor alpha* (TGF- α), Betacellulin, Epiregulin und Amphiregulin. Insbesondere in Lungenkarzinomen, aber auch in anderen Krebsentitäten, konnten sowohl Mutationen des EGFR als auch Hochregulationen beispielsweise von EGF nachgewiesen werden, sodass sich der EGFR als potentiell angreifbare Zielstruktur einer medikamentösen Antitumorthherapie erwies. So wurden zum einen Inhibitoren des EGFR und zum anderen Antikörper gegen den EGFR oder dessen Liganden entwickelt und führten in präklinischen Studien zu einer Verminderung der Proliferation maligner Zellen und der Metastasierung.⁴⁴ Klinische Studien zeigten in Patienten mit EGFR-Mutationen unter den EGFR-Inhibitoren der ersten Generation wie Gefitinib im Vergleich zu Standardchemotherapie eine Verbesserung der Überlebensrate. Jedoch kam es gehäuft zu Resistenzen gegen diese EGFR-Inhibitoren, die auf bestimmten Mutationen des EGFR beruhten, sodass weitere Generationen von EGFR-Inhibitoren entwickelt wurden. Auch zur Behandlung weiterer Neoplasien befinden sich EGFR-Inhibitoren derzeit in verschiedenen Phasen präklinischer oder klinischer Studien.^{43,45}

Wie oben bereits erwähnt spielen neben Tyrosinkinaserzeptoren auch nachgeschaltete Proteine als Teil von Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle in Zellproliferation, -überleben, -migration und -differenzierung. So haben beispielsweise Proteine der RAS-Familie (HRAS, KRAS4A, KRAS4B, NRAS) als Guanosintriphosphatasen (GTPasen) großen Einfluss auf diese zellulären Funktionen. Die Effektor-Signaltransduktionswege RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR sind aufgrund aktivierender RAS-Mutationen häufig hyperaktiv und führen so zu unkontrollierter Zellproliferation und

Apoptoseresistenz. Innerhalb der RAS-Familie bestehen Unterschiede in den Mechanismen der Plasmamembran-Interaktion, welche für die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege unabdingbar ist. Daher konnte bisher kein universeller RAS-Inhibitor entwickelt werden.⁴³ Für HRAS-getriebene Neoplasien wurden die Farnesyltransferase-Inhibitoren Tipifarnib und Lonafarnib entwickelt, da die Anlagerung von HRAS an die Plasmamembran durch eine Farnesyltransferase katalysiert wird. Trotz vielversprechender Ergebnisse in der präklinischen Forschung konnte bisher keine Überlegenheit der Behandlung mit Tipifarnib gegenüber etablierter Therapien in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, sodass Tipifarnib klinisch derzeit nur im Rahmen weiterer Studien eingesetzt wird.^{46,47}

Aufgrund des schlechten Ansprechens auf RAS-Inhibitoren wurden vermehrt Medikamente gegen die nachgeschalteten Effektoren des RAS-Signaltransduktionsweges entwickelt, insbesondere gegen die Proteine der *B-rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF)-Familie (ARAF, BRAF, CRAF/RAF1), welche ebenfalls Zellproliferation, Überleben und –differenzierung regulieren. Die meisten bekannten Mutationen betreffen *BRAF*, meist ein Austausch von Valin gegen Glutaminsäure im Codon 600 (*BRAF-V600E*), und kommen vor allem in malignen Melanomen, kolorektalen Karzinomen und Schilddrüsenkarzinomen vor.⁴³ Die *BRAF-V600E*-Mutation führt zu einer gesteigerten Aktivität von *BRAF*, was wiederum zu einer vermehrten Aktivierung nachgeschalteter Proteine und schlussendlich zu einer gesteigerten Zellproliferation führt.⁴⁸ 2011 wurden die spezifischen *BRAF-V600E*-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib zugelassen und führten zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens von Patienten mit metastasierten malignen Melanomen.^{49,50} Jedoch kam es bei fast allen Patienten zu Rezidiven, sodass derzeit Kombinationen von BRAF- mit *downstream* angreifenden MEK-Inhibitoren in klinischer Prüfung bzw. beim malignen Melanom bereits zugelassen sind.^{51, 52}

Ebenfalls im RAS-Signaltransduktionsweg nachgeschaltet sind die Klasse-I-PI3-Kinasen, die Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (PIP-2) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat (PIP-3) phosphorylieren, das wiederum die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PKB/AKT) aktiviert. PKB/AKT phosphoryliert die Proteinkinase B (AKT), die dadurch teilweise aktiviert wird. Die vollständige Aktivierung erfolgt dann durch den mTOR-Komplex 2.⁵³ Zu den durch die AKT regulierten Effektorproteinen gehören unter anderem die Proteine *mouse double minute 2 homolog* (MDM2), p53, *forkhead box O* (FOXO) und mTOR, welche wichtige Rollen in der Regulation des Zellzyklus,

Zellüberleben, DNA-Reparaturmechanismen und im Zellmetabolismus einnehmen. Die negative Regulation des PI3K-Signalwegs erfolgt durch das *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)*.⁵⁴ Sowohl aktivierende Mutationen der PI3K als auch inaktivierende Mutationen von *PTEN* sind in verschiedensten Malignomen wie Brust-, Kolon-, Endometrium- und Prostatakarzinomen beschrieben, aber auch in Leukämien und Lymphomen, sodass die PI3-Kinase sowohl in soliden als auch in hämatologischen Neoplasien ein mögliches medikamentöses Target darstellt.⁵⁵ In hämatologischen Neoplasien ist vor allem die Hochregulation der PI3K-Isoform δ tumortreibend, da sie vorwiegend in Leukozyten vorkommt und unter anderem über den B-Zell-Rezeptor-Signalweg (*B-cell-receptor*, BCR) die maligne B-Zell-Proliferation treibt. Daher wurden zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen PI3K δ -spezifische Inhibitoren wie Idelalisib entwickelt, der für rezidierte oder refraktäre folliculäre Lymphome, kleinzellige B-Zell-Lymphome und chronische lymphatische Leukämien (CLL) zugelassen ist.⁵⁶

Ein weiteres in der Krebstherapie ausnutzbares Target sind Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK), die an die Zellzyklus-regulierenden Cycline binden. Der CDK-Cyclin-Komplex fördert den Progress der Zelle durch den Zellzyklus und führt so zu Zellproliferation. So führt der Cyclin D1-CDK4/6-Rb-Signaltransduktionsweg zum Übertritt der Zelle von der ersten Wachstumsphase (G1) in die DNA-Synthese-Phase (S) des Zellzyklus. Dies wird auch Restriktionspunkt genannt, da die Zelle nach dem Übergang in die S-Phase unabhängig von externen Signalen in die Mitose eintritt.⁵⁷ Am G1/S-Checkpoint beginnt die Zelle Cyclin D1 zu exprimieren, welches wiederum die CDK 4 und 6 aktiviert. Der dabei entstehende Komplex aus Cyclin D1 und CDK4/6 phosphoryliert Rb, welches sich bis dahin in einem inaktiven Komplex mit E2F befindet. Durch diese Phosphorylierung wird E2F freigesetzt und aktiviert und treibt den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase. Außerdem phosphoryliert der Cyclin D1-CDK4/6-Komplex den Transkriptionsfaktor *forkhead box M1* (FOXM1), der unter anderem zelluläre Seneszenz unterdrückt.⁵⁸ Die Aktivität der CDK 4 und 6 wird durch die Proteine der INK4- (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}), Cip- (p21^{CIP1}) und Kip- (p27^{KIP1}) Familien reguliert.⁵⁹ Hierbei spielt vor allem p16^{INK4a} eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression über eine direkte Inhibition der Cyclin D1-CDK4/6-Aktivität.⁶⁰ Im Rahmen der Tumorgenese können verschiedene Mechanismen zu einer vermehrten Aktivität des Cyclin D1-CDK4/6-Rb-Signaltransduktionswegs führen, wie beispielsweise ein Verlust des Genlokus, der p16^{INK4a} kodiert (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A), oder

Amplifikationen bzw. Mutationen der Genloki, die Cyclin D1, CDK4 oder CDK6 kodieren.⁶¹⁻⁶⁴

Palbociclib blockiert durch Inhibition der CDK 4 und 6 die Phosphorylierung von Rb und FOXM1 und damit den Progress der Zelle von der G1- in die S-Phase. Klinisch werden CDK4/6-Inhibitoren bis jetzt vor allem zur Behandlung von metastasierten Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen in Kombination mit endokriner Therapie angewandt.⁶⁵ Jedoch wird die Anwendung von CDK4/6-Inhibitoren derzeit auch in der Behandlung verschiedener weiterer Tumorentitäten untersucht.

Neben fehlregulierten Tyrosinkinasen beruht die maligne Entartung vor allem hämatologischer Zellen häufig auf einer Fehlregulation des intrinsischen Apoptosewegs, welcher durch Proteine der BCL-2-Familie reguliert wird. Die BCL-2-Familie besteht wiederum aus zwei großen Proteingruppen, wovon eine das Überleben der Zelle und die andere Apoptose fördert. Zu den pro-Überlebens-Proteinen zählen neben BCL-2 die Proteine *myeloid cell leukemia-1* (MCL-1), *B-cell lymphoma extra large* (BCL-xL), *B-cell lymphoma w* (BCL-w) und *BCL-2-related gene expressed in fetal liver* (BFL-1). Die pro-Apoptose-Gruppe beinhaltet die BH3-Proteine *BCL-2-interacting mediator of cell death* (BIM), *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), *phorbol-12 myristate-13-acetate-induced protein 1* (NOXA), *BCL-2-associated death promotor* (BAD), *BH3-interacting domain* (BID), *BCL-2-interacting killer* (BIK), *BCL-2-modifying factor* (BMF) und Harakiri (HRK) sowie *BCL-2-associated X protein* (BAX)/*BCL-2 homologous antagonist killer* (BOK)-artige Proteine. Wird aufgrund verschiedener Stimuli wie beispielsweise DNA-Schädigung die Apoptose initiiert, werden BH3-Proteine aktiviert, die wiederum die BAX/BAK-artigen Proteine aktivieren. Hier kommt es zum sogenannten *point of no return*, nach dem die Zelle irreversibel die Apoptose begehen muss: BAX und BAK führen zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch schließlich Cytochrom C ins Zytoplasma gelangt. Cytochrom C formiert mit dem *apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1) und der Procaspase-9 das Apoptosom, welches die Aktivierung der Procaspase-9 zur Caspase-9 fördert. So kann die Caspase-9 die Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren, die über DNasen zur Degradierung der DNA führen.⁶⁶ In hämatologischen Neoplasien können maligne Zellen zum einen durch pro-Überlebens-Proteine wie BCL-2 von der Apoptose abgehalten werden. Zum anderen kann eine Reduktion der pro-Apoptose-Proteine ebenfalls zu einer vermehrten Proliferation maligner Zellen führen. Da sowohl in der CLL, der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und der akuten myeloischen Leukämie (AML), dem Mantelzelllymphom, dem folliculären

Lymphom und dem diffusen großzelligen Lymphom als auch im multiplen Myelom erhöhtes BCL-2 nachgewiesen werden konnte, wurde die BCL-2-Familie als spezifischen Target medikamentöser Therapie interessant.⁶⁷ So entstand als erstes Medikament, das direkt den Apoptoseweg angreift, ABT-263 (Navitoclax), welches sowohl BCL-2 als auch BCL-xL und BCL-w inhibiert.⁶⁸ Kurz darauf wurde mit ABT-199 (Venetoclax) der erste BCL-2-spezifische Inhibitor entwickelt, dessen Vorteil gegenüber Navitoclax vor allem in reduzierten Nebenwirkungen besteht.^{69,70} Die Monotherapie mit Venetoclax führt in verschiedenen hämatologischen Neoplasien bereits zu beachtlichen Raten kompletter Remissionen; weitere Optimierung wird inzwischen in verschiedenen Kombinationstherapien mit Venetoclax getestet. So verglich beispielsweise die Phase-3-MURANO-Studie Venetoclax plus Rituximab (VR) versus Bendamustin plus Rituximab (BR) in refraktärer oder rezidivierter CLL und zeigte deutliche Vorteile des VR-Arms gegenüber dem BR-Arm, sodass die VR-Therapie im Juni 2018 in den Vereinigten Staaten zur Behandlung refraktärer oder rezidivierter CLL zugelassen wurde.^{66,71}

Insbesondere in der Entstehung hämatologischer Neoplasien der B-Zell-Reihe spielt außerdem die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) eine wichtige Rolle.⁷² Die BTK ist eine im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinase, die durch Interaktion mit dem durch PI3K generierten PIP-3 an die Zellmembran rekrutiert wird. Dort erfolgt die Aktivierung der BTK durch Phosphorylierung. In B-Zellen führt außerdem die Aktivierung des *B-cell receptor* (BCR) durch Antigene über PI3K-Aktivierung zur Rekrutierung der BTK an die Zellmembran. Die BTK wiederum aktiviert die Phospholipase C γ , die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), Komponenten des NF- κ B und die Proteinkinase B. Somit nimmt die BTK eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Proliferation und dem Überleben von B-Zellen ein.⁷³ Daher kann mittels Inhibition der BTK beispielsweise durch Ibrutinib eine Verbesserung des Überlebens in Patienten mit verschiedenen B-Zell-Erkrankungen wie chronisch lymphatische Leukämien oder Mantelzelllymphomen erzielt werden.⁷⁴ Der Wirkmechanismus besteht dabei in der Inhibition der BCR-abhängigen Signalkaskaden sowie in der Störung der Interaktion maligner Zellen mit dem Mikromilieu.⁷⁵ Jedoch kann es auch unter Ibrutinib durch verschiedene Mutationen zur Entstehung sowie zum Auswuchs Ibrutinib-resistenter B-Zellen kommen. Des Weiteren inhibiert Ibrutinib die BTK nicht selektiv, sondern zeigt an anderen Kinasen eine *off-target*-Wirkung. Hierzu zählen die *Interleukin-2-inducible T-cell kinase* (ITK), die BMX-Tyrosinkinase, die Tec-Tyrosinkinase, der EGFR, die *T-cell X chromosome kinase* (TXK) und die Janus-Kinase 3 (JAK3).⁷² Derzeit wird außerdem untersucht, inwiefern Ibrutinib aufgrund möglicher

ektoper BTK-Expression sowie der Rolle der BTK in Immunzellen des Mikromilieus von Tumoren auch in soliden Tumoren tumorsuppressiv wirken kann.⁷⁶

Als wichtiger Regulator der Degradation intrazellulärer Proteine geriet neben den Tyrosinkinase auch das Proteasom in den Fokus auf der Suche nach angreifbaren zellulären Zielstrukturen. Unter anderem werden nach Polyubiquitinierung Proteine, die in der Zellzyklusregulation sowie in Zellproliferation und –überleben wichtige Rollen einnehmen durch das Proteasom degradiert.⁷⁷ Fehlregulierungen dieses Systems können zum vermehrten Abbau wichtiger regulatorischer Proteine wie beispielsweise des Tumorsuppressors p53 oder des Inhibitors von NF- κ B (I κ B) führen und so die Entstehung und die Progression von ungehemmtem Zellwachstum fördern. Auch weitere zelluläre Prozesse werden durch Fehlregulationen des Proteasoms beeinflusst; hierzu zählen unter anderem die Zellzykluskontrolle und zelluläre Stressmechanismen.⁷⁸ Da gezeigt werden konnte, dass maligne Zellen anfälliger für eine Inhibition des Proteasoms waren, wurden verschiedene Proteasom-Inhibitoren entwickelt, die sich vor allem durch die Bindung an verschiedenen katalytischen Einheiten unterscheiden. Trotz dieser Unterschiede führen die verschiedenen Generationen von Proteasom-Inhibitoren zu ähnlichen *downstream* Effekten in der Zelle. Ein wichtiger Mechanismus, über den Proteasom-Inhibitoren die Proliferation von Myelomzellen verhindern, ist über die Blockierung der Degradation von I κ B, wodurch wiederum die Translokation von NF- κ B in den Nukleus und die darauffolgende Gentranskription verhindert werden.^{79,80} Insbesondere wird so die durch NF- κ B getriebene transkriptionelle Aktivierung von antiapoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie, die Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen sowie die NF- κ B-vermittelte Interaktion der Myelomzelle mit dem Mikromilieu verhindert.⁸¹ Außerdem wird durch Proteasom-Inhibitoren die Degradation von regulatorischen Zellzyklusproteinen wie p21, p27, Cyclin D und Cyclin E verhindert, was zu einem Zellzyklusarrest führen kann.^{78,82} Auch akkumulieren aufgrund der Inhibition des Proteasoms fehlgefaltete Proteine, was über Stress des endoplasmatischen Retikulums in zellulärer Apoptose enden kann.⁸³ In verschiedenen klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Proteasom-Inhibitoren vor allem synergistisch mit Alkylanzien, Glukokortikoiden und immunmodulatorischen Medikamenten wirken, sodass Proteasom-Inhibitoren zur Behandlung des multiplen Myeloms vor allem in Zwei- oder Dreifachkombinationen mit den genannten Substanzgruppen eingesetzt werden.^{84–86}

2.4 Zelluläre Seneszenz durch zielgerichtete Therapien

Die hier beschriebenen und weitere zielgerichtete Therapien werden klinisch zunehmend in der Behandlung maligner Erkrankungen bereits eingesetzt. Während die Effekte klassischer Chemotherapie auf zelluläre Prozesse wie Apoptose und Seneszenz vielfach untersucht worden sind, besteht jedoch weiterhin Unklarheit über den detaillierten Mechanismus, über den diese neueren zielgerichteten Therapien wirken. Insbesondere ist wenig über die Fähigkeit dieser Inhibitoren, in Tumorzellen Seneszenz auszulösen, bekannt. Zwar gibt es einige Arbeiten, die im Rahmen der Untersuchung eines spezifischen Inhibitors auch die Frage nach Seneszenzauslösung adressieren. Jedoch beschränken sich diese wenigen Untersuchungen jeweils auf einen einzelnen Inhibitor und dessen Effekte auf Zellen, die die spezifische Zielstruktur des Inhibitors aufweisen, ohne *off-target* Effekte zu betrachten.

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen klinisch bereits eingesetzten Inhibitoren verschiedener Wirkmechanismen und der Auslösung zellulärer Seneszenz systematisch zu verstehen. Im Rahmen dessen sollte daher die Frage adressiert werden, inwiefern ein breites Spektrum an verschiedenen Inhibitoren in unterschiedlichen Zelllinien hämatologischer Neoplasien mit unterschiedlichen Mutationsstatus Seneszenz auslösen können und inwiefern Signaltransduktionswegs-spezifische oder *off-target* Effekte dieser Inhibitoren hinsichtlich der Auslösung zellulärer Seneszenz bestehen (s. Tab. 2).

Zelllinie	Tumorentität	Genetische Charakteristika
K562	Chronisch myeloische Leukämie in myeloischer Blastenkrise	t(9;22)(q34;q11)
Mec1	Chronische lymphozytäre B-Zell-Leukämie	t(1; 6)(q23; p23), t(2; 10)(q23;q22.1), del(12)(p12p13)(q13q15), del(17)(p11.2pter)
RC-K8	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	t(11;14)(q23;q32)
SD-1	B-Linien akute lymphoblastische Leukämie	t(9;22)(q34;q11)

Tabelle 2. Untersuchte Zelllinien, deren jeweilige Tumorentität und genetische Charakteristika.⁸⁷⁻⁹⁰

Dabei wurden Zelllinien ausgewählt, deren Verhalten nach Behandlung mit klassischer Chemotherapie wie Adriamycin in der Literatur bereits beschrieben ist, um einen Vergleich zwischen neuen zielgerichteten Therapien und klassischer Chemotherapie möglich zu ermöglichen.¹¹ Bei der Auswahl der zielgerichteten Therapien wurde der Fokus auf klinisch bereits eingesetzte Therapien gesetzt, über die in der Literatur bisher wenige oder keine Daten bezüglich deren Fähigkeit, Seneszenz auszulösen, vorhanden war.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit nach Auslösung von Seneszenz durch zielgerichtete Therapien die Genexpression der behandelten Zellen hinsichtlich SASP- und Stemness-Genen untersucht werden, um so die molekularbiologischen Folgen einer möglichen Seneszenzauslösung durch die Behandlung mit Inhibitoren in Tumorzellen zu untersuchen (s. Tab. 3). Insbesondere da die untersuchten Inhibitoren in der Klinik bereits zur Behandlung verschiedener Neoplasien eingesetzt werden, ist eine genauere Untersuchung der Folgen einer solchen Behandlung unerlässlich. Wie oben bereits beschrieben kann sowohl durch die Entwicklung eines SASP als auch durch Stemness-Funktionen nicht nur das Tumorwachstum gefördert werden, sondern auch Therapieresistenzen oder die Entstehung von Rezidiven unterstützt werden. Gleichzeitig könnte bei vermehrter Seneszenzentwicklung nach Behandlung mit zielgerichteten Therapien eine senolytische oder senomorphische Therapie zur Verbesserung der Prognose und Vermeidung der negativen Effekte von Seneszenz eingesetzt werden.

SASP-Gene	Stemness-Gene
Biglykan	ABCG2
Decorin	CD34
CCL2	CD44
GM-CSF	CD133
IL-1A	CD150
IL-6	LGR5
IL-8	

Tabelle 3. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse untersuchte SASP- bzw. Stemness-Gene.

3 Methodik

3.1 Eingesetzte Materialien und Lösungen

3.1.1 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Chemikalie	Hersteller
0,1M DTT	Invitrogen
2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Merck
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Roth
5X First-Strand Buffer	Invitrogen
ABT-199 (GDC-0199)	Abmole
Adriamycin (Doxorubicin, ADR)	Zytostatika-Apotheke der Charité
Bortezomib (PS-341)	Selleckchem
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
dNTP-Set1	Roth
Ethanol 70% vergällt	Roth
Ethanol 96%	Roth
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco
Gefitinib (ZD1839)	Selleckchem
GhostDye Violet 450	Tonbo Biosciences
Glutaraldehyd, wässrige Lösung 50%	Roth
Guava ViaCount Reagent	Merck
Ibrutinib (PCI-32765),	Selleckchem
Idelalisib (GS-1101)	Selleckchem
ImaGene Green C_{12} FDG (5-	Thermo Fisher Scientific
Dodecanoylaminofluorescin Di- β -D-Galactopyranoside)	
Imatinib Mesylate (STI571)	Selleckchem
Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$)	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Hersteller
Kaliumferrocyanid ($K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Roth
Milli Q Wasser	Roth
Natriumborat (Einsatz als wässrige Lösung 0.1 M, pH 8,5)	Sigma-Aldrich
Oligo-dT	Sigma-Aldrich
Palbociclib (PD0332991) Isethionate	Selleckchem
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (Konzentratlösung 10.000 U/ml)	Biochrom
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
RPMI 1640 Zellkultur-Medium	Gibco
SuperScript II Reverse Transcriptase 200 U/ μ l	Invitrogen
Salzsäure, rauchend 37%	Roth
Tipifarnib (R115777)	Abmole
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Vemurafenib (PLX4032)	Selleckchem
B-Mercaptoethanol	Roth

3.1.2 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems

3.1.3 TaqMan-Sonden

Ziel-Gen	Proben-Nummer
ABCG2	Hs01053790_m1
Biglykan	Hs00959143_m1

Ziel-Gen	Proben-Nummer
CCL2	Hs00234140_m1
CD34	Hs00990732_m1
CD44	Hs01075861_m1
CSF2	Hs99999044_m1
Decorin	Hs00370384_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
IL-1A	Hs00174092_m1
IL-6	Hs00174131_m1
IL-8	Hs01567913_g1
LGR5	Hs00173664_m1
PROM1	Hs01009250_m1
SLAMF1	Hs00234149_m1

3.1.4 Lösungen

Einfriermedium zur Kryokonservierung der Zelllinien:

- 80% RPMI- oder DMEM-Medium
- 10 % FBS
- 10% DMSO

Fixierlösung für SA-β-Gal-Färbung:

- 2 g Paraformaldehyd
- 250 µl Glutaraldehyd 50%
- 50 ml PBS (1 mM Magnesiumchlorid, pH 6,0)

Fixierlösung für Fluoreszenz-Färbung:

- 2 g Paraformaldehyd
- 50 ml PBS

Kaliumcyanid-Konzentrat-Lösung:

- 820 mg $K_3Fe(CN)_6$
- 1050 mg $K_4Fe(CN)_6$
- 25 ml PBS

SA-β-Gal-Färbelösung:

- 25 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid

50 µl Kaliumcyanid-Konzentrat-Lösung

930 µl PBS (1 mM Magnesiumchlorid, pH 6,0)

3.2 Geräte und Software

3.2.1 Eingesetzte Geräte

Gerät	Hersteller
AE2000 Inverses Mikroskop	Motic
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder
Evos XL Core Konfiguriertes Mikroskop	AMG
Fresco 17 Mikrozentrifuge	Heraeus
Guava easyCyte 12 HT Durchflusszytometer	Merck
ImageStreamX Mark II Imaging Flow Cytometer	Merck
LUNA Automated Cell Counter	Logos Biosystems
Megafuge 1.0R	Heraeus
NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific
Reax Top Vortexer	Heidolph
Step One Plus Real Time PCR System	Applied Biosystems
T3 Thermoblock	Biometra
Zytospin-Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich-Zentrifugen

3.2.2 Eingesetzte Software

Anwendung	Software und Hersteller
Fotomikroskop	EVOSxl Core, Peqlab
Guava easyCyte	guavaSoft Software Version 3.3, Merck
Image Stream X	INSPIRE and IDEAS Software, Merck
Analyse FACS	FlowJo X 10.0.7r2, LLC
Step One Plus Real Time PCR System	StepOne Software, Versionen 2.0 und 2.3, Applied Biosystems
Statistik und Graphen	GraphPad Prism, Version 5.01, GraphPad Software

Anwendung

Textverarbeitung

Software und Hersteller

Microsoft Office 2016, Microsoft

3.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien K562, Mec1, RC-K8 und SD-1 wurden in 90% RPMI-1640-Medium, 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin-Konzentrat kultiviert.

Für die Behandlung der Zellen wurde die jeweilige Zelllinie nach Messung der Zellzahl und -vitalität mittels eines Luna Automated Cell Counter in einer Dichte von $0,25 \times 10^5$ vitale Zellen/ml (K562, Mec1, SD-1) oder 1×10^5 vitale Zellen/ml (RC-K8) auf 6-Well-Zellkulturplatten im Medium ausgesät. Direkt nach der Aussaat erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen eines Inhibitors oder mit Adriamycin (10 ng/ml ADR für RC-K8, Mec1 und SD-1, 25 ng/ml ADR für K562). Für die Verdünnungsreihen der Inhibitoren wurde entweder Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Milli Q Wasser verwendet (s. Tab. 4). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer gleichen Menge DMSO oder Milli Q Wasser behandelt wurden. Drei Tage nach der Behandlung der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel, indem die Zellen bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurden, der Überstand abgekippt wurde und die Zellen in neuem Medium ohne Inhibitor oder Adriamycin resuspendiert und auf einer neuen 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät wurden. Je nach erreichter Dichte wurden die Zellen hierbei verdünnt ausgesät. Am insgesamt sechsten Tag nach Behandlung wurden die Zelldichte sowie die Vitalität der Zellen durchflusszytometrisch wie unten beschrieben bestimmt und es erfolgten eine histochemische und eine fluoreszenzbasierte Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) sowie die Isolation der zellulären RNA.

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in 80% RPMI-Medium, 10% FBS und 10% DMSO.

Inhibitor	Verwendete Konzentrationen	Plasma-konzentrationen	Lösungsmittel
ABT-199	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	5×10^{-6} M	DMSO
Bortezomib	10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 5^{-8} M	2×10^{-7} M	DMSO
Gefitinib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	4×10^{-7} M	DMSO
Ibrutinib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	3×10^{-7} M	DMSO

Inhibitor	Verwendete Konzentrationen	Plasma-konzentrationen	Lösungsmittel
Idelalisib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	5×10^{-6} M	DMSO
Imatinib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	3×10^{-6} M	DMSO
Palbociclib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	2×10^{-7} M	Milli Q Wasser
Tipifarnib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	3×10^{-6} M	DMSO
Vemurafenib	10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M	1×10^{-4} M	DMSO

Tabelle 4. Eingesetzte Inhibitoren mit Angabe der jeweils verwendeten Konzentrationen in Anlehnung an die angestrebten Plasmakonzentrationen sowie des verwendeten Lösungsmittels.⁹¹⁻⁹⁹

3.4 Wachstums- und Viabilitätskurven

Mittels der Guava-ViaCount-Reagenzie, welche zwei Fluoreszenzfarbstoffe enthält, kann an einem Guava easyCyte Durchflusszytometer zwischen viablen, apoptotischen und toten Zellen unterschieden werden. Hierfür wird zum einen ein DNA-interkalierender Farbstoff verwendet, der von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran ausgeschlossen wird, während apoptotische und tote Zellen aufgrund ihrer geschädigten Zellmembran den Farbstoff aufnehmen. So wird spezifisch die DNA apoptotischer und toter Zellen angefärbt. Das Fluoreszenzsignal dieses Farbstoffs wird durch die *Photomultiplier Tube 1* (PM1) erkannt. Der zweite Farbstoff kann die Zellmembran penetrieren und färbt so alle nukleären Zellen und wird durch die *Photomultiplier Tube 2* (PM2) erkannt. Zur Messung der Zellzahl werden die Zellen nach Mischung mit der Guava-ViaCount-Reagenzie über eine Kapillare aufgenommen, die eine bestimmte Größe hat. Events werden dann gezählt, wenn an der PM2 ein Signal für eine nukleäre Zelle erkannt wird und die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) der Größe einer Zelle entspricht. Apoptotische oder tote Zellen können über die Erkennung eines Signals an der PM1 ausgeschlossen werden, während Zelldebris eine zu niedrige Vorwärtsstreuung aufweist.¹⁰⁰

An den ersten drei Tagen sowie am sechsten Tag nach Behandlung wurden die Zelldichte sowie die Viabilität der behandelten Zellen und der Kontrolle im Guava easyCyte Durchflusszytometer gemessen. Hierfür wurden jeweils 20 oder 40 μ l der Zellsuspension mit 180 oder 160 μ l 1:10 in PBS verdünnter Guava-ViaCount-Reagenzie auf einer 96-Well-Platte zu einem Gesamtvolumen von 200 μ l gemischt. Die gefärbten Samples wurden dann mittels des Guava easyCyte Systems und der GuavaSoft Software nach

manueller Einstellung des FSC-Signals sowie der PM1- und PM2-Spannungen zur optimalen Darstellung der viablen vs. toten Zellen auf einem „FSC vs. Viabilität (PM1)“- und einem „Viabilität (PM1) vs. nukleäre Zellen (PM2)“-Graphen gemessen. Durch Adjustierung der PM1- und der PM2-Schwellen konnte dann zwischen viablen und toten Zellen unterschieden werden.

3.5 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase

3.5.1 Histochemische Färbung

Die histochemische Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) beruht auf der Spaltung des chromogenen Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) durch die intrazelluläre β -Galaktosidase in saurem Milieu (pH 6,0). Durch die Spaltung entsteht der Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo, welcher lichtmikroskopisch im Zytoplasma seneszenten Zellen detektiert werden kann.¹⁰ Nach Abzentrifugation der zu analysierenden Zellen am sechsten Tag nach Behandlung für fünf Minuten bei 1000 rpm erfolgte die Aufnahme von 1×10^5 Zellen in 75 μ l RPMI-Medium. Die Zellen wurden dann in einer Zytospin-Kammer auf Objektträger überführt und für 8 Minuten bei 800 rpm und bei 10 °C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen auf den Objektträgern für 10 Minuten in 2%iger Paraformaldehyd-Lösung mit 0,25% Glutaraldehyd fixiert und anschließend zweimalig mit 1 mM Magnesiumchlorid enthaltendem PBS (PBS_{MgCl₂}) bei pH 6,0 für jeweils 5 Minuten gewaschen. Es folgte die Inkubation in frisch angesetzter SA- β -Gal-Färbelösung (s.o.) bei 37 °C unter Lichtausschluss. Nach auf die unterschiedlichen Zelllinien abgestimmten Färbezeiten wurden die Zellen erneut zweimalig mit PBS_{MgCl₂} gewaschen, bevor dann die lichtmikroskopische Quantifizierung der SA- β -Gal-positiven Zellen erfolgte.¹⁰¹ Hierfür wurden mindestens 200 Zellen in drei verschiedenen Ausschnitten eines Zytospins gezählt.

3.5.2 Fluoreszenz-Färbung

Für die Fluoreszenz-basierte Bestimmung der SA- β -Gal wird der lysosomale pH der Zellen mittels Chloroquin auf 6,0 eingestellt, um dann mittels des fluorogenen β -Galaktosidase-Substrats 5-Dodecanoylaminofluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG) seneszente Zellen zu färben.¹⁰¹ Um zusätzlich viable von nicht-viablen Zellen zu unterscheiden, wurde der Ghost Dye Violet 450 verwendet, welcher freie Amine auf

der Zelloberfläche oder freie Amine von Zellen mit zerstörten Zellmembranen bindet. So reagieren nekrotische Zellen mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal als viable Zellen.¹⁰² Für die Fluoreszenz-Färbung wurden am sechsten Tag nach Behandlung ca. 1×10^6 Zellen zunächst für eine Stunde bei 37°C unter Lichtausschluss in 250 µl 150 nM Chloroquin enthaltendem RPMI-Medium inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 250 µl RPMI-Medium mit 8,5 µM C₁₂FDG und die erneute Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss für 30-60 Minuten je nach Zelllinie. Danach wurden die Zellen in 1 ml reinem PBS gewaschen und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Aufnahme der Zellen in 200 µl PBS mit 1 µl/ml Ghost Dye Violet 450 und die Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 30 Minuten. Nach erneutem Waschen in PBS sowie Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen in 100 µl 2%iger Paraformaldehyd-Fixierlösung fixiert und dann in 40 µl reinem PBS aufgenommen.¹⁰¹ Die Messung erfolgte an einem ImageStream^X Mark II Imaging Durchflusszytometer. Die Auswertung der Daten wurde mittels der zugehörigen INSPIRE und IDEAS Softwares sowie mittels der FlowJo Software durchgeführt.

3.6 Isolation zellulärer RNA

Die Isolation der zellulären RNA am sechsten Tag nach Behandlung erfolgte mittels des RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Hierfür wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in β-Mercapto-Ethanol enthaltendem RLT-Plus-Puffer lysiert und homogenisiert, um so RNasen zu inaktivieren und intakte RNA zu isolieren. Zur Entfernung der genomischen DNA wurde das Lysat in einer „gDNA Elimination Spin Column“ zentrifugiert. Nach Hinzugabe von 70%igem Ethanol wurde die im Lysat gelöste RNA mittels einer „RNeasy MiniElute Spin Column“ gebunden. Es folgte mehrfaches Waschen der Spin Column mittels RW1- und RPE-Puffer zur Vermeidung von Kontaminationen, bevor die RNA dann in RNase-freiem Wasser eluiert wurde.¹⁰³ Direkt im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der RNA-Menge mittels eines NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometers.

3.7 cDNA-Synthese

Nach Isolation und Quantifizierung der zellulären RNA erfolgte die Umschreibung der RNA in komplementäre DNS (cDNA) mittels reverser Transkriptase, um diese dann durch eine PCR amplifizieren zu können. Für die Umschreibung der RNA in cDNA nach der

Anleitung der SuperScript II Reverse Transcriptase (invitrogen) wurden 500 ng RNA mit Oligo(dT), dNTP-Mix und RNase-freiem Wasser in folgendem Verhältnis gemischt:

RNA	500 ng
Oligo(dT) (500 µg/ml)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
RNase-freies Wasser	ad 12 µl

Nach Erhitzung des Gemisches bei 65 °C für 5 Minuten und anschließender Abkühlung auf Eis für eine Minute erfolgte die Zugabe von „5X First-Strand Buffer“, 0,1 M DTT und RNasin in folgendem Verhältnis:

5X First-Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNasin	0,5 µl

Das Gemisch wurde dann für zwei Minuten bei 42 °C erhitzt. Anschließend wurden 0,5 µl der SuperScript II Reverse Transcriptase hinzugefügt und das Gemisch für 50 Minuten bei 42 °C und anschließend für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert.¹⁰⁴

3.8 Quantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR)

Um DNA oder RNA zu quantifizieren, wird bei der RQ-PCR ein mit jedem Amplifikationszyklus zunehmendes Fluoreszenzsignal gemessen, welches proportional zur Anzahl der entstehenden PCR-Amplikons ist. Sequenz-spezifische Primer hybridisieren nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA mit spezifischer komplementärer DNA, sodass durch die Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase die Synthese neuer Stränge erfolgen kann. Sobald die Polymerase eine TaqMan-Sonde erreicht, wird der Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende der Sonde von ihrem NFQ-Quencher am 3'-Ende getrennt.¹⁰⁵

Nach zweimaligem Waschen der Zellen in PBS wurde mittels des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) die RNA aus den Zellen isoliert und die Menge mittels eines NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometers bestimmt. Nach Zugabe von Oligo-dT und dNTP erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA mittels der SuperScript II Reverse Transkriptase. 50 ng der gewonnenen cDNA wurden mit dem TaqMan Fast Advanced Master Mix sowie einer TaqMan-Probe, die jeweils die Transkript-spezifischen Primer und eine Sonde enthält, nach folgendem Schema auf einer Mikrotiter-Platte zu einem Gesamtvolumen von 10 µl pipettiert:

cDNA (50 ng/µl)	2 µl
-----------------	------

TaqMan Fast Advanced Master Mix	5 µl
DNase- und RNase-freies Wasser	2,5 µl
TaqMan-Probe	0,5 µl

Nach Erwärmung des Gemisches auf 50°C für zwei Minuten folgte die Amplifikation über 40 Zyklen unter Fluoreszenzkontrolle in einem StepOnePlus Real-Time PCR System unter folgenden Bedingungen:

95 °C	10 Minuten
95 °C	15 Sekunden
60 °C	60 Sekunden

Hierbei wurde GAPDH als interne Kontrolle verwendet, da keine Expressionsveränderung dieses Gens durch Behandlung der Zellen erwartet wurde.¹⁰³

Für die Analyse der relativen Veränderung der Genexpression der untersuchten Transkripte wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet. Dafür wurden folgende Parameter benötigt:

Ct: PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal gegenüber dem Hintergrund detektierbar wird.

ΔCt : Differenz der Ct-Werte des untersuchten Gentranskripts und der GAPDH-Kontrolle.

$\Delta\Delta Ct$: Differenz des ΔCt -Werts der behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrolle für ein Gentranskript.

Die relative Veränderung der Genexpression (RQ) eines spezifischen Transkripts konnte dann nach der folgenden Formel berechnet werden: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.¹⁰⁵

3.9 Statistische Datenanalyse

Die Zielsetzung der Arbeit war die Analyse von Signalen zellulärer Seneszenzinduktion in einem Panel hämatologischer Tumorzelllinien unter Exposition gegenüber einigen etabliert oder potentiell Effekte auslösenden zielgerichteten Therapeutika. Der experimentelle Aufbau dieser Arbeit als Untersuchung des Effekts von Medikamenten auf verschiedene Zelllinien erlaubt nur eine eingeschränkte Anwendung statistischer Methoden zur Beurteilung beispielsweise der Signifikanz der hier gezeigten Daten. Zwar kann die Reproduzierbarkeit und die technische Durchführung der Experimente mittels statistischer Datenanalyse auch hier ermittelt werden, jedoch wurden hier keine Unterschiede zwischen biologisch individuellen Subjekten untersucht, sodass die hier

generierte Hypothese in einer bezüglich der Zelllinien- bzw. Fallzahl größer angelegten Folgestudie fokussierter tiefenanalysiert werden muss.

Um die Reproduzierbarkeit der hier durchgeführten Experimente zu sichern, wurden alle Experimente in mindestens drei zeitlich unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Für die statistische Analyse der so ermittelten Daten wurde eine Normalverteilung angenommen, sodass zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen die *repeated measures one-way analysis of variance* (repeated measures one-way ANOVA, einfache Varianzanalyse wiederholter Messungen) sowie der Dunnett's Test als Post-hoc Test zum Vergleich der behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe angewendet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Die Behandlung mit dem Anthracyclin Adriamycin löst zelluläre Seneszenz in humanen Lymphom- und Leukämie-Zelllinien aus

Zunächst erfolgte die Auswahl geeigneter Zelllinien zur Beurteilung der Auslösung zellulärer Seneszenz durch zielgerichtete Therapien. Hierfür wurden die drei humanen Zelllinien K562, SD-1 und RC-K8 ausgewählt, in welchen bereits zuvor beschrieben wurde, dass durch die Behandlung mit Adriamycin (ADR) Seneszenz verursacht werden kann. So konnte die Adriamycin-Behandlung der Zelllinien als positive Seneszenz-Kontrolle genutzt werden. Als negative Seneszenz-Kontrolle wurde die humane Zelllinie Mec1 gewählt, da hier nach Adriamycin-Behandlung zuvor keine Seneszenz nachgewiesen werden konnte.

Mittels histochemischer sowie durchflusszytometrischer SA- β -Gal-Färbungen konnten zuvor veröffentlichte Ergebnisse reproduziert werden und somit bestätigt werden, dass Adriamycin in den Zelllinien K562, SD-1 und RC-K8 nach dreitägiger Adriamycin-Behandlung am sechsten Tag nach Behandlung Seneszenz auslöst. Auch konnte bestätigt werden, dass Mec1 nach Adriamycin-Behandlung Seneszenz-unfähig ist (s. Abb. 3).¹¹

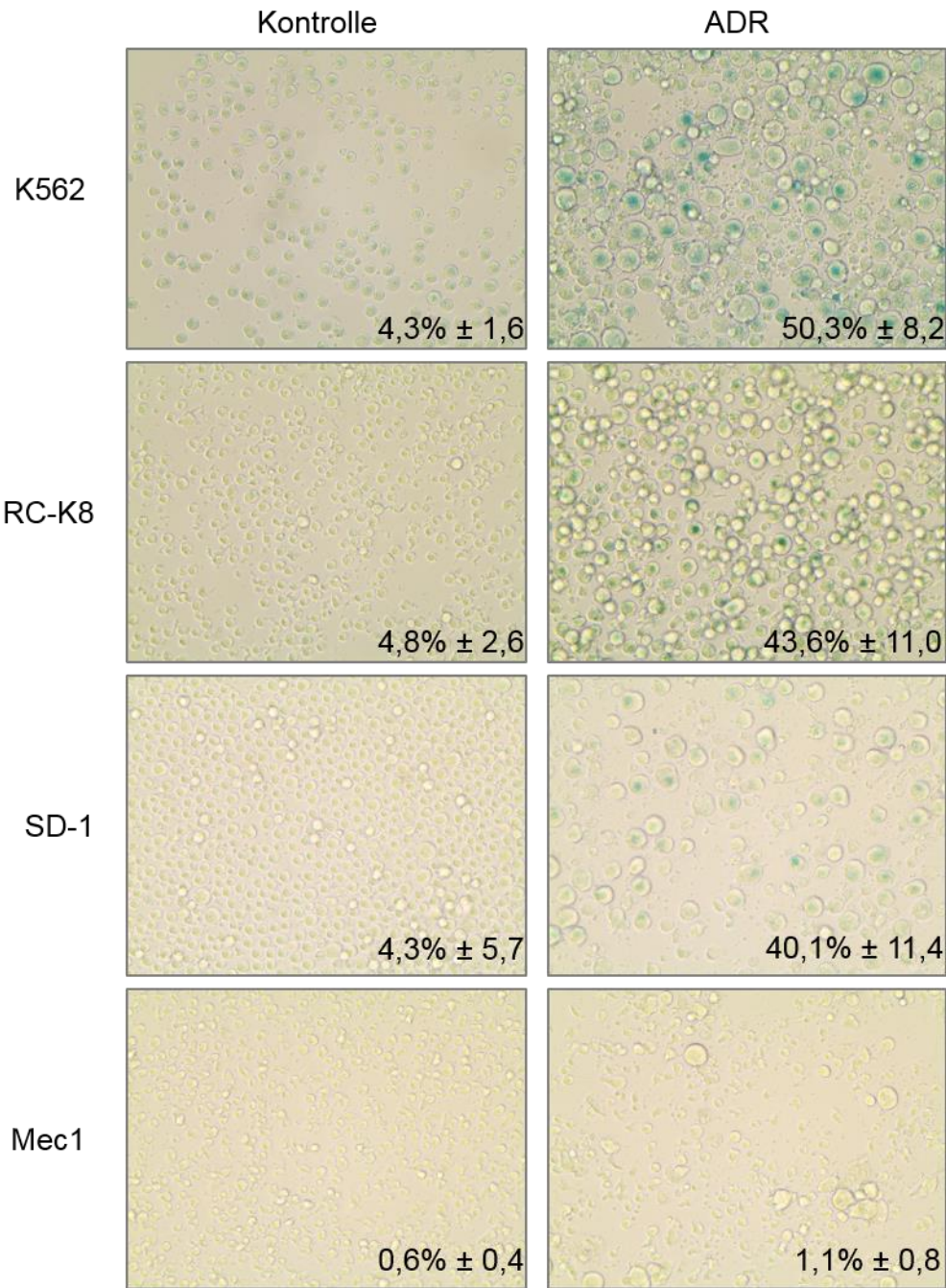


Abbildung 3. Histochemische SA-β-Gal-Färbung nach Adriamycin-Behandlung der Zelllinien K562, RC-K8, SD-1 und Mec1 nach sechs Tagen. Repräsentative Mikrofotographien der behandelten Zellpopulationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation. Prozentangaben geben Mittelwerte und Standardabweichungen der SA-β-Gal-positiven Anteile an.

4.2 Klinisch eingesetzte zielgerichtete Therapien lösen zelluläre Seneszenz in humanen Lymphom- und Leukämie-Zelllinien trotz fehlender Targets aus

Nach der Auswahl Seneszenz-fähiger und Seneszenz-resistenter Zelllinien erfolgte die Behandlung dieser Linien mit einem breiten Spektrum zielgerichteter Therapien, welche alle bereits im klinischen Bereich für die Behandlung verschiedener Krebsentitäten eingesetzt werden. Die Auswahl der Inhibitoren deckte hierbei verschiedenste Zielstrukturen, die in der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen eine Rolle spielen, ab. Unterschieden werden müssen Inhibitoren, die vorgeben, mutationsspezifisch zu sein, Inhibitoren, die an einem onkogen deregulierten Prinzip angreifen und solche, die als *Biological* mit zellulären Kontrollmechanismen interferieren (s. Tab. 5).

Inhibitor	Zielstruktur	Wirkprinzip	Target in untersuchten Zelllinien
ABT-199 (Venetoclax)	Bcl-2	Interferenz mit zellulären Kontrollmechanismen	K562: bcl2 ⁺⁺ Mec1: bcl2 ⁺⁺ RC-K8: bcl2 ⁺ SD-1: nicht bekannt
Bortezomib	Proteasom	Interferenz mit zellulären Kontrollmechanismen	K562: Proteasom ^{+/-} Mec1: Proteasom ^{+/-} RC-K8: Proteasom ^{+/-} SD-1: Proteasom ^{+/-}
Gefitinib	EGFR	Angriff eines onkogen deregulierten Prinzips	K562: EGFR ⁺ Mec1: nicht bekannt RC-K8: nicht bekannt SD-1: nicht bekannt
Ibrutinib	BTK	Angriff eines onkogen deregulierten Prinzips	K562: BTK ⁺ Mec1: BTK ⁺ RC-K8: BTK ⁺ SD-1: BTK ^{+/-}
Idelalisib	PI3K δ	Angriff eines onkogen deregulierten Prinzips	K562: PI3K ⁺ Mec1: PI3K ⁺ RC-K8: PI3K ⁺ SD-1: PI3K ^{+/-}

Inhibitor	Zielstruktur	Wirkprinzip	Target in untersuchten Zelllinien
Imatinib	BCR/ABL	Angriff eines onkogen deregulierten Prinzips	K562: Philadelphia-Chromosm ⁺ Mec1: Philadelphia-Chromosm ⁻ RC-K8: Philadelphia-Chromosm ⁻ SD-1: Philadelphia-Chromosm ⁺
Palbociclib	CDK4/CDK6	Interferenz mit zellulären Kontrollmechanismen	K562: CDK4/CDK6 ^{+/-} Mec1: CDK4/CDK6 ^{+/-} RC-K8: CDK4/CDK6 ^{+/-} SD-1: CDK4/CDK6 ^{+/-}
Tipifarnib	Farnesyl-transferase	Angriff eines onkogen deregulierten Prinzips	K562: Ras ^{+/-} Mec1: Ras ^{+/-} RC-K8: Ras ^{+/-} SD-1: Ras ^{+/-}
Vemurafenib	BRAF-V600E	Mutationsspezifisch	K562: BRAF-V600E ^{-/+} Mec1: BRAF-V600E ^{-/+} RC-K8: BRAF-V600E ^{-/+} SD-1: BRAF-V600E ^{-/+}

Tabelle 5. Eingesetzte Inhibitoren, deren Zielstruktur und das zugrunde liegende Wirkprinzip sowie das Vorkommen der Zielstrukturen in den eingesetzten Zelllinien (++ überexprimiert/hochreguliert, + nachgewiesen ohne Mutation, - nachgewiesen nicht vorhanden, +/- erwartet ohne Mutation, -/+ erwartet nicht vorhanden).^{87-90,106-115}

Zunächst wurde die Antwort der Linien auf steigende Konzentrationen der Inhibitoren, welche an deren angestrebte Plasmakonzentrationen in der klinischen Behandlung angelehnt wurden (s. Tab. 4), mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Zelldichte und –viabilität analysiert. Hier zeigte sich bei den meisten Linien eine Toleranz gegenüber vieler Inhibitoren, was sich in hoher Vitalität sowie steigender Zelldichte trotz Behandlung ausdrückte. In der Linie K562 führten dabei die Behandlungen ab 5⁻⁸ M Bortezomib, 10⁻⁵ M Ibrutinib und 10⁻⁶ M Imatinib (s. Abb. 4), in der Linie RC-K8 die

Behandlungen ab 10^{-5} M ABT-199, 5^{-8} M Bortezomib und 10^{-5} M Vemurafenib (s. Abb. 5), in der Linie SD-1 die Behandlungen ab 10^{-5} M ABT-199, 10^{-8} M Bortezomib, 10^{-5} M Ibrutinib, 10^{-6} M Idelalisib, 10^{-5} M Imatinib, 10^{-6} M Palbociclib, 10^{-7} M Tipifarnib und 10^{-7} M Vemurafenib (s. Abb. 6) und in der Linie Mec1 die Behandlungen ab 10^{-5} M ABT-199, 10^{-8} M Bortezomib, 10^{-5} M Ibrutinib, 10^{-5} M Idelalisib sowie 10^{-7} M Tipifarnib (s. Abb. 7) zu Viabilitätsminderungen unter 80% viable Zellen. Gleichzeitig zeigte sich in allen Behandlungen und allen Linien eine dosisabhängige Abflachung der Wachstumskurven der Zellen nach Behandlung mit den Inhibitoren.

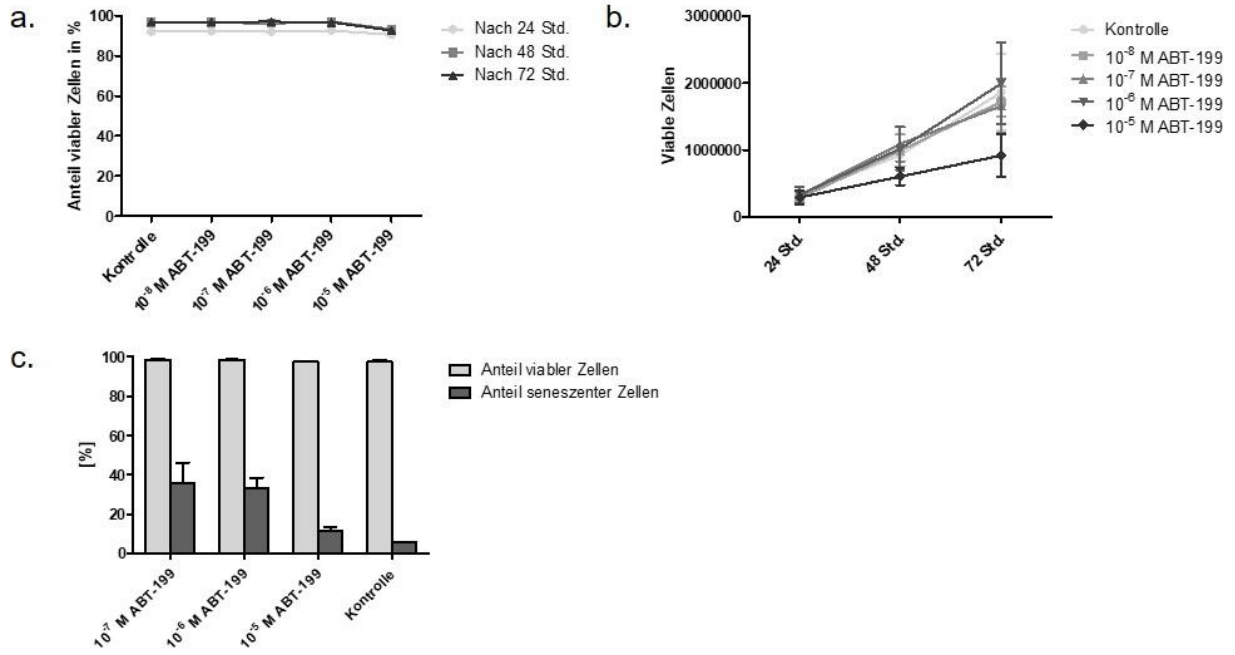
Um die Fragestellung dieser Arbeit zu adressieren, wurden im Rahmen eines breiten Screening-Ansatzes sowohl die Konzentrationen der Inhibitoren, die zu keiner erheblichen Viabilitätsminderung in den Linien führten, als auch diejenigen, die eine solche Minderung der Zellviabilität auslösten, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, zelluläre Seneszenz auszulösen, analysiert.

Zunächst wurde dies am sechsten Tag nach Behandlung mittels der etablierten histochemischen Färbung der SA- β -Gal untersucht, um festzustellen, ob es nach Behandlung mit den Inhibitoren überhaupt zu Seneszenz kommt. Hier zeigte sich, dass in den Seneszenz-fähigen Zelllinien K562, SD-1 und RC-K8 durch die Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren eine vermehrte Blaufärbung ausgelöst wurde. In der Zelllinie Mec1 konnte mit keinem Inhibitor Seneszenz ausgelöst werden.

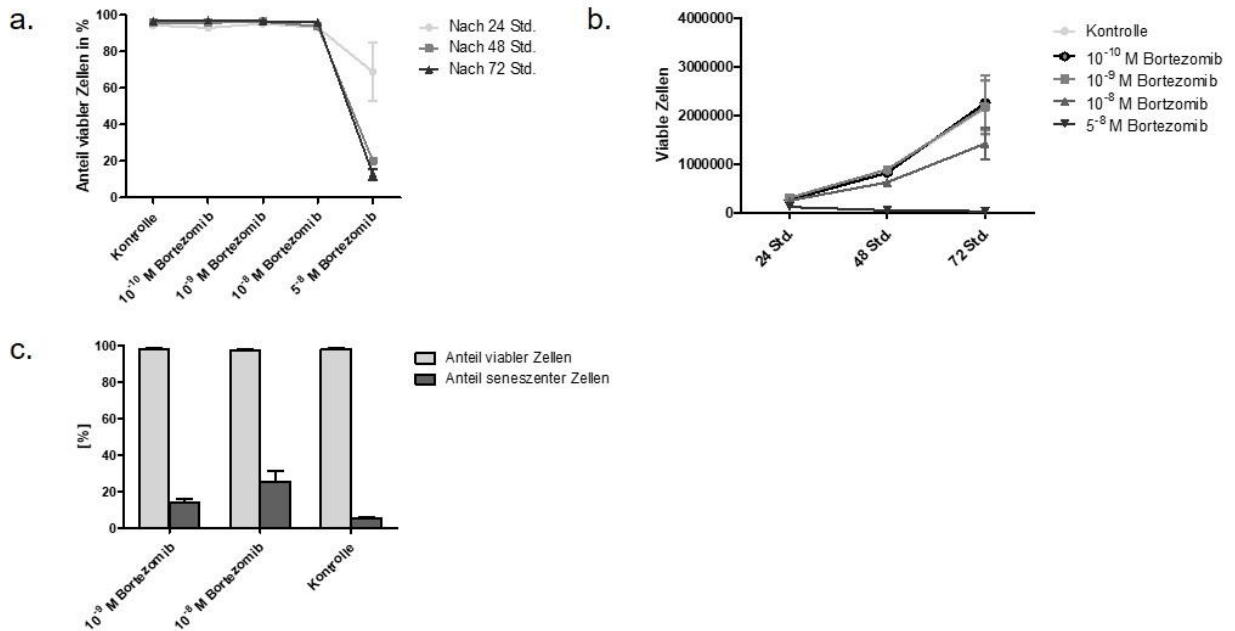
Um die Ergebnisse der histochemischen Färbung zu verifizieren und insbesondere zu quantifizieren, erfolgte die Fluoreszenz-basierte Färbung der SA- β -Gal mittels C₁₂FDG. Gleichzeitig wurden tote Zellen mittels des GhostDye Violet 450 gefärbt, um ausschließlich viable Zellen darzustellen. Hierbei konnten die Ergebnisse der histochemischen Färbung insofern bestätigt werden, als dass die Behandlung der Zelllinien K562, RC-K8 und SD-1 mit den gleichen Inhibitoren zu einem relevanten Anstieg des Anteils seneszenter Zellen führte. So führten in der Linie K562 alle eingesetzten Inhibitoren zu einem unterschiedlich hohen Anstieg des Anteils seneszenter Zellen. Die Linie RC-K8 reagierte auf alle Behandlungen außer auf die Behandlung mit Vemurafenib Anstieg des Anteils seneszenter Zellen im Vergleich zur Kontrolle, während in der Linie SD-1 die Behandlungen mit Bortezomib, Ibrutinib und Idelalisib zu keinem relevanten Anstieg seneszenter Zellen führten. In der Linie Mec1 konnte auch mittels der Fluoreszenz-basierten Färbung nach keiner der Behandlungen ein relevanter Anstieg seneszenter Zellen festgestellt werden.

K562

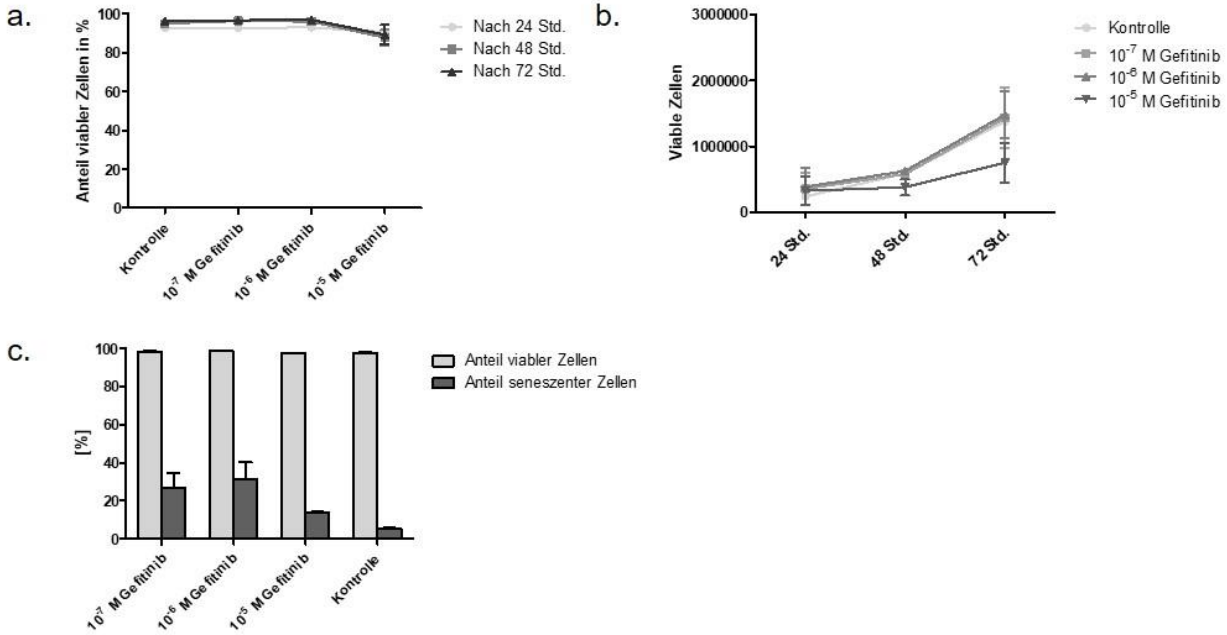
Behandlung mit ABT-199



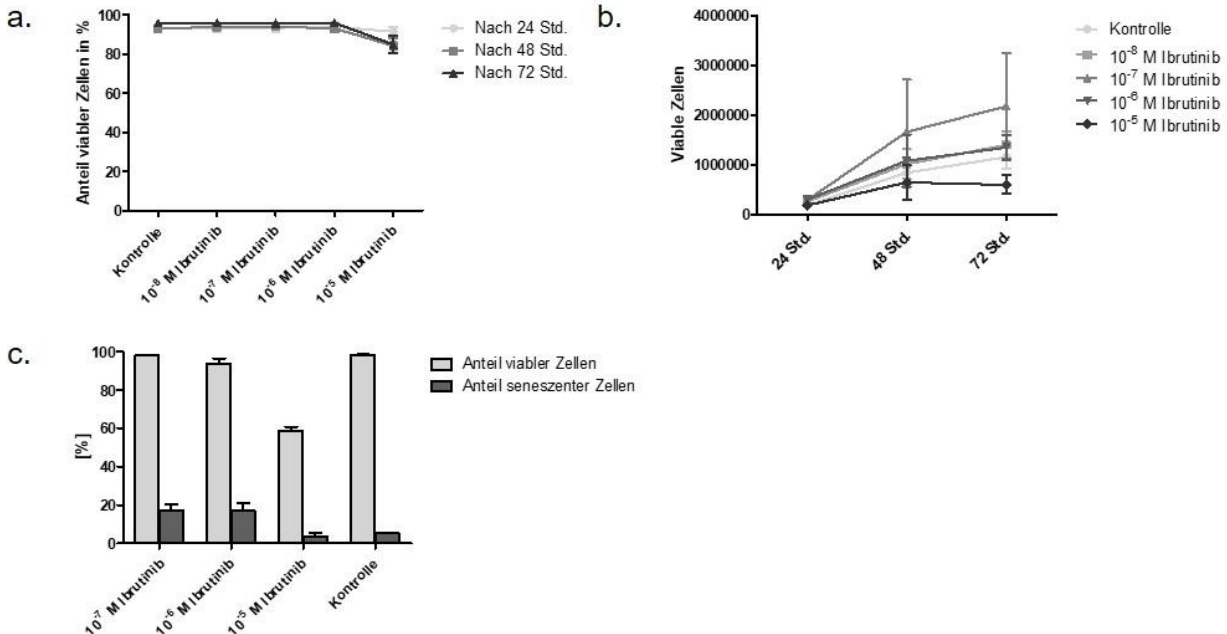
Behandlung mit Bortezomib



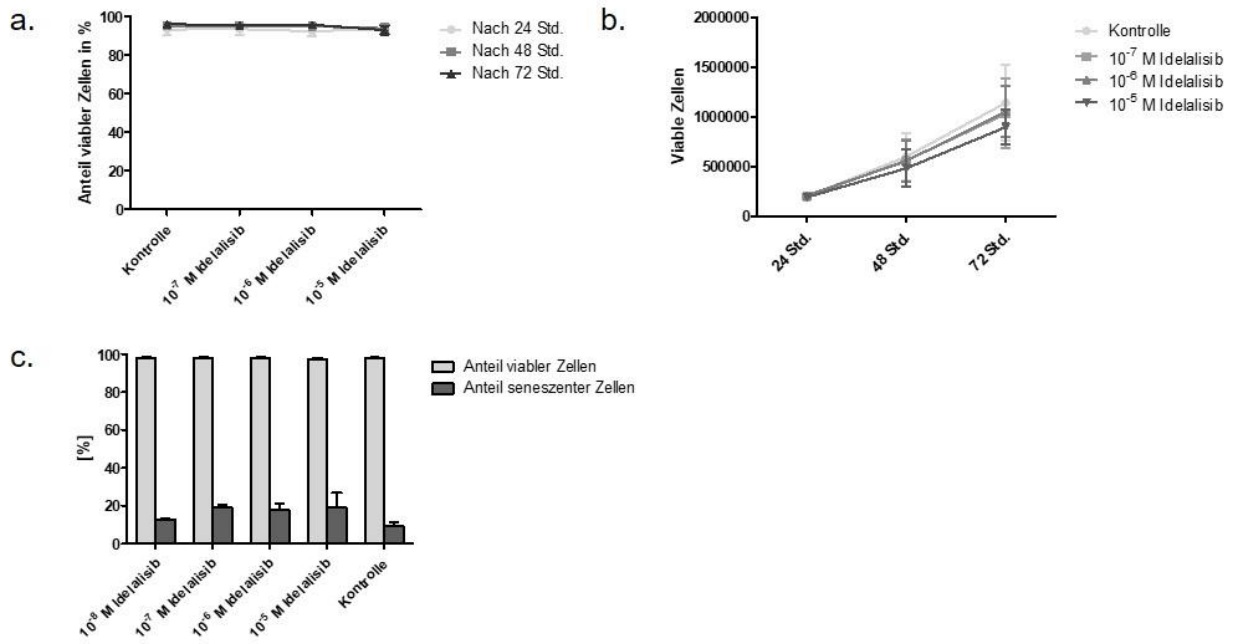
Behandlung mit Gefitinib



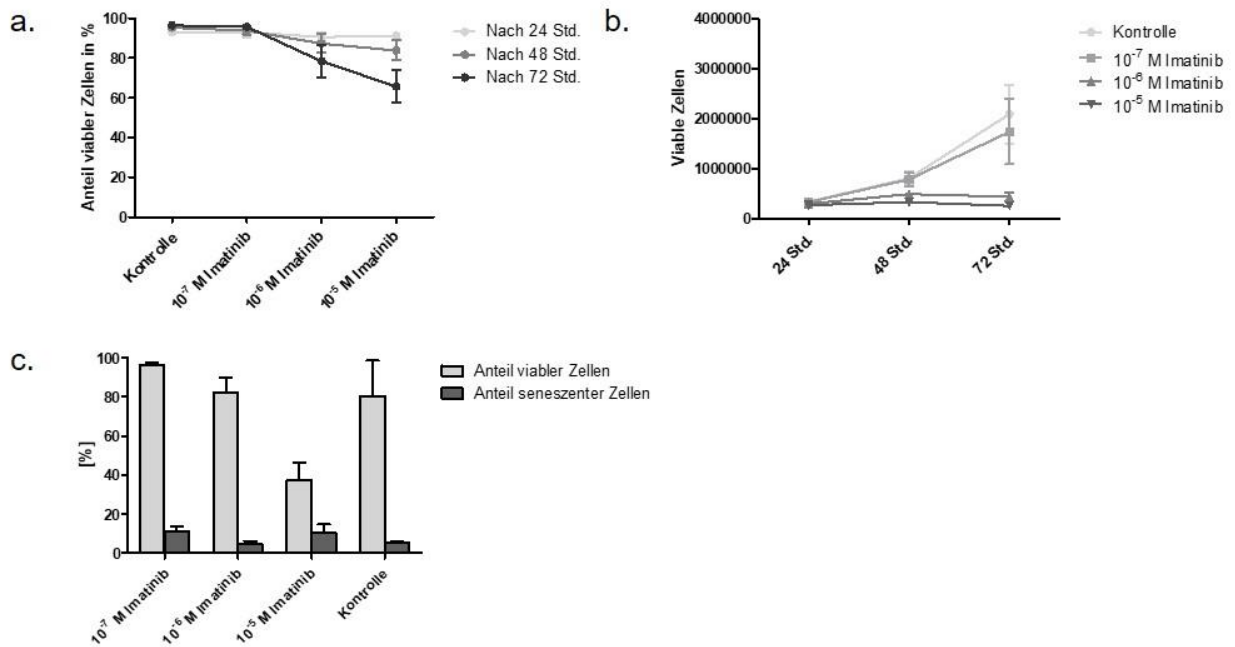
Behandlung mit Ibrutinib



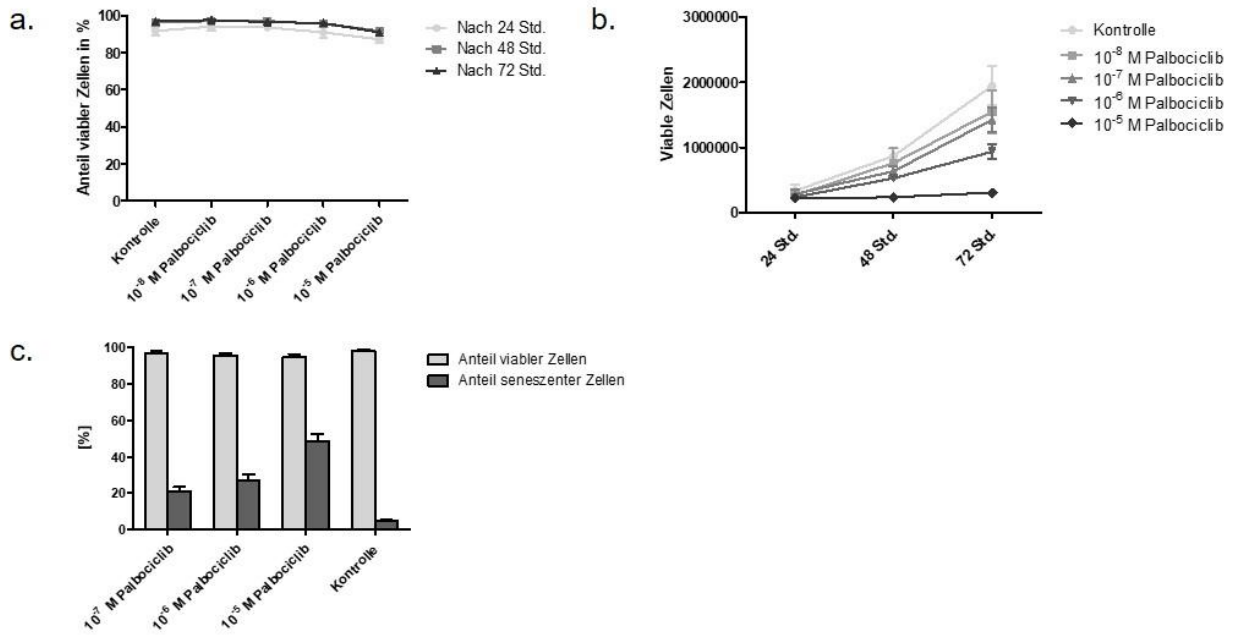
Behandlung mit Idelalisib



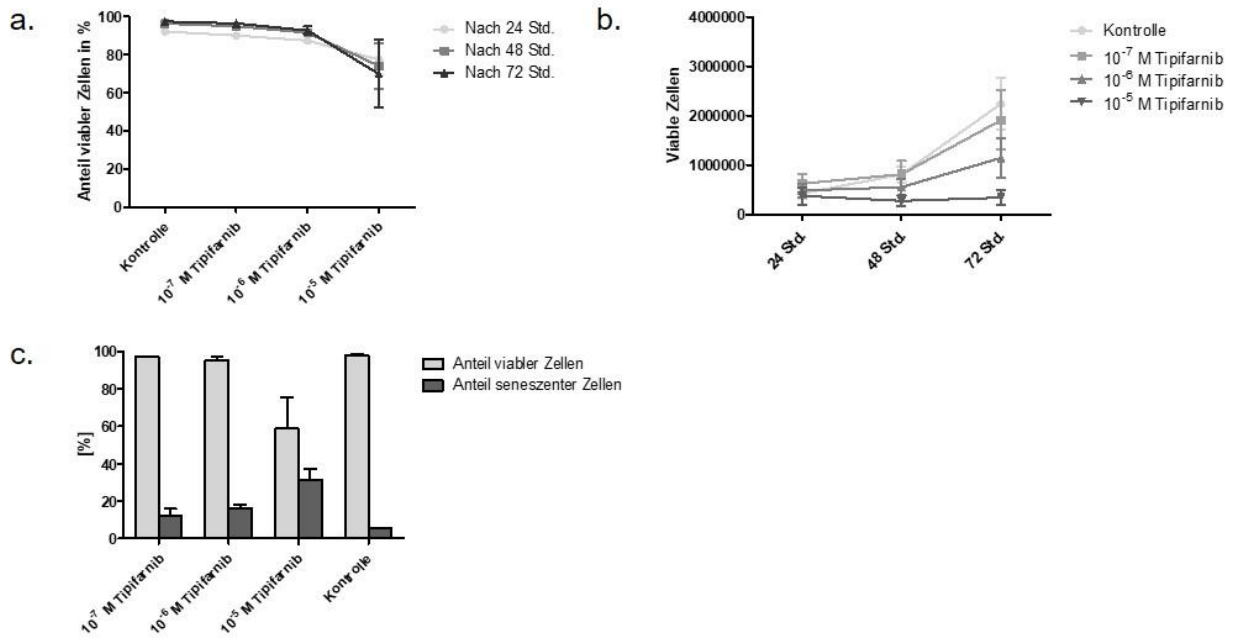
Behandlung mit Imatinib



Behandlung mit Palbociclib



Behandlung mit Tipifarnib



Behandlung mit Vemurafenib

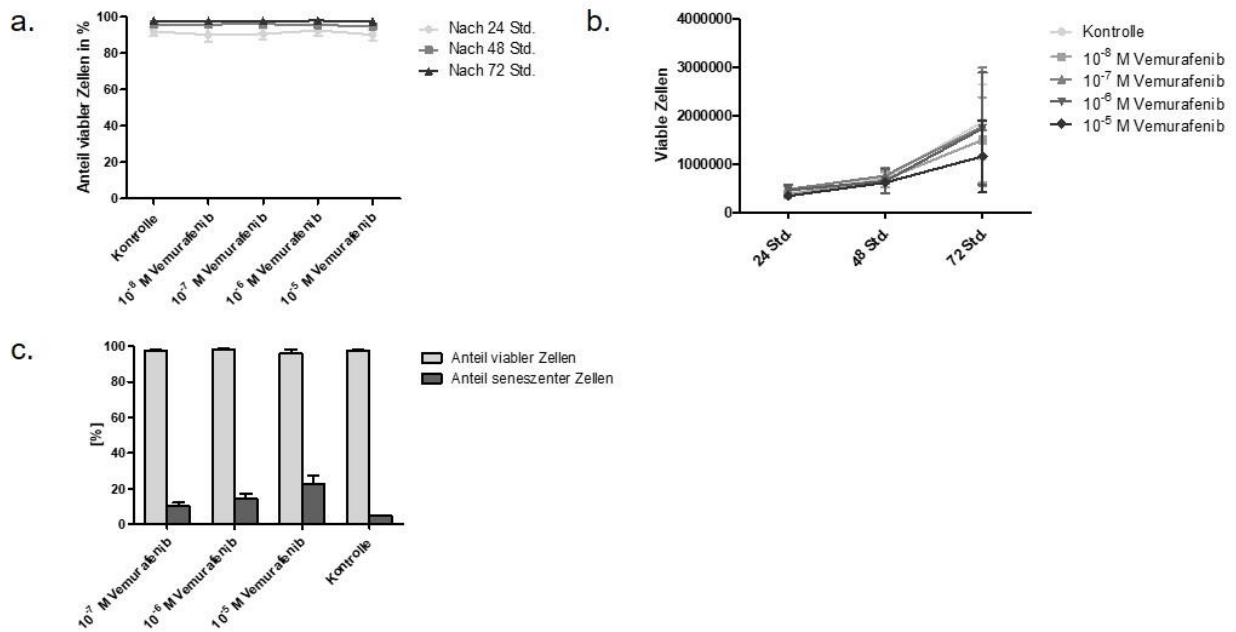
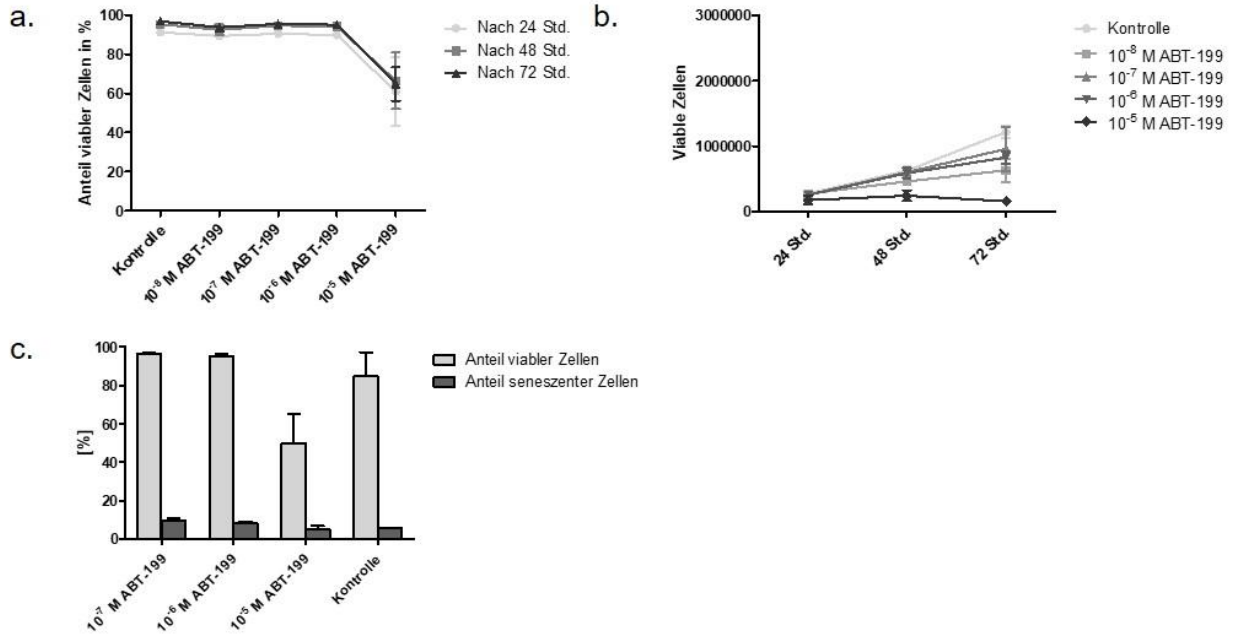


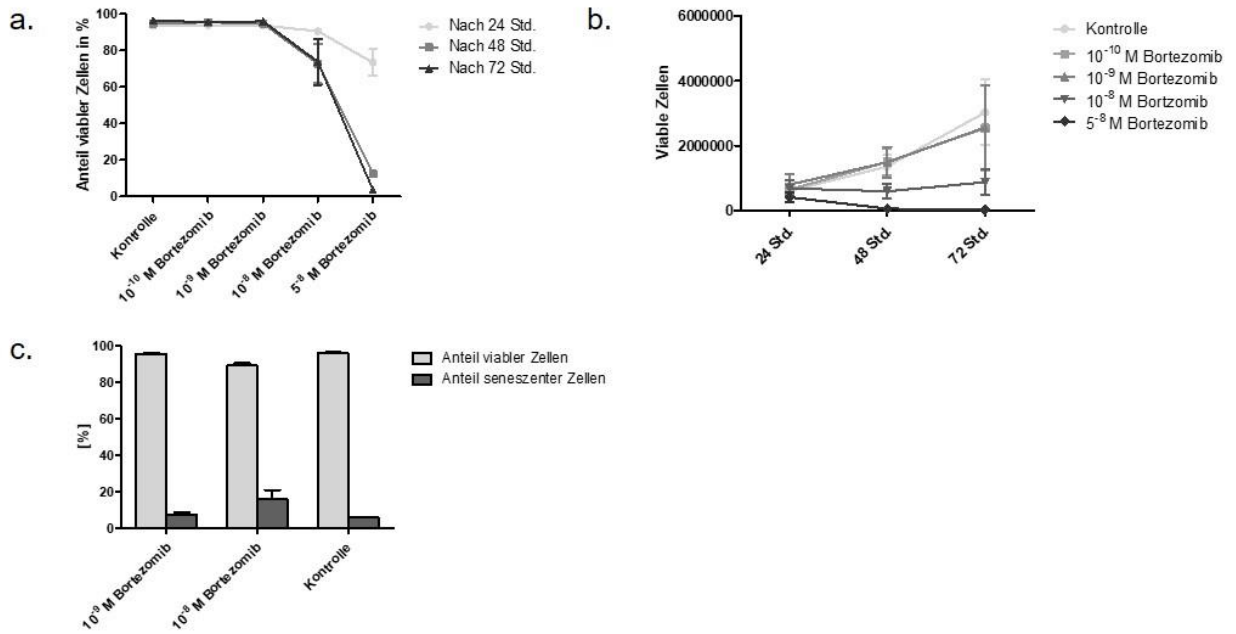
Abbildung 4. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenten Zellen nach Behandlung der Zelllinie K562 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren. a. und b. K562 Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren hinsichtlich des Anteils (a.) sowie der absoluten Zahl (b.) lebender Zellen untersucht. c. Anteil lebender Zellen sowie Anteil seneszenten Zellen in verbliebenen lebenden Zellen am sechsten Tag nach Inhibitor-Behandlung. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

RC-K8

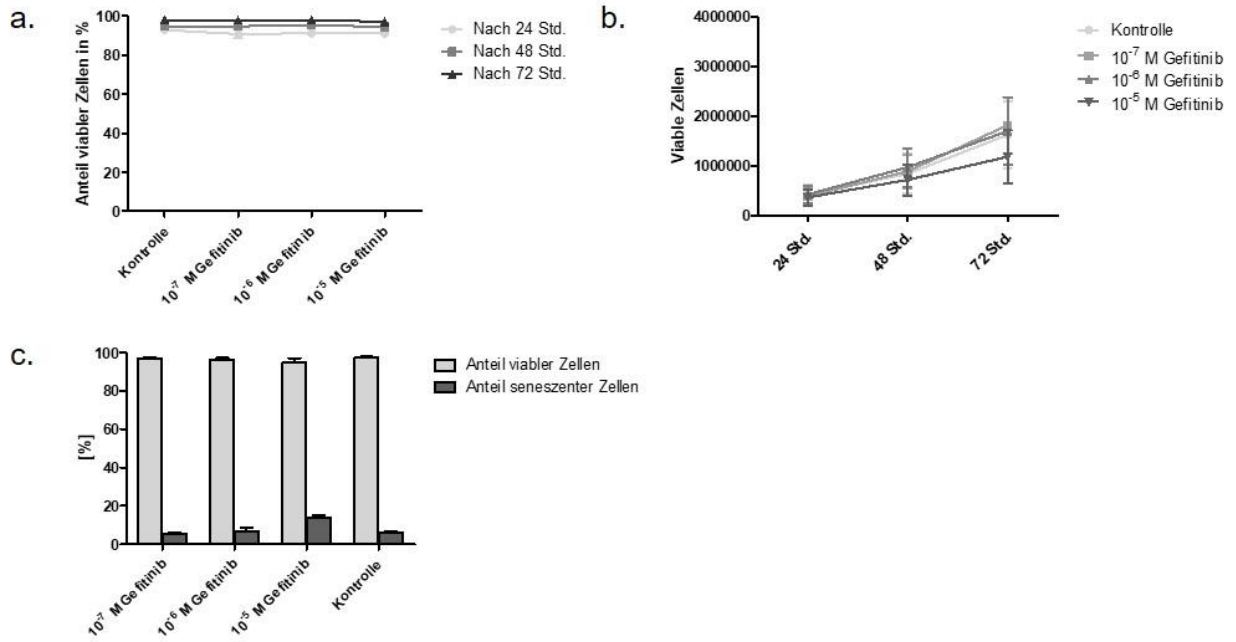
Behandlung mit ABT-199



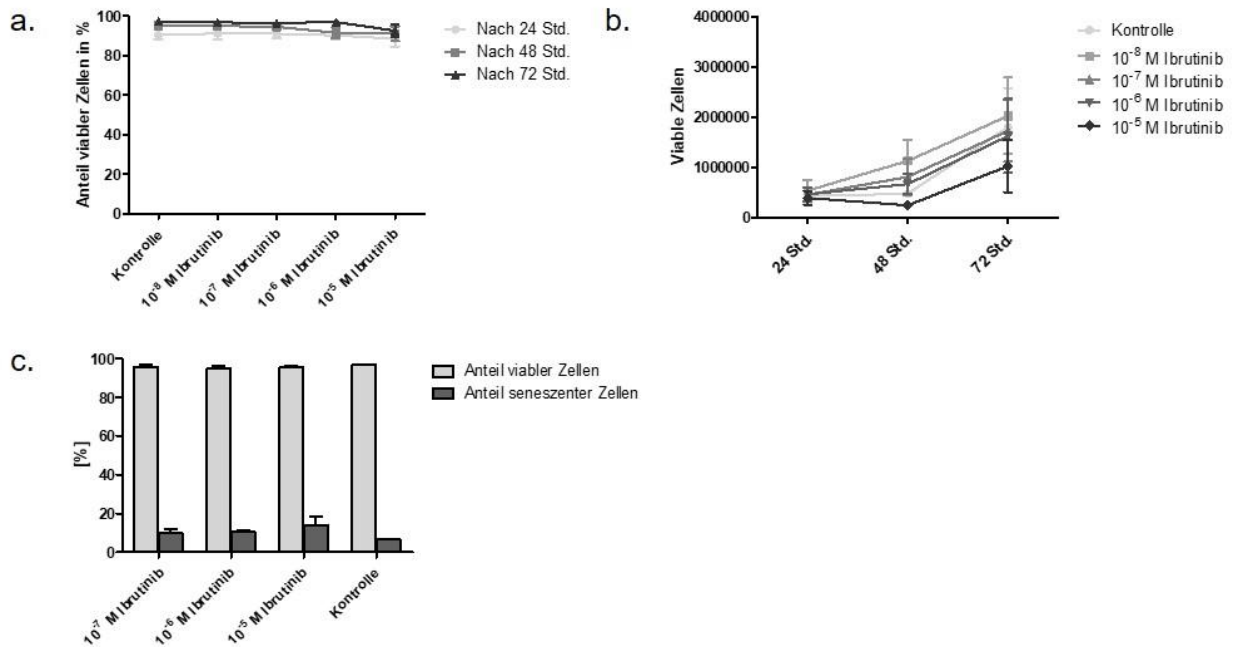
Behandlung mit Bortezomib



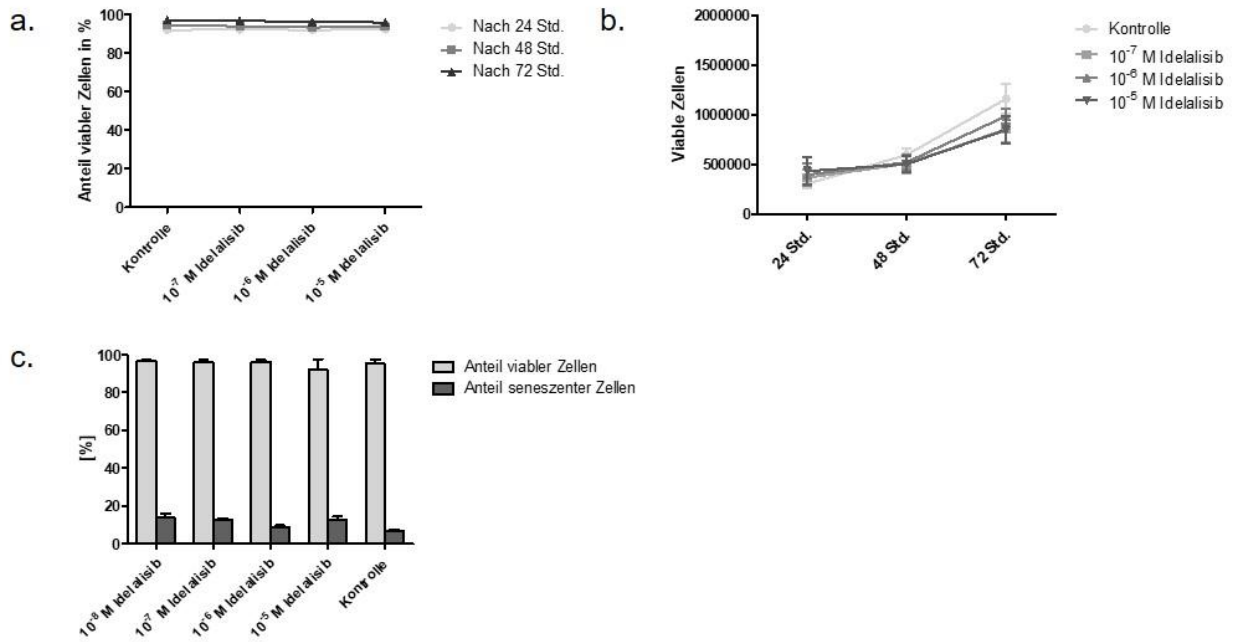
Behandlung mit Gefitinib



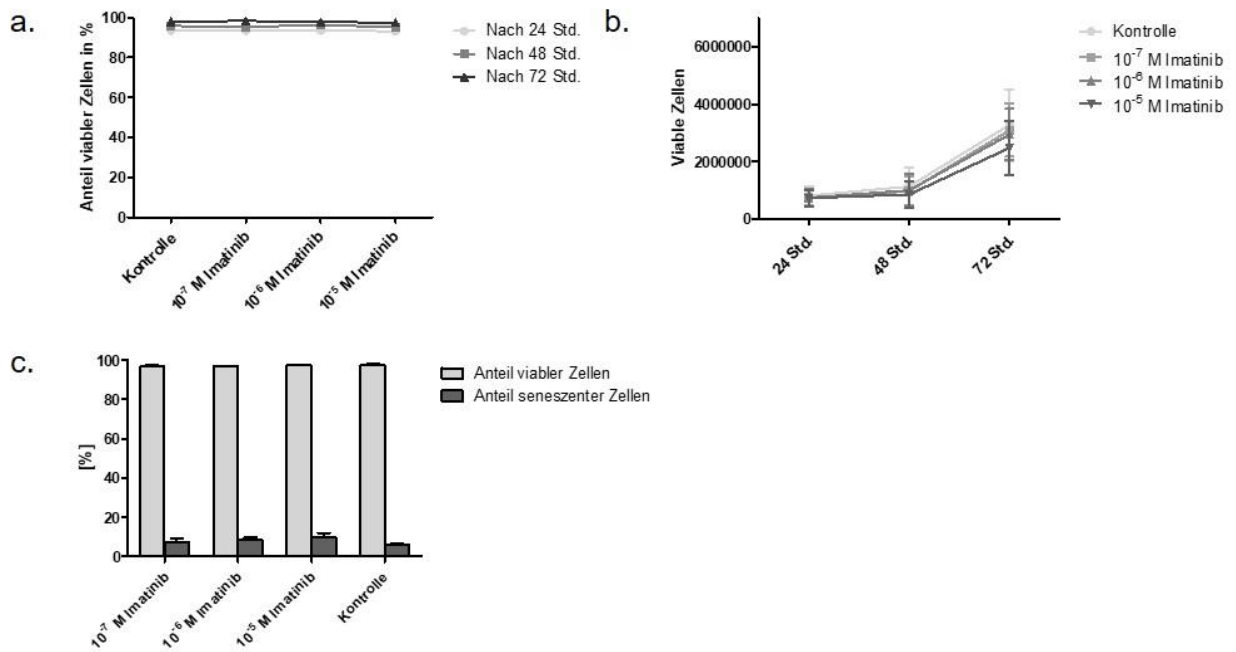
Behandlung mit Ibrutinib



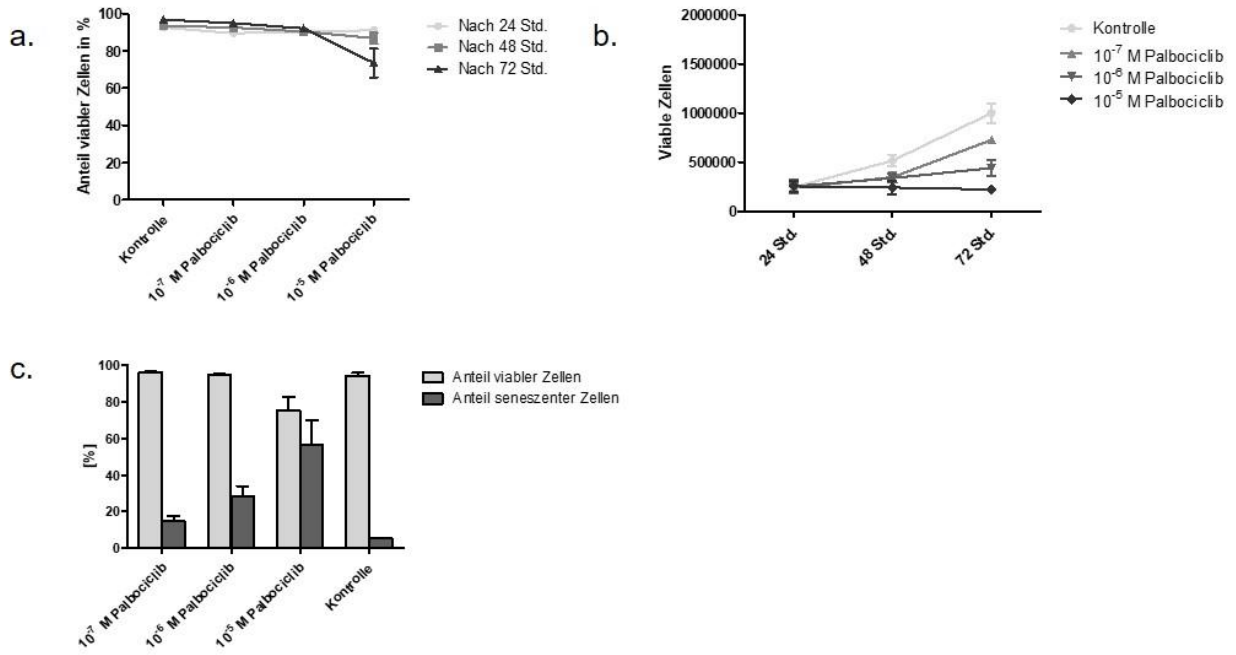
Behandlung mit Idelalisib



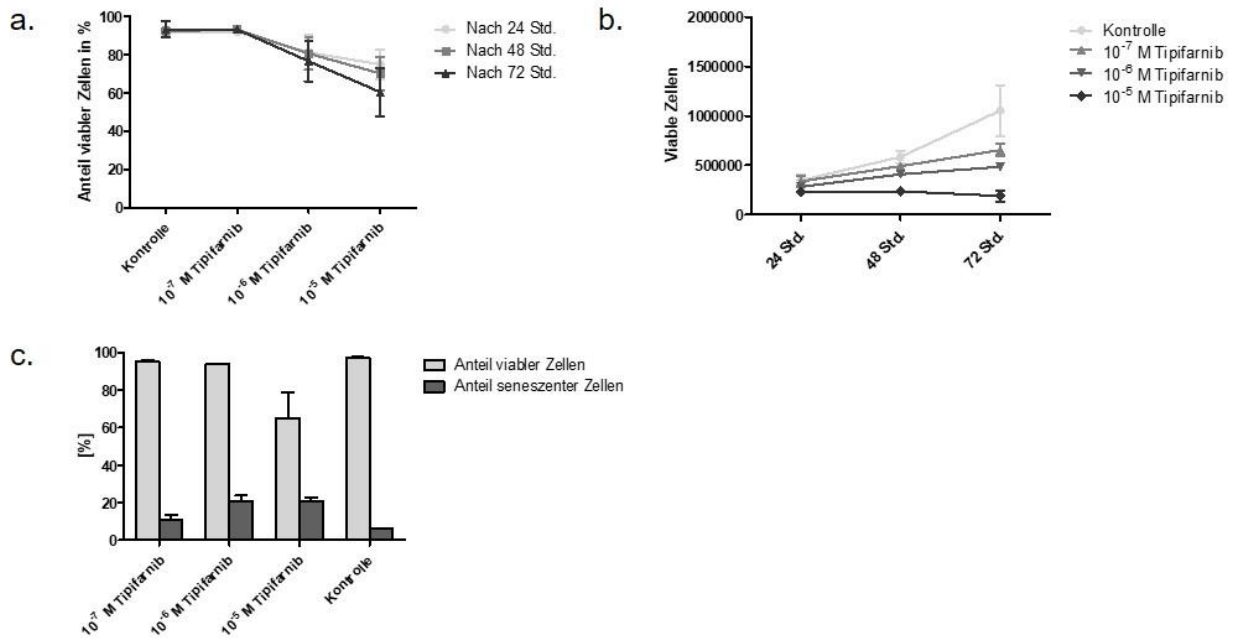
Behandlung mit Imatinib



Behandlung mit Palbociclib



Behandlung mit Tipifarnib



Behandlung mit Vemurafenib

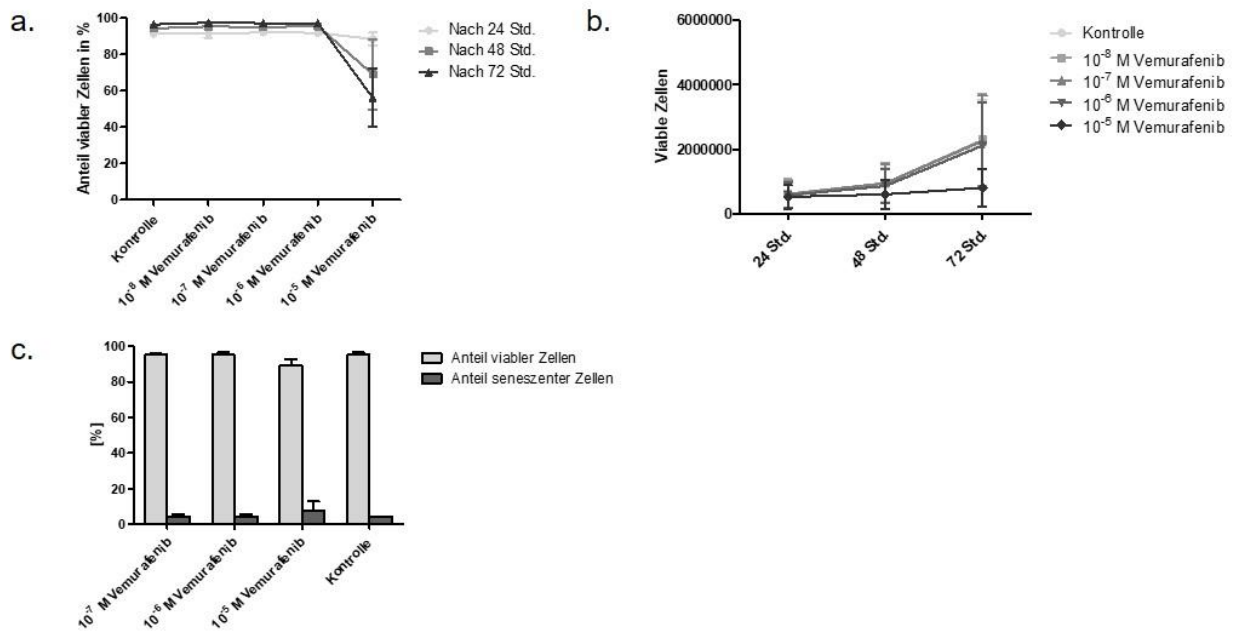
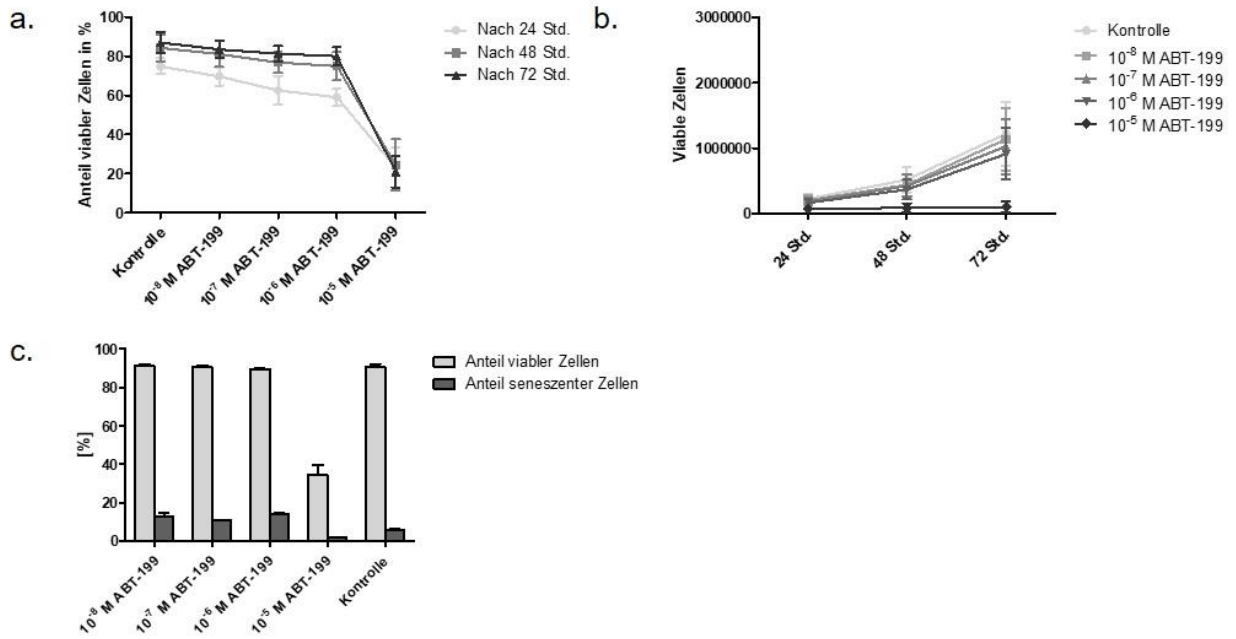


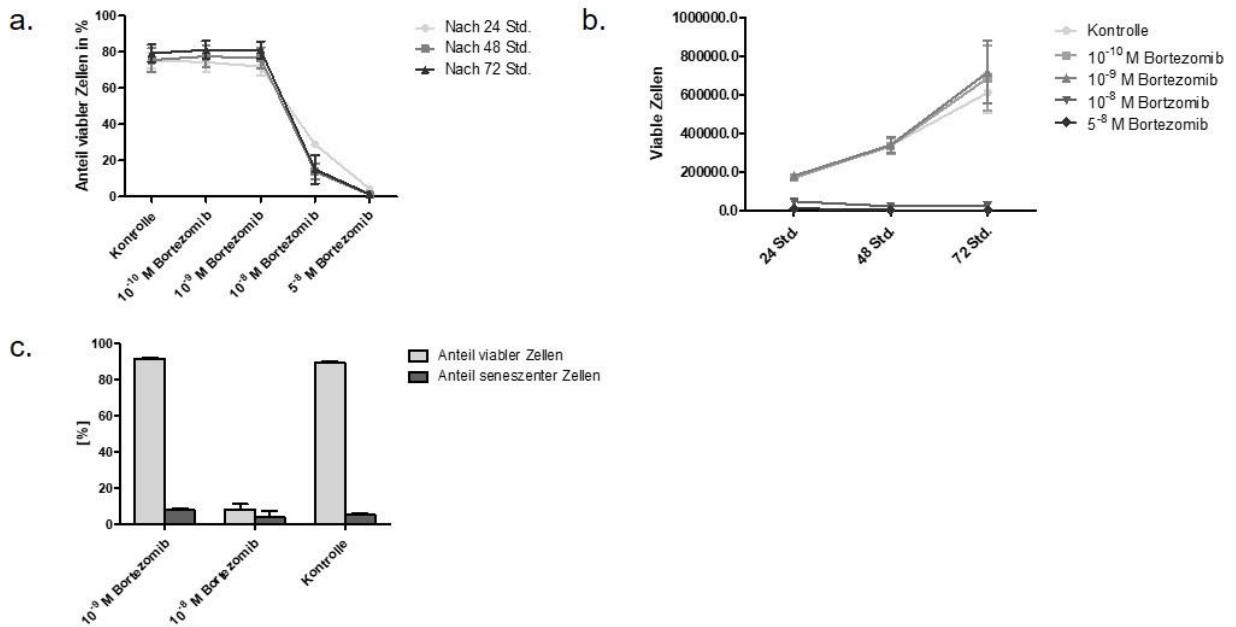
Abbildung 5. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenten Zellen nach Behandlung der Zelllinie RC-K8 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren. a. und b. RC-K8 Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren hinsichtlich des Anteils (a.) sowie der absoluten Zahl (b.) lebender Zellen untersucht. c. Anteil lebender Zellen sowie Anteil seneszenten Zellen in verbliebenen lebenden Zellen am sechsten Tag nach Inhibitor-Behandlung. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

SD-1

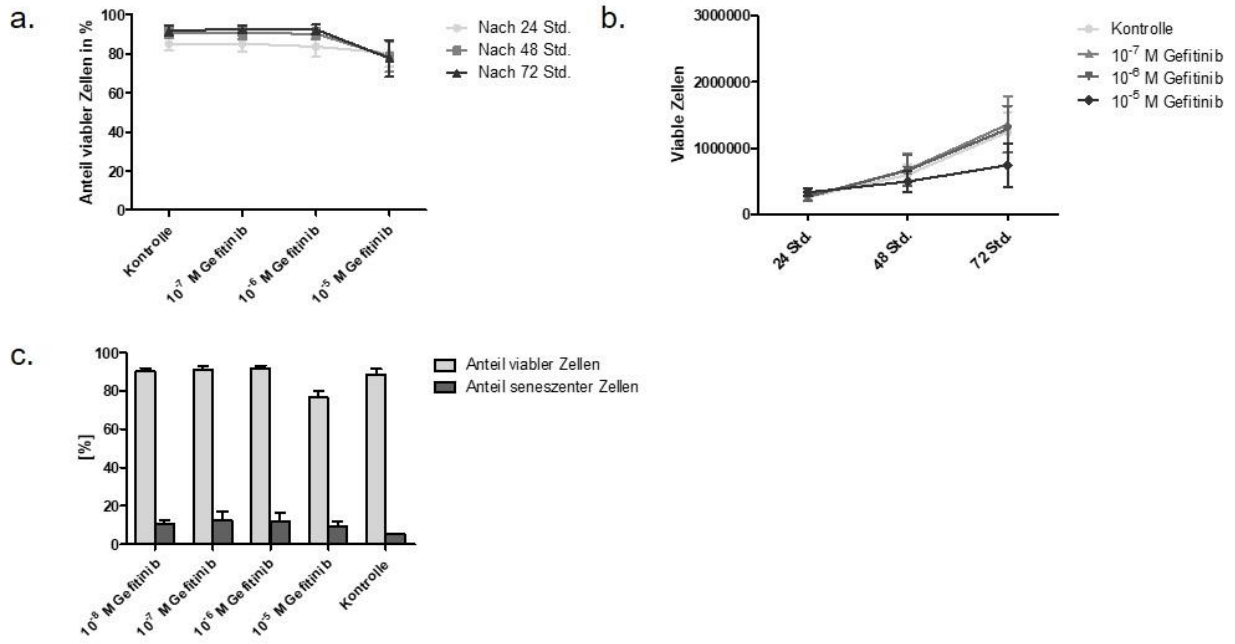
Behandlung mit ABT-199



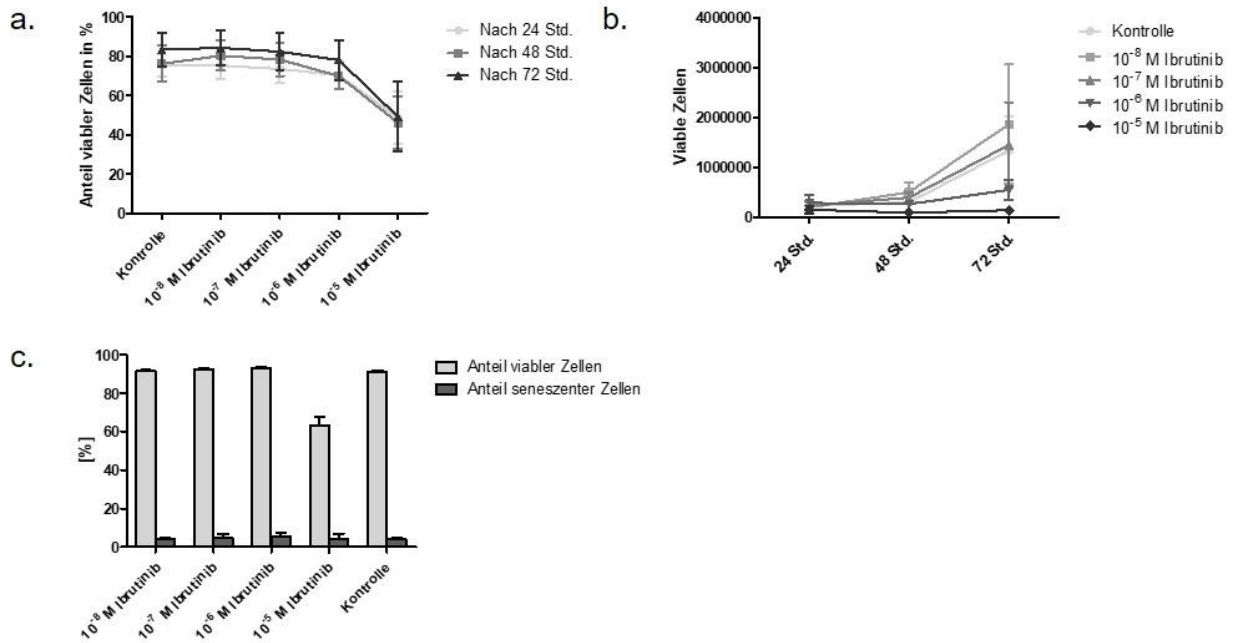
Behandlung mit Bortezomib



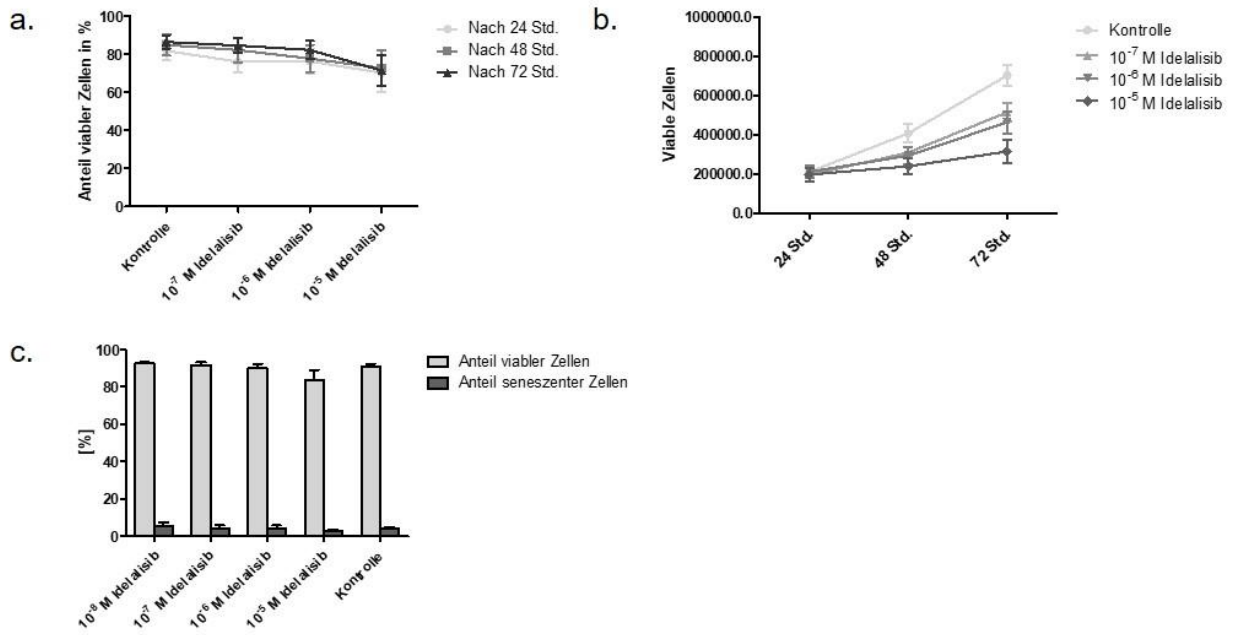
Behandlung mit Gefitinib



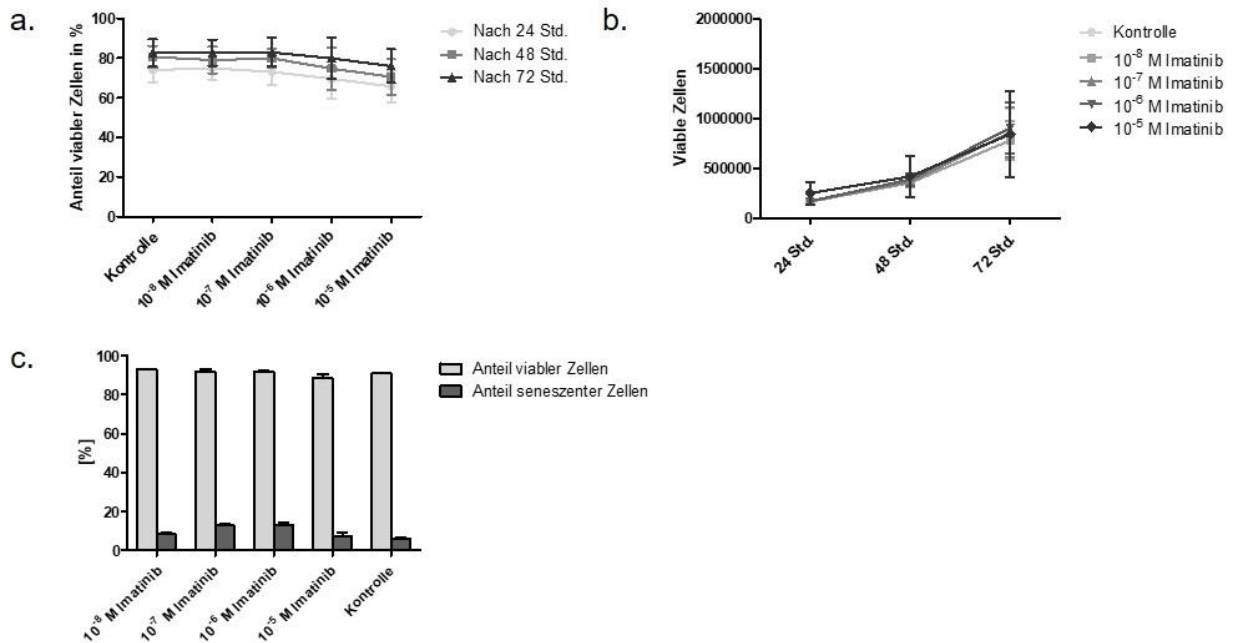
Behandlung mit Ibrutinib



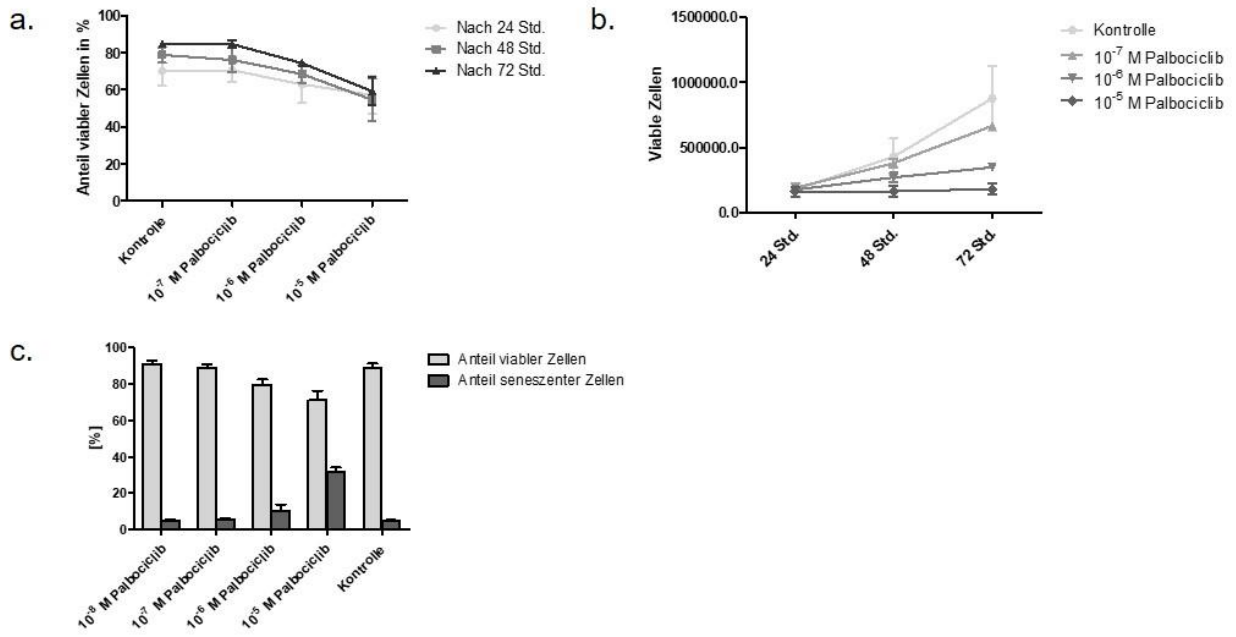
Behandlung mit Idelalisib



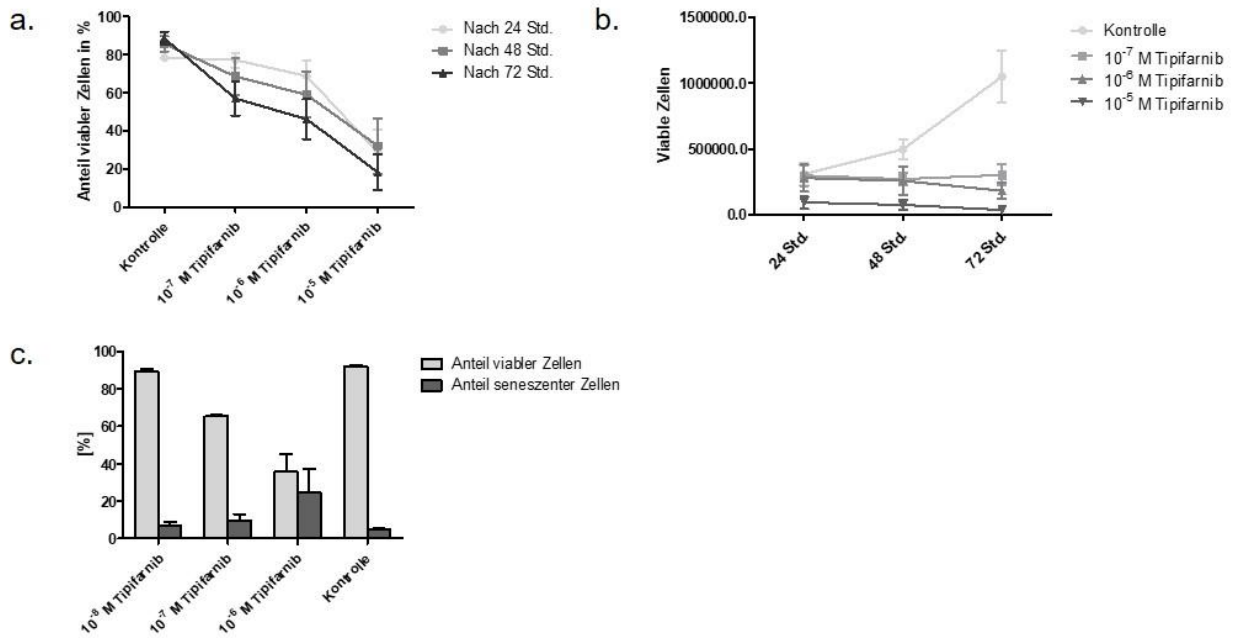
Behandlung mit Imatinib



Behandlung mit Palbociclib



Behandlung mit Tipifarnib



Behandlung mit Vemurafenib

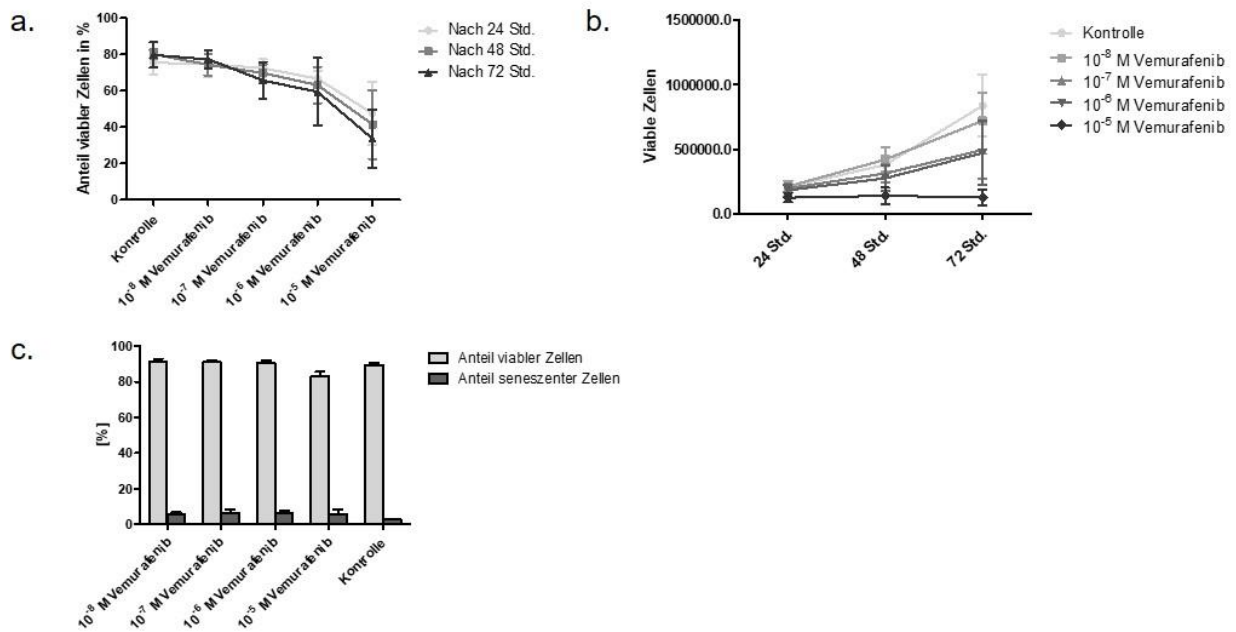
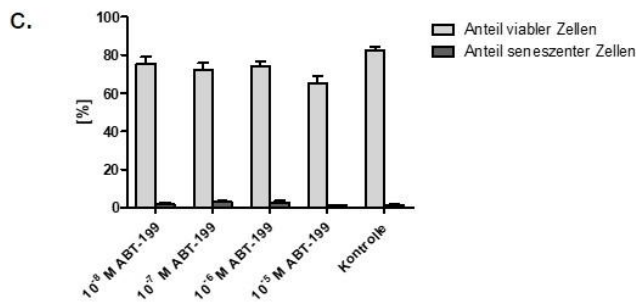
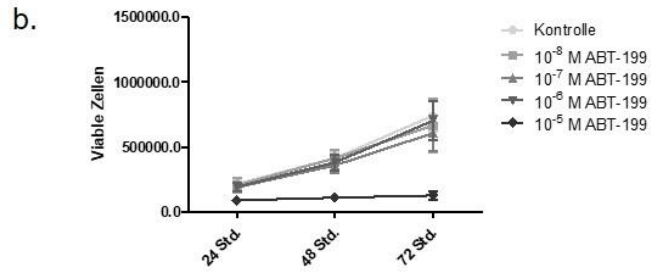
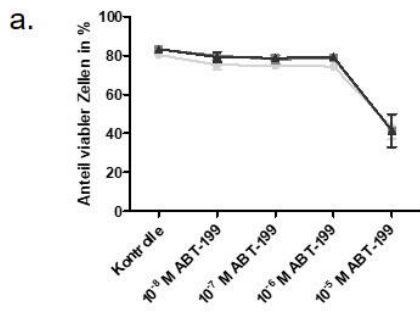


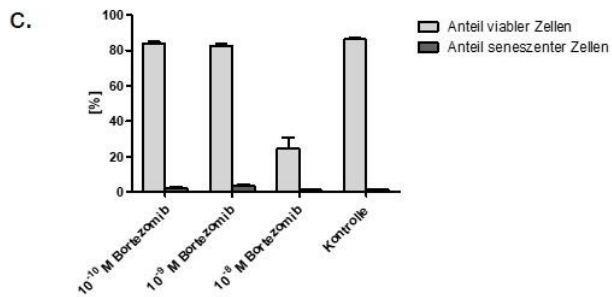
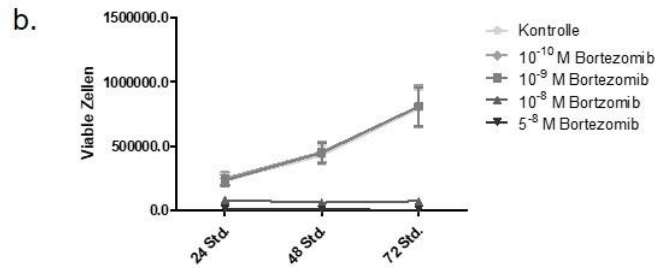
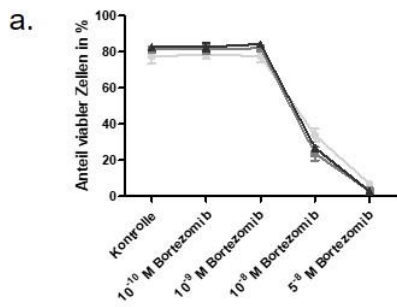
Abbildung 6. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenten Zellen nach Behandlung der Zelllinie SD-1 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren. a. und b. SD-1 Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren hinsichtlich des Anteils (a.) sowie der absoluten Zahl (b.) lebender Zellen untersucht. c. Anteil lebender Zellen sowie Anteil seneszenten Zellen in verbliebenen lebenden Zellen am sechsten Tag nach Inhibitor-Behandlung. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Mec1

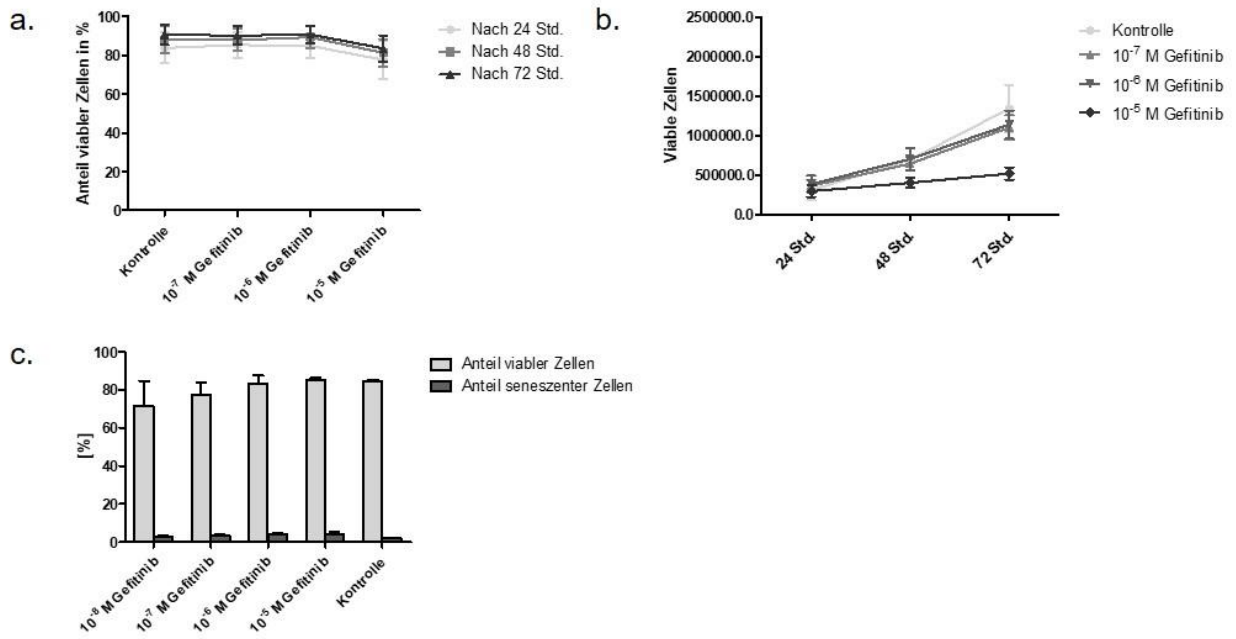
Behandlung mit ABT-199



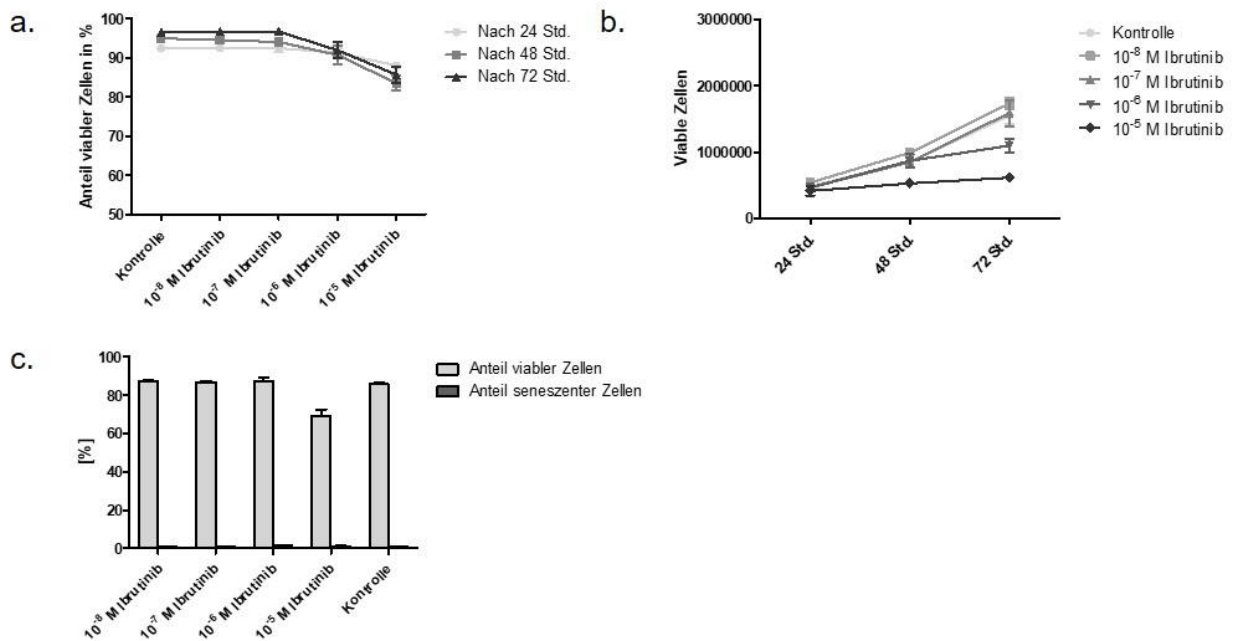
Behandlung mit Bortezomib



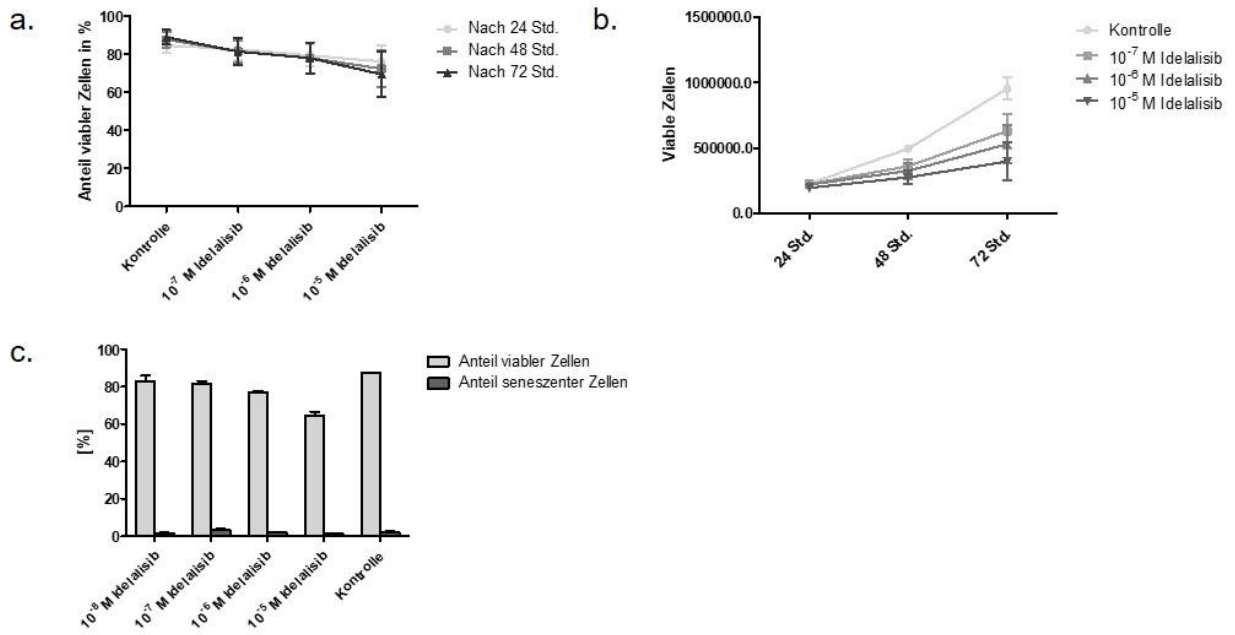
Behandlung mit Gefitinib



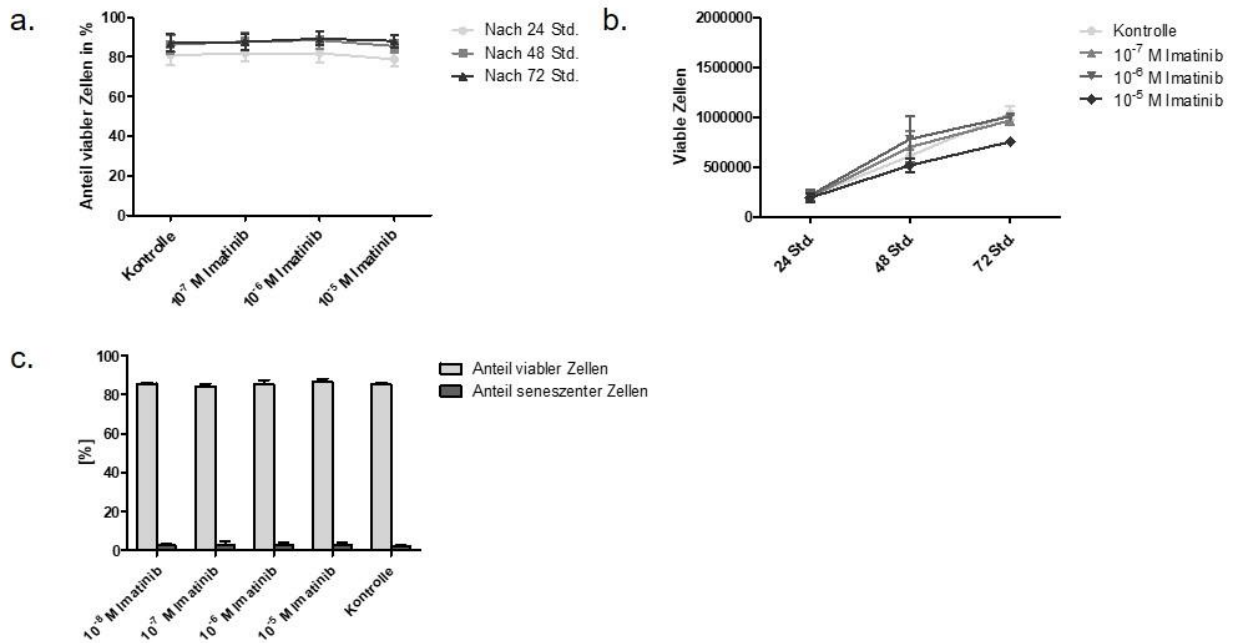
Behandlung mit Ibrutinib



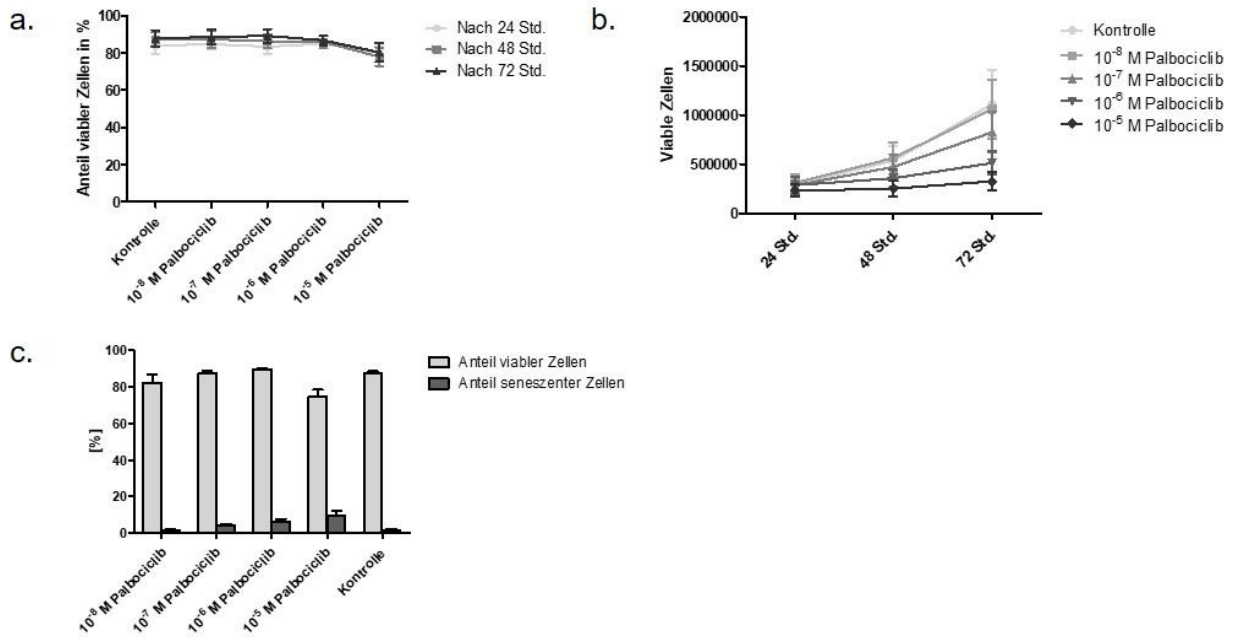
Behandlung mit Idelalisib



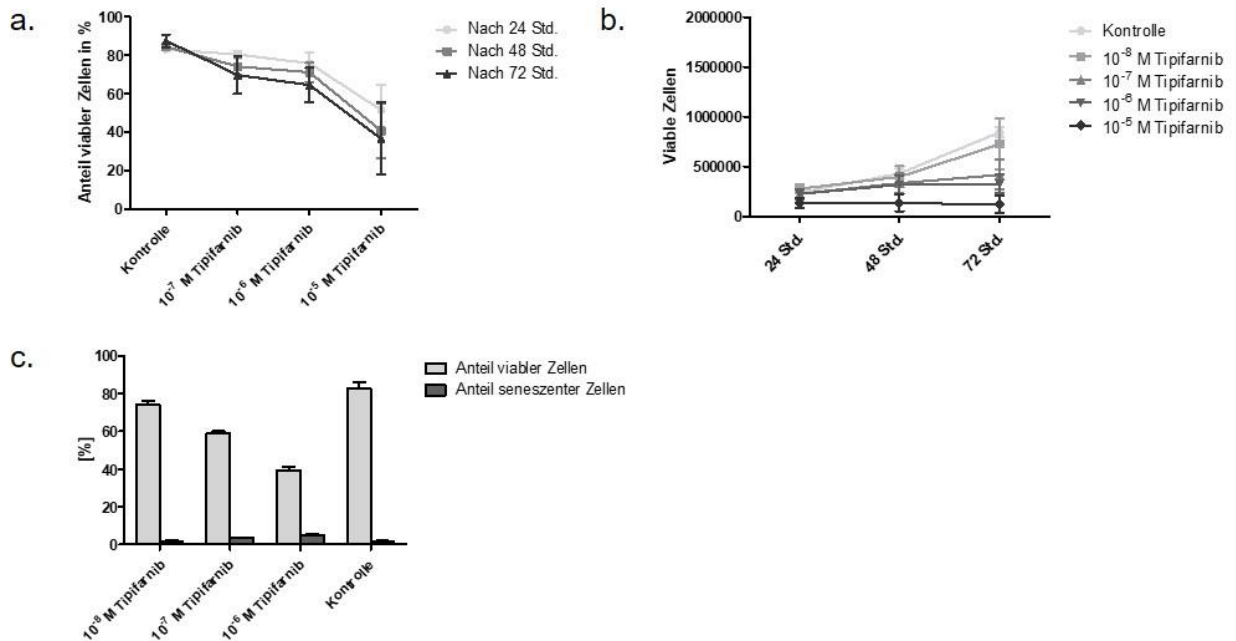
Behandlung mit Imatinib



Behandlung mit Palbociclib



Behandlung mit Tipifarnib



Behandlung mit Vemurafenib

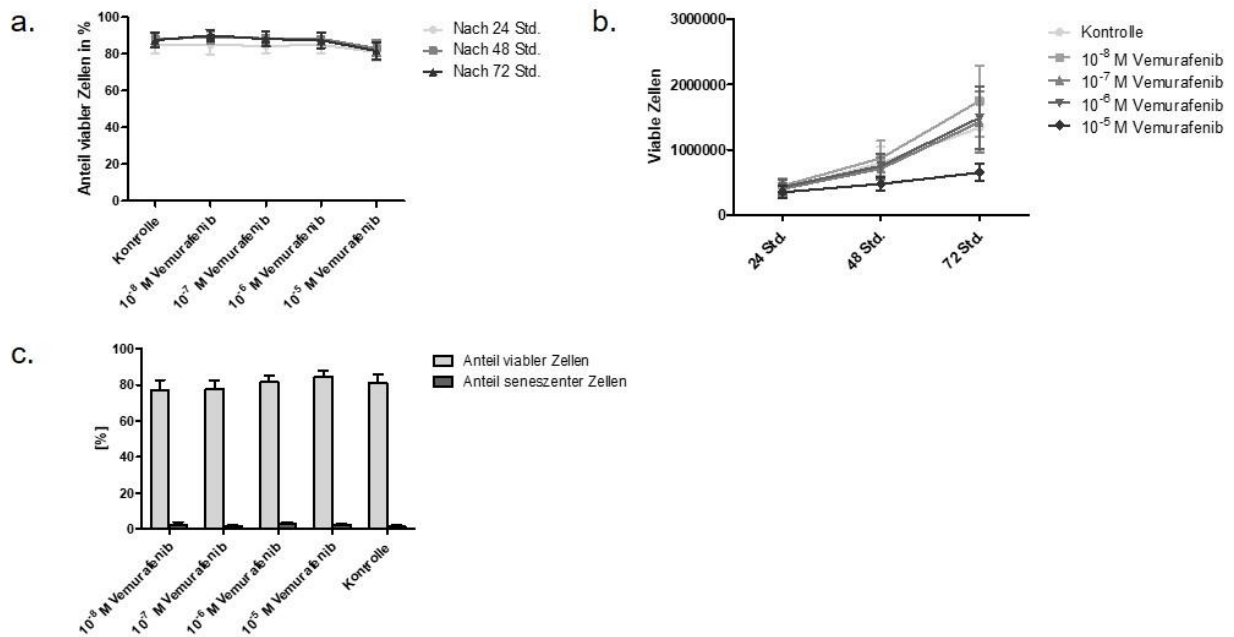
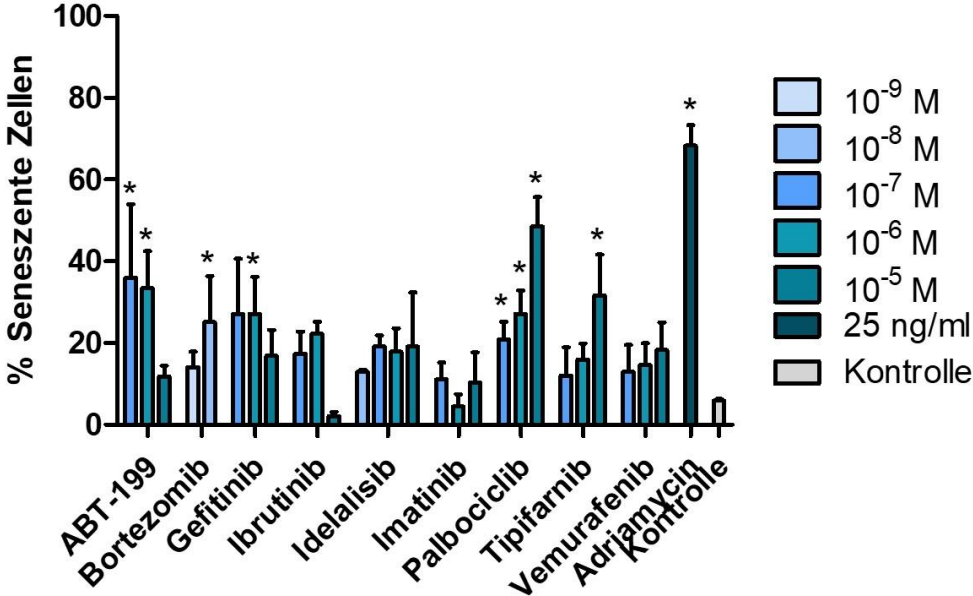


Abbildung 7. Viabilitäts- und Wachstumskurven sowie Anteil seneszenten Zellen nach Behandlung der Zelllinie Mec1 mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren. a. und b. Mec1 Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren hinsichtlich des Anteils (a.) sowie der absoluten Zahl (b.) lebender Zellen untersucht. c. Anteil lebender Zellen sowie Anteil seneszenten Zellen in verbliebenen lebenden Zellen am sechsten Tag nach Inhibitor-Behandlung. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

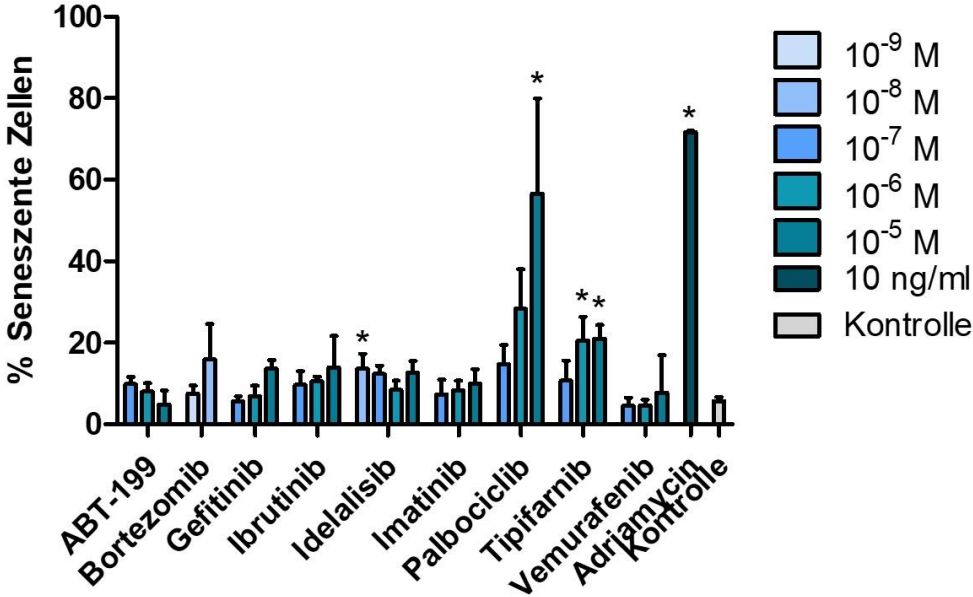
In allen Seneszenz-fähigen Zelllinien führte die Adriamycin-Behandlung zum höchsten Anteil seneszenten Zellen. Unter den Inhibitoren führte die Behandlung mit 10^{-5} M des CDK4/CDK6-Inhibitors Palbociclib ebenfalls in allen Seneszenz-fähigen Zelllinien zum höchsten Anstieg des Anteils seneszenten Zellen. In der Zelllinie K562 konnte auch nach Behandlung mit 10^{-7} M und 10^{-6} M ABT-199, 10^{-8} M Bortezomib, 10^{-7} M und 10^{-6} M Gefitinib, 10^{-7} M und 10^{-6} M Palbociclib sowie 10^{-5} M Tipifarnib ein Anteil von über 20% seneszenten Zellen gezeigt werden. Bis auf den Anstieg nach Behandlung mit 10^{-7} M Gefitinib waren diese Veränderung statistisch signifikant. In den Zelllinien RC-K8 und SD-1 war ein solcher Anteil seneszenten Zellen neben der Behandlung mit Palbociclib auch nach der Behandlung mit 10^{-6} M Tipifarnib nachweisbar. In der Zelllinie SD-1 war dieser

Anstieg seneszenten Zellen im Gegensatz zu der Zelllinie RC-K8 jedoch statistisch nicht signifikant (s. Abb. 8).

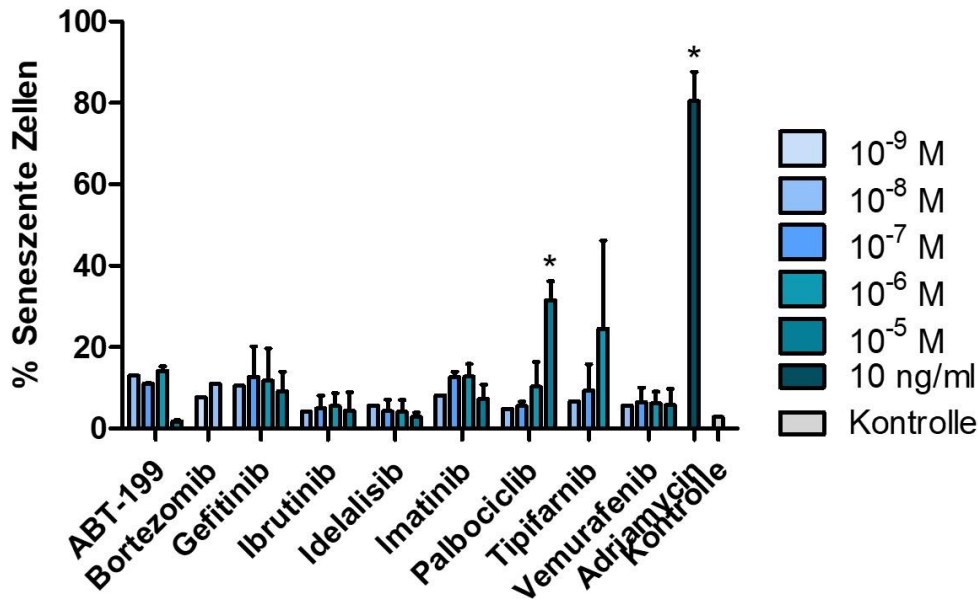
K562 SA-β-Gal-Färbung



RC-K8 SA-β-Gal Färbung



SD-1 SA-β-Gal Färbung



Mec1 SA-β-Gal-Färbung

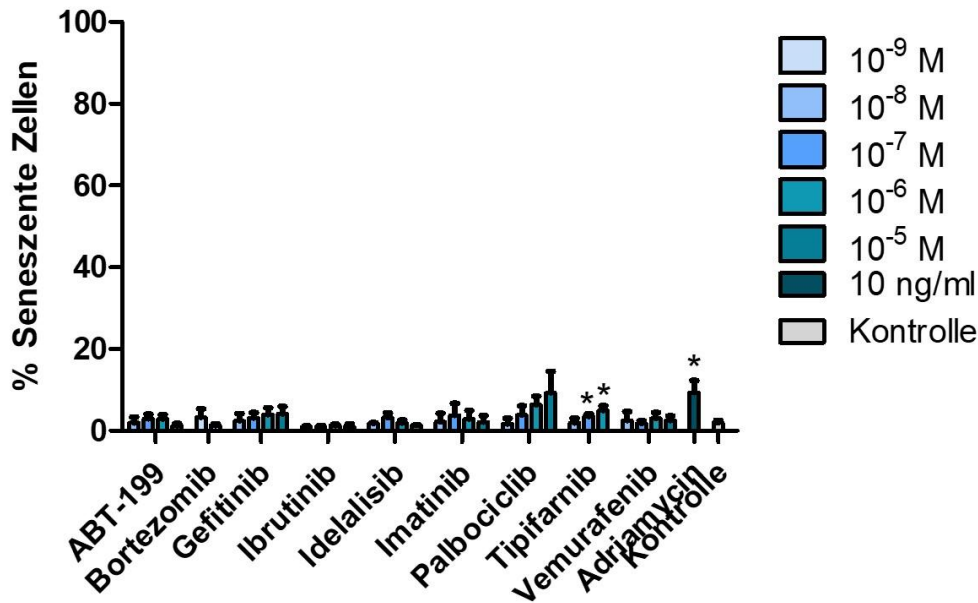


Abbildung 8. Fluoreszenz-basierte SA-β-Gal-Färbung der Zelllinien K562, RC-K8, SD-1 und Mec1 nach sechs Tagen. Darstellung des SA-β-Gal-positiven Anteils der behandelten Zellpopulationen am sechsten Tag nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Inhibitoren im Vergleich mit einer mit Adriamycin behandelten Zellpopulation sowie einer unbehandelten Zellpopulation. Die Balken zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der SA-β-Gal-positiven Anteile in verbliebenen

viablen Zellen an (n=3). Die mit * markierten Balken zeigen statistisch relevante Ergebnisse ($p < 0,05$).

4.3 Erhöhte Expression von SASP- und Stemness-Genen nach Adriamycin-Behandlung

Nach dreitägiger Behandlung mit Adriamycin zeigten alle drei untersuchten Seneszenz-fähigen Zelllinien (K562, RC-K8, SD-1) einen Anstieg der Genexpression diverser SASP- und Stemness-Gene am sechsten Tag nach Behandlung. In der Linie K562 stieg die Expression der SASP-Gene Biglykan, Decorin, CCL2, GM-CSF, IL-1A, IL-6 und IL-8 sowie die Expression der Stemness-Gene CD34, CD44, CD133, CD150, ABCG2 und LGR5 relevant an. Hier wurde ein relevanter Anstieg als eine Verdopplung der Genexpression definiert. In der Linie RC-K8 stieg die Expression der SASP-Gene Decorin, CCL2, IL-1A und IL-6 relevant an sowie die Expression der Stemness-Gene CD44 und CD133. In der Linie SD-1 stieg die Expression der SASP-Gene Biglykan, CCL1, GM-CSF und IL-6 sowie der Stemness-Gene CD44 und CD150 relevant an (s. Abb. 9).

4.4 Gering erhöhte Expression von SASP-Genen nach Seneszenzauslösung durch zielgerichtete Therapien

Die am sechsten Tag nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführte qPCR zeigte nach Auslösung von Seneszenz in allen drei Seneszenz-fähigen Zelllinien ebenfalls einen Anstieg der untersuchten SASP-Gene. Auffällig war hierbei, dass der Farnesyltransferase-Inhibitor Tipifarnib in allen drei Zelllinien zum höchsten Anstieg der Expression von SASP-Genen führte. Andere Inhibitoren, die zwar Seneszenz in den Zelllinien ausgelöst hatten, führten zu keinerlei Anstieg der SASP-Genexpression. So konnte nach Idelalisib-Behandlung weder in der Zelllinie K562 noch in der Linie RC-K8 ein relevanter SASP-Anstieg gezeigt werden (s. Abb. 9a). Nach Normalisierung des Genexpressionsanstiegs auf den Anteil seneszenten Zellen zeigten sich hier zum Teil mit Adriamycin vergleichbare Anstiege der Genexpression (s. Abb. 9b).

4.5 Seneszenzauslösung durch zielgerichtete Therapien führt zu Anstieg der Expression von Stemness-Genen

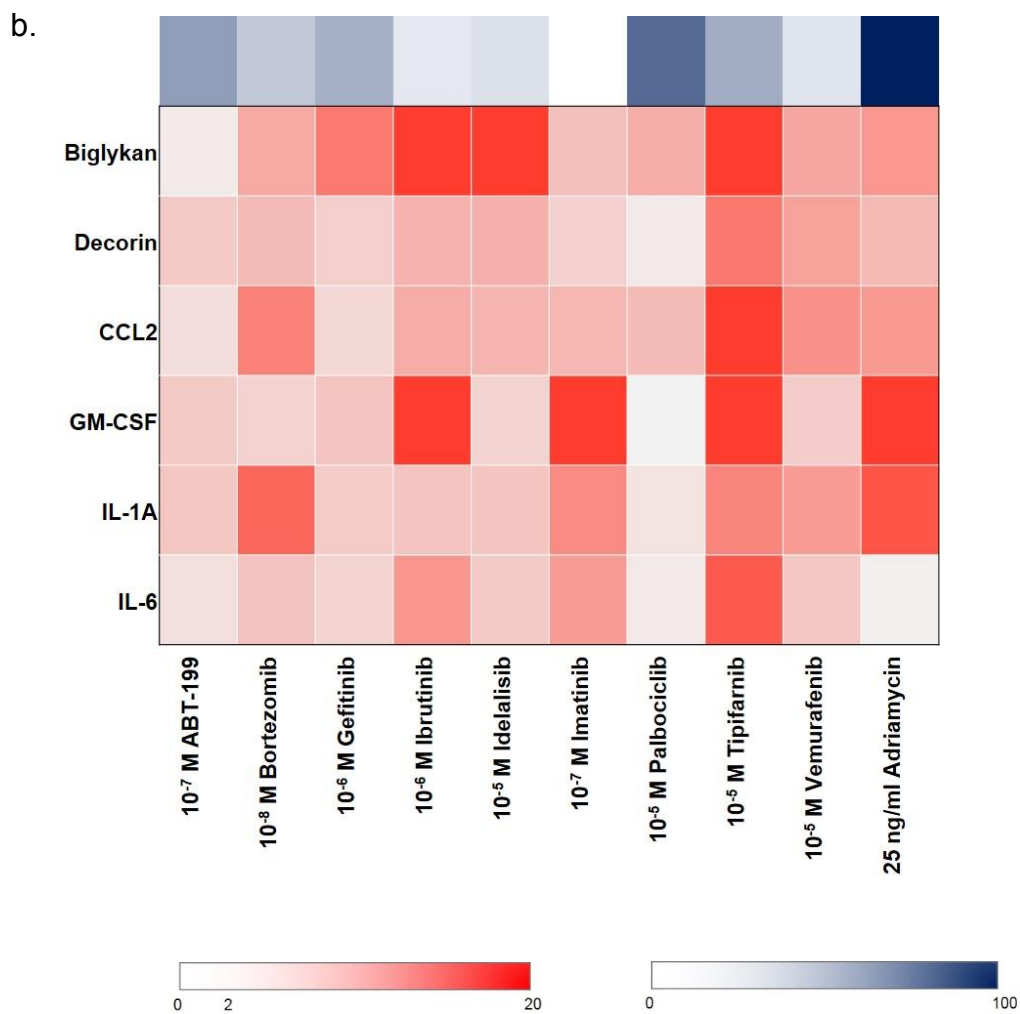
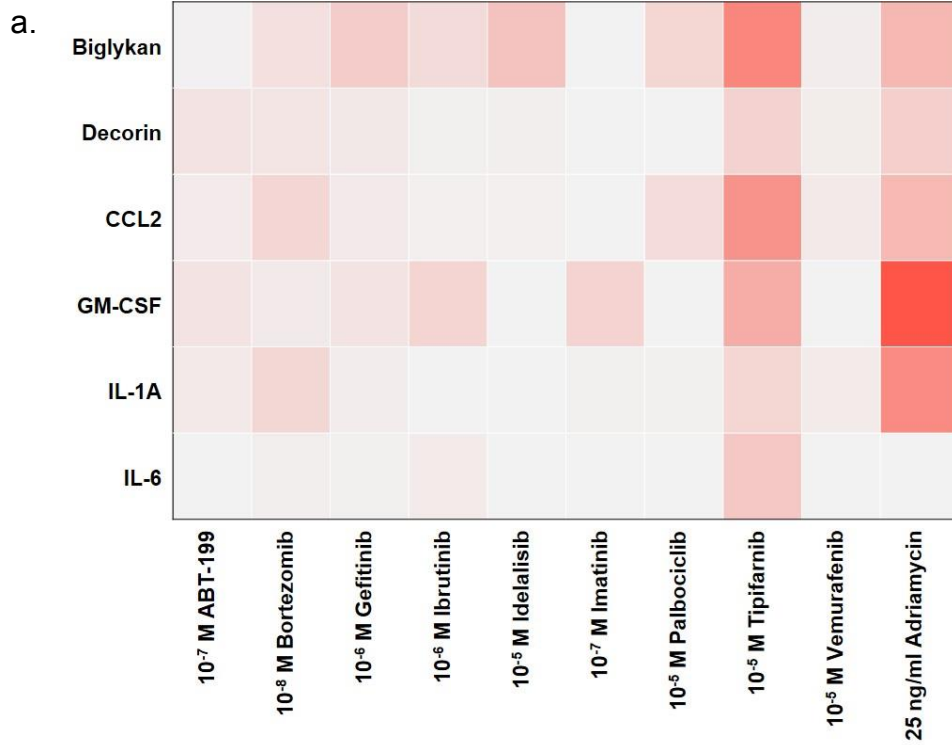
Auch der Anstieg der Expression der untersuchten Stemness-Gene stellte sich nach Behandlung mit den Inhibitoren geringer dar als nach Adriamycin-Behandlung. Jedoch zeigte sich hier in der Zelllinie K562 nach Behandlung mit allen Seneszenz-auslösenden Inhibitoren ein Anstieg der CD44-Expression. Zusätzlich war nach Behandlung mit ABT-199, Gefitinib, Ibrutinib und Tipifarnib ebenfalls ein Anstieg der CD150-Expression und nach Behandlung mit Ibrutinib und Tipifarnib ein Anstieg der CD133-Expression festzustellen. Die ABCG2-Expression war nach Behandlung mit Bortezomib, Ibrutinib und Palbociclib erhöht.

In der Linie RC-K8 zeigte sich nach allen Seneszenz-auslösenden Behandlungen ein starker Anstieg der CD133-Expression. Nach Palbociclib- und nach Tipifarnib-Behandlung stieg jeweils auch die CD44-Expression an.

In SD-1-Zellen war hier auch nach Palbociclib- und nach Tipifarnib-Behandlung ein Anstieg der CD44- sowie der CD150-Expression zu sehen. Die Behandlungen mit ABT-199, Gefitinib und mit Imatinib führten trotz Seneszenzauslösung zu keinem starken Anstieg der Stemness-Genexpression (s. Abb. 9a).

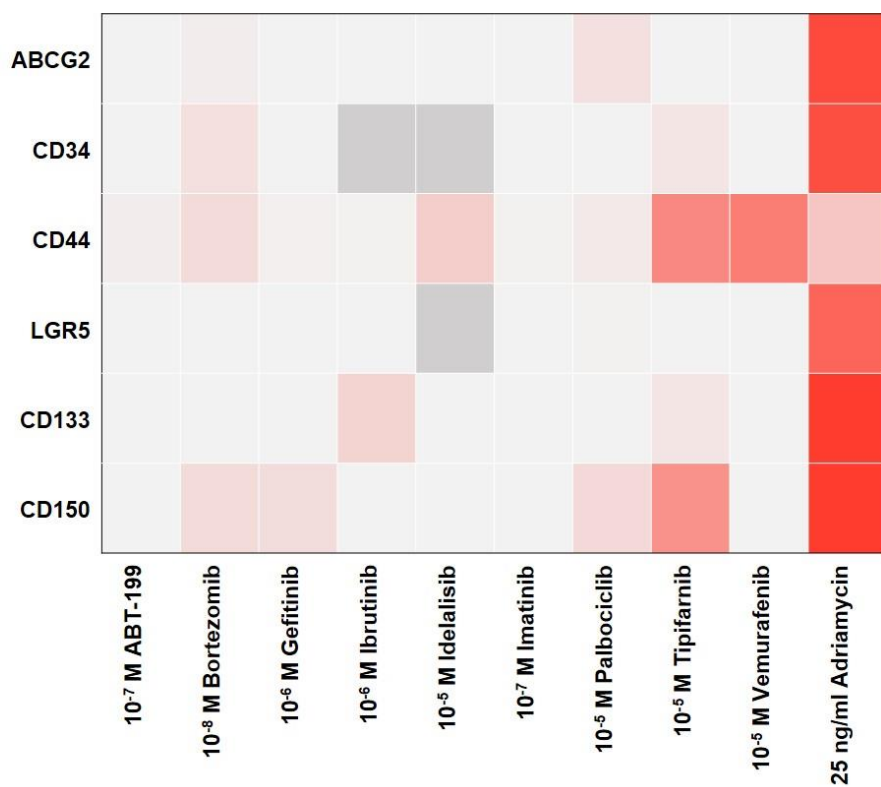
Auch in der Betrachtung der Stemness-Genexpression kam es nach Normalisierung der Genexpressionswerte auf den Anteil seneszenten Zellen zu einem vergleichbaren oder sogar höheren Anstieg der Genexpression als nach Behandlung mit Adriamycin (s. Abb. 9b).

K562 SASP-Gene

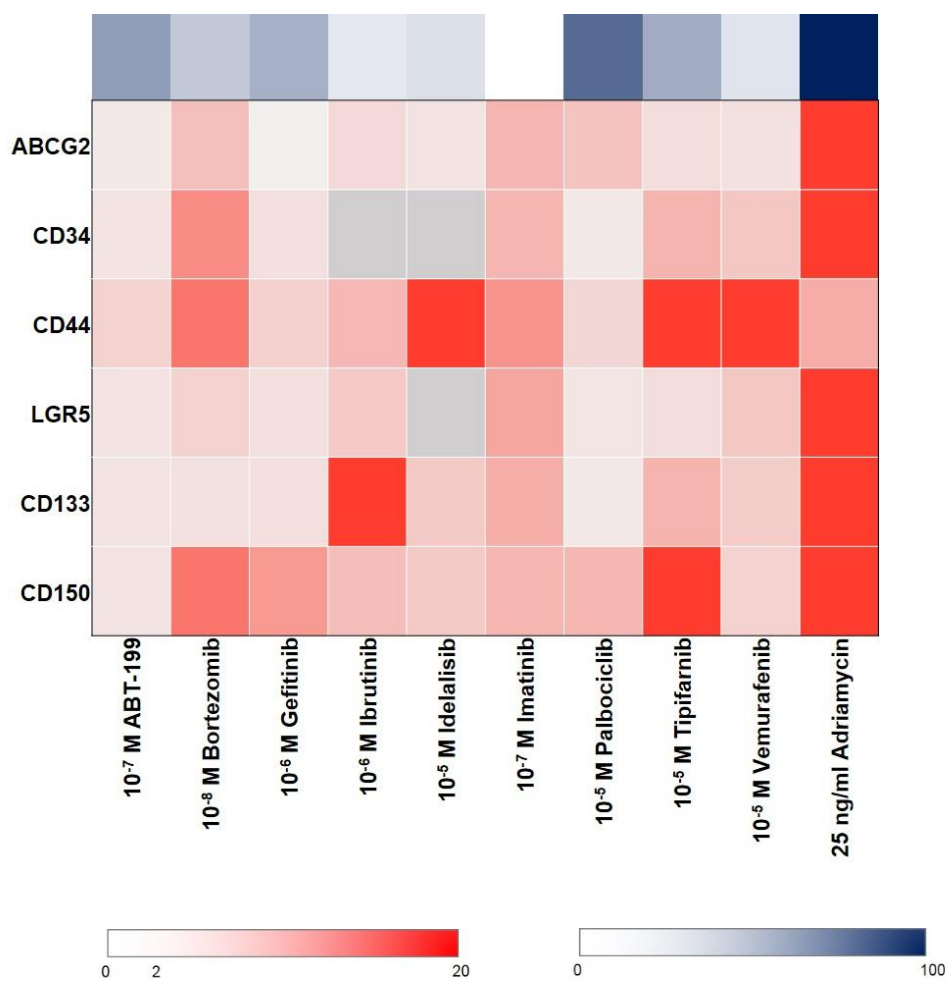


K562 Stemness-Gene

a.

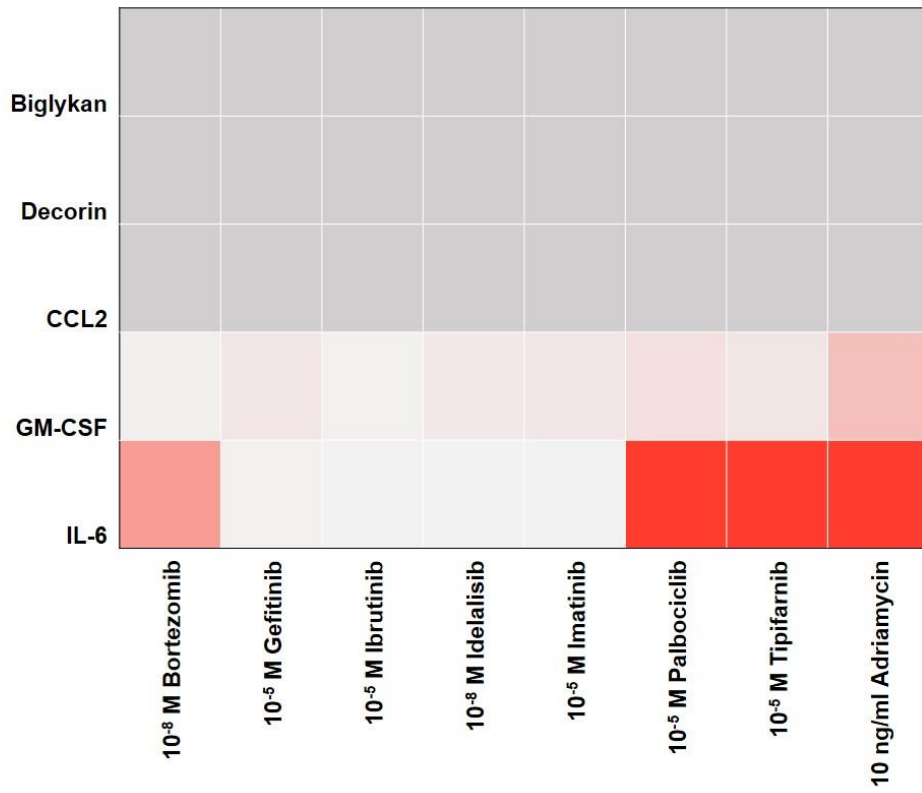


b.

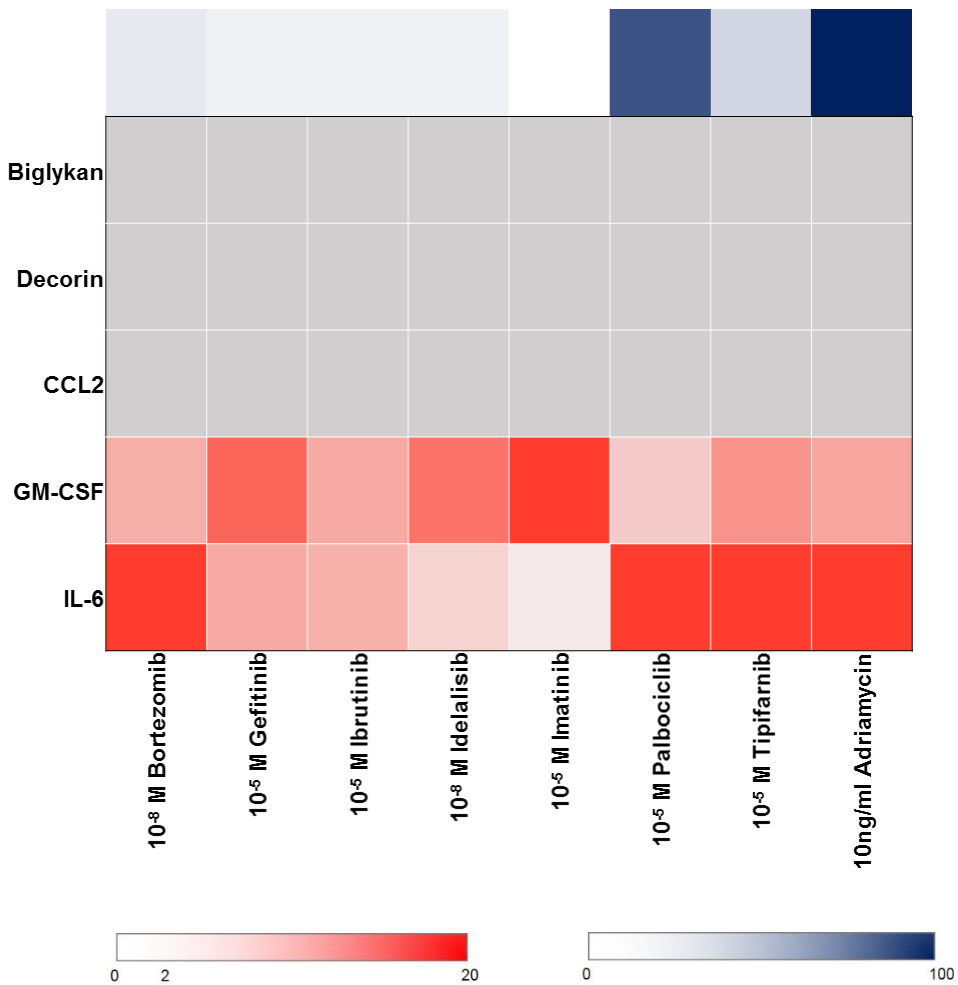


RC-K8 SASP-Gene

a.

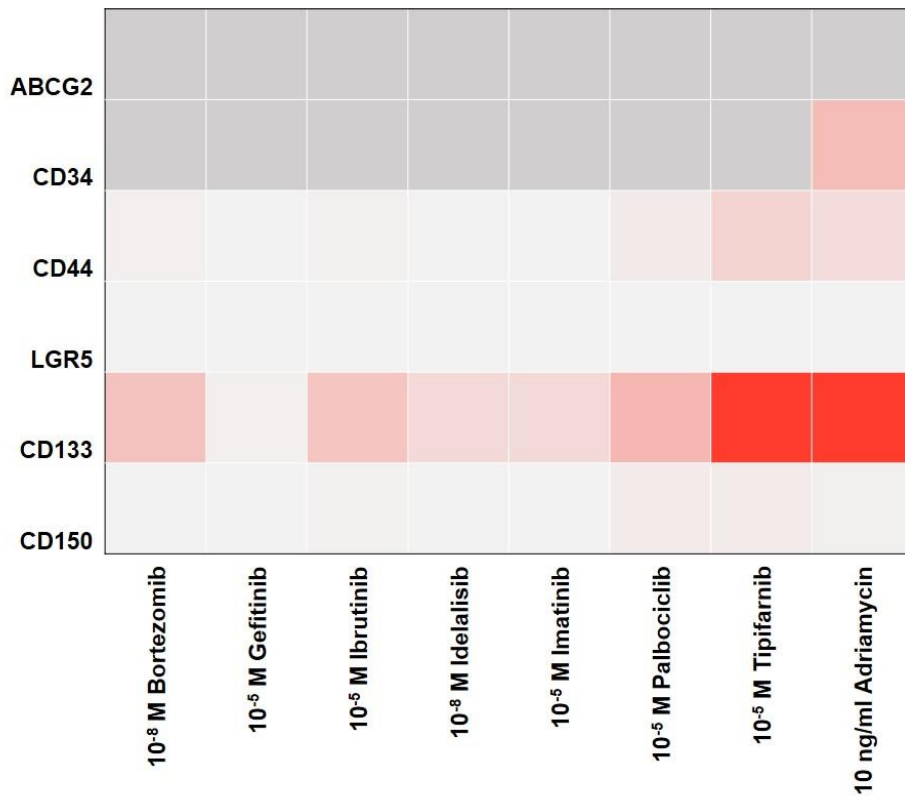


b.

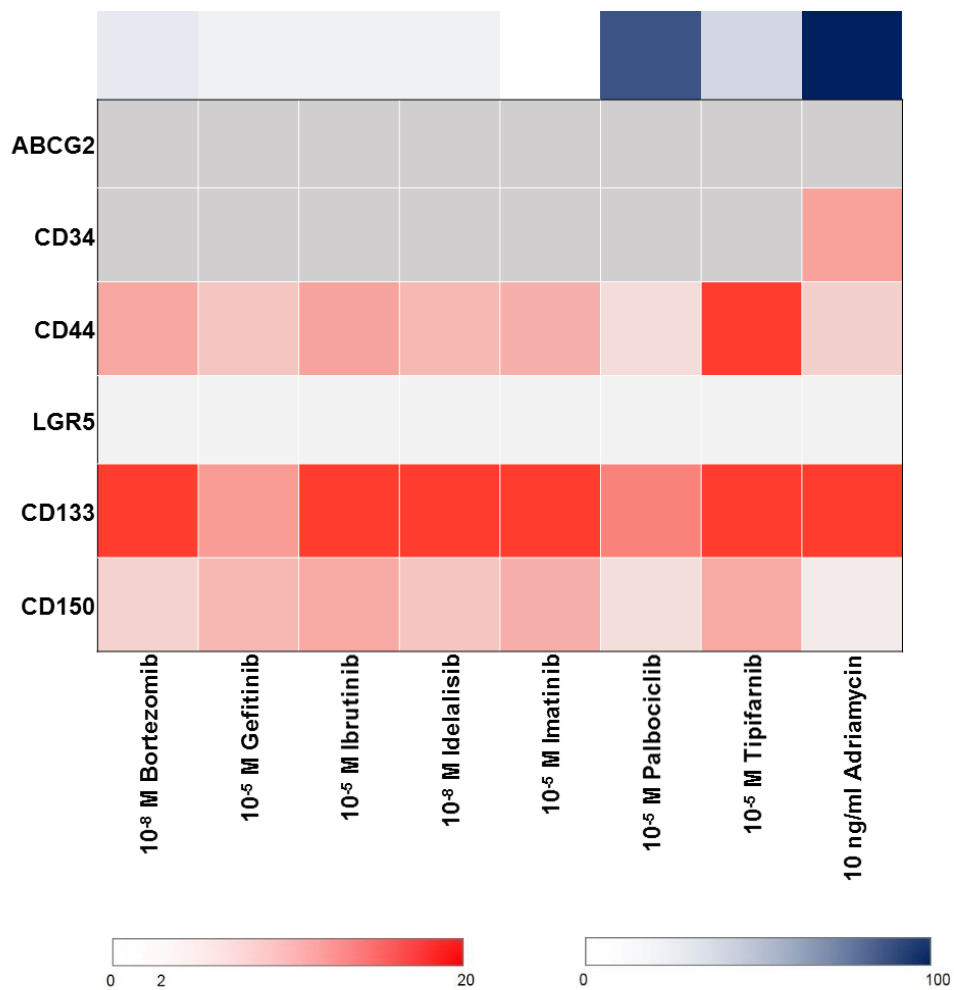


RC-K8 Stemness-Gene

a.

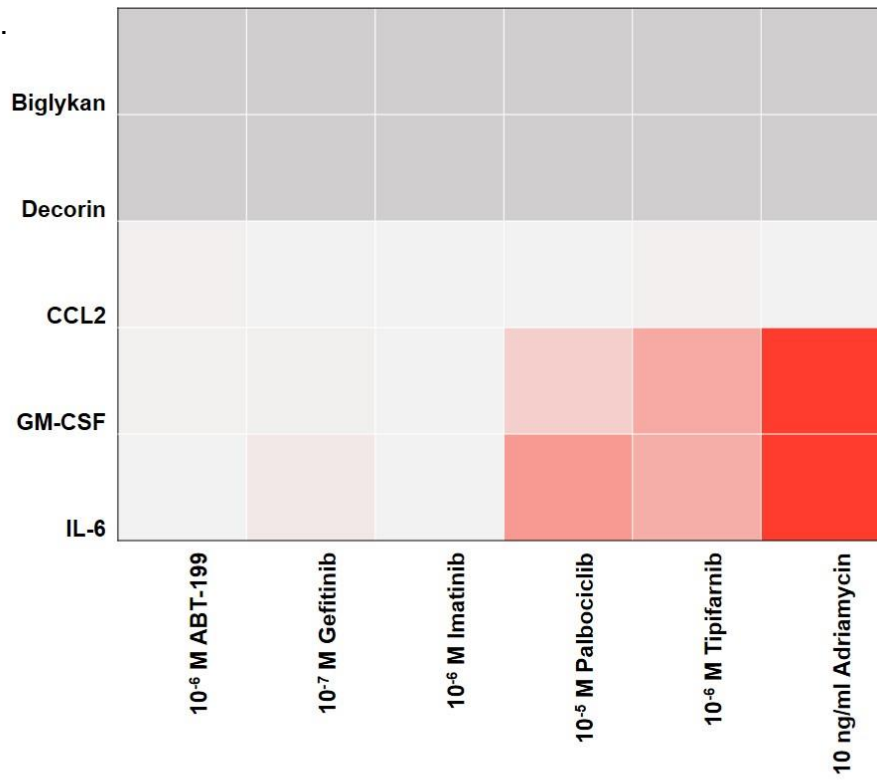


b.

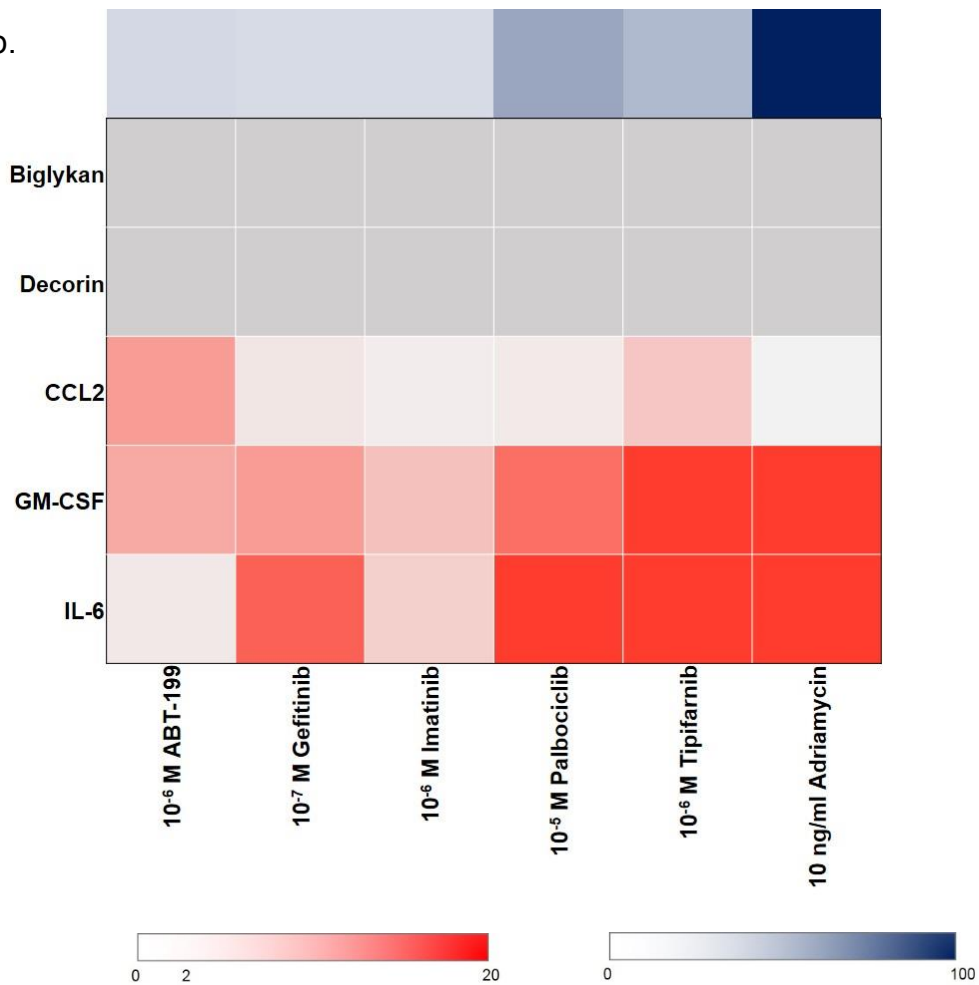


SD-1 SASP-Gene

a.



b.

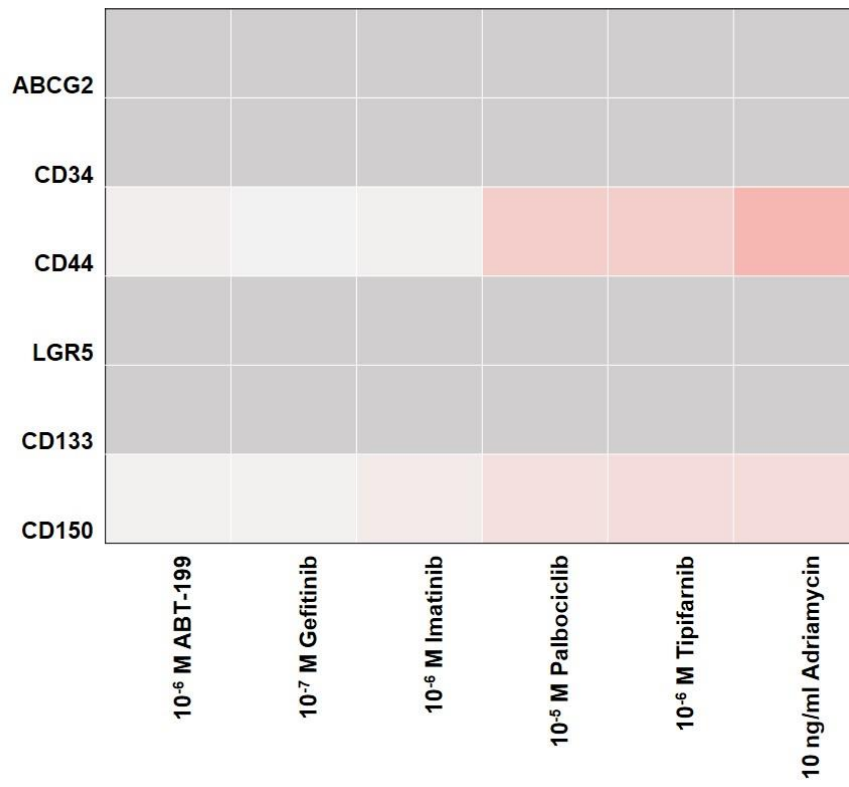


0 2 20

0 100

SD-1 Stemness-Gene

a.



b.

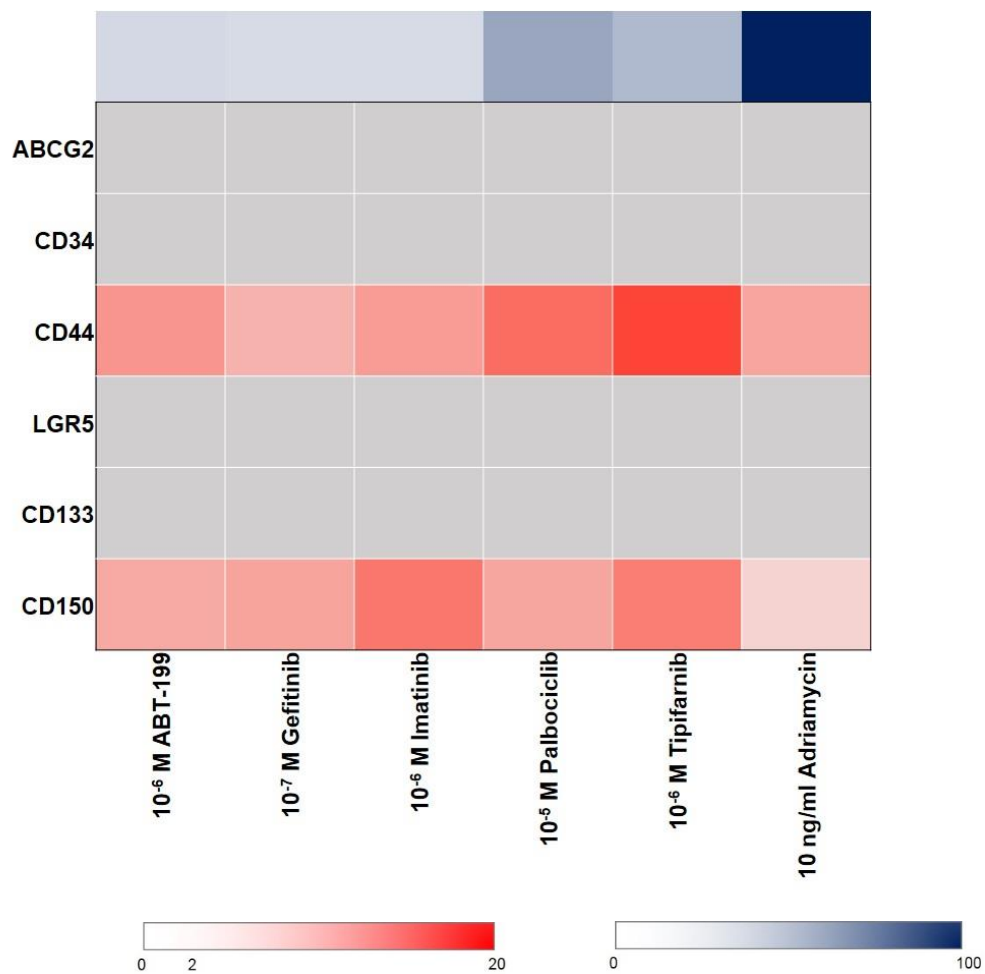


Abbildung 9. Genexpressionsanalysen der Zelllinien K562, RC-K8 und SD-1 nach Behandlung mit verschiedenen Seneszenz-auslösenden Inhibitoren oder Adriamycin. a. Expression von Stemness- und SASP-Genen in den behandelten Zellpopulationen mittels rqPCR. Die Farbe zeigt die x-fache Induktion der Genexpression als Mittelwert im Vergleich zur Kontrollpopulation (n=3). b. Auf den Anteil seneszenter Zellen normalisierte Expression derselben Stemness- und SASP-Gene. In blau ist der Anteil seneszenter Zellen dargestellt (n=3). Graue Felder stellen nicht-detektierbare Genexpressionen dar.

5 Diskussion

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob klinisch eingesetzte zielgerichtete Therapien zelluläre Seneszenz in Tumorzellen auslösen und wenn ja, ob dies zu einer Veränderung des sekretorischen Phänotyps und zur Fähigkeit der Wiederaufnahme des Zellzyklus führt, wurden in dieser Arbeit im Rahmen eines breiten Screening-Ansatzes neun Inhibitoren und deren Effekte in vier verschiedenen Zelllinien untersucht. Dies sollte zum einen ermöglichen, eine fundierte Aussage über den Wirkmechanismus der Inhibitoren hinsichtlich der Seneszenzauslösung als alternativer Mechanismus zur Apoptose treffen zu können. Zum anderen sollte so untersucht werden, ob die Inhibition bestimmter Signaltransduktionswege auch in Zellen, in denen die spezifische Zielstruktur nicht vorhanden oder nicht mutiert ist, trotzdem zur Auslösung von Seneszenz führen kann. Insbesondere in Anbetracht der zuletzt gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Rolle seneszenten Zellen in Tumorentstehung, Rezidiventwicklung und Therapieresistenz ist ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen dieser Inhibitoren unerlässlich. Zusätzlich bietet die Entwicklung neuer senolytischer und senomorphischer Therapieansätze die Möglichkeit, nach Seneszenz-auslösenden Therapien gezielt diese seneszenten Tumorzellen zu eliminieren.

Die Auslösung zellulärer Seneszenz ist im Rahmen der Tumorthherapie als zweischneidiges Schwert zu betrachten. Einerseits konnte bereits gezeigt werden, dass Therapie-induzierte Seneszenz sowohl die Tumorpheriferation inhibiert als auch maligne Zellen im Rahmen der ausgelösten Immunantwort beseitigt.¹¹⁶ Auf der anderen Seite zeigen senescente Zellen genetische Veränderungen, die denen von malignen Zellen ähneln, und können nicht nur wieder in den Zellzyklus eintreten, sondern haben dann auch ein erhöhtes Entartungspotential.²² Weiterhin treiben senescente Zellen durch die Auslösung einer chronischen Entzündungsreaktion die Tumorpheriferation über parakrine Effekte weiter an.¹¹⁷

Die aufgrund dieser dualen Rolle seneszenten Zellen in der Therapie maligner Erkrankungen in den letzten Jahren entwickelten senolytischen und senomorphischen Therapieansätze unterstreichen daher die Notwendigkeit des besseren Verständnisses Seneszenz-auslösender Therapieansätze. Wird durch eine antineoplastische Therapie Seneszenz in Tumorzellen ausgelöst, kann dies einerseits durch Inhibition der Tumorpheriferation zu einem verbesserten Outcome führen. Andererseits kann über Veränderungen des Mikromilieus des Tumors und Auslösung von Seneszenz in

umgebenden Zellen eine solche Therapie zu vermehrter Tumorproliferation, Metastasierung, Therapieresistenz und Rezidiventwicklung führen.¹¹⁸ Senolytische und senomorphische Medikamente sollen dies verhindern, indem sie gezielt seneszente Zellen oder die durch seneszente Zellen sezernierten Faktoren angreifen. So könnten diese Senolytika nach einer Seneszenz-auslösenden Therapie Tumorzellen gezielt eliminieren. Dies sollte insbesondere dann eine Rolle spielen, wenn nach der Behandlung ein großer Anteil viabler Zellen seneszent ist. Zwar konnte inzwischen einigen bereits entwickelten Medikamenten solche senolytischen oder senomorphischen Funktionen zugeschrieben werden, jedoch bleibt abzuwarten, inwiefern sie in der Behandlung maligner Erkrankungen das Therapieergebnis verbessern.²⁸

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse können zunächst zeigen, dass die Inhibition verschiedener Signaltransduktionswege oder Proteine in malignen Zellen zelluläre Seneszenz auslösen kann. Diese Seneszenzauslösung ist in den untersuchten Zelllinien jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt, wobei in allen drei Zelllinien insbesondere Inhibitoren, die mit zellulären Kontrollmechanismen interferieren, zur Auslösung zellulärer Seneszenz führten und diejenigen, die mutationsspezifisch wirken, geringer ausgeprägte Effekte zeigten. Der einzige getestete Inhibitor, der in allen drei untersuchten Seneszenz-fähigen Zelllinien zu einer solchen signifikanten Erhöhung seneszenten Zellen führte, ist der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib. Dies zeigte sich nicht nur in einer vermehrten SA- β -Gal-Positivität, sondern auch in einer deutlichen Abflachung der Wachstumskurven vor allem nach Behandlung mit 10^{-5} M Palbociclib. Die Genexpressionsanalysen nach Palbociclib-Behandlung ergaben zwar deutlich geringere Anstiege von SASP- und Stemness-Genen als nach Adriamycin-Behandlung, jedoch ist hier zu berücksichtigen, dass die Palbociclib-Behandlung auch in allen drei Zelllinien zu einer geringeren Anzahl seneszenten Zellen führte als die Adriamycin-Behandlung. Ebenfalls ist hier wichtig, dass auch ein geringerer Anteil Stemness-fähiger Zellen das Therapie-Outcome negativ beeinflussen kann und ebenso eine geringere Sekretion von SASP-Faktoren trotzdem Einfluss auf das Mikromilieu des Tumors nehmen und so insbesondere auch zur Auslösung zellulärer Seneszenz in umgebenden Zellen führen kann.

Bisher ist Palbociclib lediglich für die Behandlung Hormonrezeptor-positiver und HER2-negativer Mammakarzinome zugelassen. Jedoch werden derzeit auch die Effekte einer Palbociclib-Therapie in Mantelzelllymphomen sowie multiplen Myelomen untersucht.⁵⁸ Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der weiteren Untersuchung von Palbociclib und anderer CDK4/6-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Effekte

auf hämatologische Tumorzellen. Neben der Verminderung der Tumorpheriferation durch die Auslösung von Seneszenz in einem Großteil der Tumorzellen müssen auch die Elimination dieser seneszenten Tumorzellen mittels senolytischen Therapien oder im Rahmen der intrinsischen Aktivierung des Immunsystems und damit verbundener Clearance seneszenten Zellen sowie die Kombination von CDK4/6-Inhibitoren mit etablierten Therapieansätzen als mögliche Therapiestrategien weiter untersucht werden. Dies ist besonders interessant, da in der Zelllinie RC-K8 von 75,2% ± 7,7 viablen Zellen am sechsten Tag nach Behandlung 56,6% ± 13,5 seneszent waren. Eine Beseitigung dieser seneszenten Tumorzellen durch senolytische oder senomorphische Therapieansätze würde wesentlich zur Tumorbehandlung beitragen.

Auch der Farnesyltransferaseninhibitor Tipifarnib führte zumindest in zwei der Seneszenz-fähigen Zelllinien zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils seneszenten Zellen. Auch hier ging der Anstieg der SA-β-Gal-Positivität mit einer deutlichen Abflachung der Wachstumskurven einher. Interessant ist hierbei, dass Tipifarnib trotz eines geringeren Anteils seneszenten Zellen im Vergleich zur Genexpressionsanalyse nach Palbociclib-Behandlung zu einem teils deutlich höheren Anstieg von SASP- und Stemness-Genen führte.

Tipifarnib zeigte in einigen Phase-I- und Phase-II-Studien antiproliferative Aktivität vor allem in der Behandlung akuter myeloischer Leukämien. In der bisher einzigen Phase-III-Studie konnte jedoch keine Überlegenheit von Tipifarnib gegenüber bester supportiver Behandlung und Hydroxyurea gezeigt werden, sodass Tipifarnib derzeit nicht Bestandteil der Standardtherapie akuter myeloischer Leukämien ist.¹¹⁹ Die in dieser Arbeit gezeigte Auslösung zellulärer Seneszenz könnte neben den zytotoxischen Effekten von Tipifarnib die eingeschränkte klinische Wirksamkeit des Inhibitors mit erklären. Die mit dieser Therapie-induzierten Seneszenz einhergehende Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren im Rahmen des SASP könnten über die Auslösung einer chronischen Inflammation die Unterhaltung einer wachstumsfördernden Tumorumgebung fördern. Weiterhin könnte die ebenfalls in dieser Arbeit gezeigte Hochregulation von Stemness-Genen in seneszenten Tumorzellen durch Tipifarnib zum Wiedereintreten dieser Tumorzellen in den Zellzyklus und damit zur erneuten Tumorpheriferation beziehungsweise zur Entstehung von Rezidiven führen.

Interessanter Weise zeigten Nagai et al. bereits 2010, dass die Kombination von Tipifarnib mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin *in vitro* synergistisch das Wachstum von Leukämiezellen hemmt und auch die Resistenzentwicklung nach Tipifarnibbehandlung

vermindert.¹²⁰ Inzwischen werden Rapamycin senolytische sowie senomorphische Eigenschaften zugeschrieben, sodass die von Nagai et al. beschriebenen synergistischen Effekte von Tipifarnib und Rapamycin in Hinblick auf die in dieser Arbeit gezeigten Seneszenz-auslösenden Effekte durch Tipifarnib gegebenenfalls auf eben diese senolytischen Eigenschaften von Rapamycin zurückzuführen sind.³⁴ Dies bedarf sicherlich weiterer intensiver Forschung, um diesen Synergismus von Seneszenz-auslösenden und senolytischen Medikamenten in der Behandlung maligner Erkrankungen weiter auszunutzen. Auch hier ist die Betrachtung senolytischer Therapien besonders interessant, wenn ein großer Anteil viabler Zellen seneszent ist, wie in dieser Arbeit nach Behandlung mit Tipifarnib in den Zelllinien SD-1 (24,5% ± 12,5 seneszente Zellen bei 35,7% ± 9,6 viablen Zellen) und K562 (31,6% ± 5,8 seneszente Zellen bei 58,8% ± 16,8 viablen Zellen) gezeigt werden konnte.

Obwohl EGFR-Mutationen in der Entstehung hämatologischer Neoplasien nach derzeitigem Wissensstand keine führende Rolle einnehmen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib zu einem erhöhten Anteil seneszenter Zellen führte. Zumindest bei Behandlung mit 10^{-5} M des Inhibitors führte dies in allen drei Seneszenz-fähigen Zelllinien auch zu einer Abflachung der Wachstumskurven. Dies ist ein überraschender Effekt von Gefitinib, da die hier behandelten Zellen nicht durch EGFR-Mutationen getrieben sind. Jedoch wurde auch zuvor bereits beschrieben, dass Gefitinib und Erlotinib *in vitro* und *in vivo* Zielstruktur-unabhängige Effekte vor allem auf akute myeloische Leukämiezellen haben und in diesen Zellen Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren können.^{121,122} Auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Gefitinib einen *off-target* Effekt auf hämatologische Tumorzellen haben kann und dieser weiterer Untersuchung bedarf. Sollte Gefitinib auch *in vivo* Seneszenz in hämatologischen Tumorzellen auslösen, könnte dies therapeutisch im Rahmen von Kombinationstherapien ausgenutzt werden.

Ebenso unerwartet ist die Auslösung zellulärer Seneszenz durch den BCL-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) in der Zelllinie K562. Da BCL-2 als pro-Überleben-Protein ein wichtiger Regulator zellulären Überlebens ist, wird mit dessen Inhibition die Auslösung der Apoptose vor allem in BCL-2-überexprimierenden Tumorzellen angestrebt und wird mit diesem Ziel bereits vor allem in der Behandlung der CLL eingesetzt. Diaz-Flores et al. konnten zeigen, dass es in der B-ALL-Zelllinie Beck-1732 nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von ABT-199 zu einem Zellzyklusarrest mit einem Anstieg

der p21-, p27- und p53-Level kam, ohne dass die Zellen in Apoptose traten. Höhere Konzentrationen von ABT-199 führten dagegen zur Induktion der Apoptose.¹²³ In Anbetracht dieser sowie der Ergebnisse der hier gezeigten Arbeit sollte Seneszenz als Wirkmechanismus von Inhibitoren der BCL-2-Familie weiter untersucht werden. Auch hier könnte diese Erkenntnis zu neuen Möglichkeiten im Rahmen einer Kombination mit senolytischen oder senomorphischen Therapieansätzen oder anderen Inhibitoren führen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass auch nach Auslösung zellulärer Seneszenz durch zielgerichtete Therapien ein Anstieg der Expression gewisser SASP- und Stemness-Gene zu verzeichnen ist. Zwar war dieser Expressionsanstieg in der Regel deutlich geringer als nach Adriamycin-Behandlung, jedoch ist zu berücksichtigen, dass auch der Anteil seneszenter Zellen nach Behandlung mit den Inhibitoren in allen Fällen geringer war als nach Adriamycin-Behandlung. Nach Normalisierung der Genexpressionswerte auf den Anteil seneszenter Zellen an der Gesamtpopulation stellten sich die Expressionsanstiege zum Teil höher dar als nach Adriamycin-Behandlung. So lässt sich postulieren, dass auch die durch Inhibition verschiedener Signaltransduktionswege induzierte zelluläre Seneszenz mit der Entwicklung eines SASP und mit der vermehrten Expression von Stemness-Genen einhergeht.

Insbesondere in Bezug auf die erhöhte Expression von Stemness-Genen bleibt abzuwarten, ob nach Auslösung zellulärer Seneszenz durch zielgerichtete Therapien ein Entkommen aus diesem Zellzyklusarrest möglich ist, wie es durch Milanovic et al. nach Adriamycin-Behandlung sowie nach Bestrahlung bereits gezeigt werden konnte.²² Die hier dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass auch nach Inhibitor-Behandlung aufgrund der Expression von Stemness-Genen ein solches Entkommen möglich sein wird. Insbesondere ist hier wichtig, dass ein Anstieg des Anteils seneszenter Zellen und damit ein Anstieg der Expression von Stemness-Genen nicht zwingend mit einem Abfall der Viabilität einhergeht. Dementsprechend können bereits geringe Inhibitor Dosen, die nicht zur Apoptose führen, zelluläre Seneszenz induzieren und damit zur Tumorpersistenz beitragen. In Bezug auf das Outcome dieser klinisch bereits eingesetzten Therapien könnte dies weitreichende Folgen haben. Wie ebenfalls durch Milanovic et al. gezeigt, haben solche reprogrammierten, ehemals seneszenten Zellen ein erhöhtes Potential, Tumorpheriferation zu initiieren sowie zu aggressiven Rezidiven zu führen.²² Ob sich diese Seneszenz-assoziierte Stemness nur durch zellintrinsische Signale entwickelt oder ob auch auto- bzw. parakrine Signale im Rahmen des SASP hier eine Rolle spielen, muss noch weiter untersucht werden.

Nicht nur aufgrund dieser Gefahr des erneuten Tumorwachstums durch persistierende seneszente Zellen, sondern auch wegen ihres Potenzials, eine chronische Inflammation durch die andauernde Sekretion von SASP-Faktoren auszulösen, scheint die selektive Elimination seneszenter Zellen in der Therapie maligner Erkrankungen sinnvoll. Hier ist jedoch wichtig, dass die Auslösung zellulärer Seneszenz als Bestandteil initialer Tumorthherapie weiterhin eine wichtige Rolle spielt, insbesondere in Tumoren, in denen Apoptose als Wirkmechanismus antineoplastischer Therapien nicht greift. Schädlich wird diese Seneszenz erst durch den Erwerb von Stammzellfunktionen und die Chronifizierung der ausgelösten Immunreaktion.¹¹⁶ Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen diesen Aspekt der Therapie-induzierten Seneszenz. Nach Auslösung zellulärer Seneszenz durch zielgerichteten Therapien kam es wie nach Adriamycin-Behandlung zu einem Anstieg der Expression von SASP-Genen. Dabei scheint es ebenfalls sinnvoll, die biologischen Folgen der erhöhten Genexpression zu untersuchen. Insbesondere sollten zunächst die Effekte einer erhöhten Sekretion von SASP-Faktoren auf umliegende Zellen – maligne und nicht-maligne – eruiert werden, um unter anderem festzustellen, ob es zur Auslösung von Seneszenz in Bystander-Zellen kommt. Gleichzeitig können einzelne SASP-Faktoren, insbesondere IL-6, Seneszenz verstärken, indem der CDK4/6-Inhibitor p15 aktiviert wird, welcher wiederum die Aufrechterhaltung des G1-Phasenarrests bekräftigt.¹³ Weiterhin scheint es sinnvoll, im Rahmen von *in vivo* Experimenten die Auswirkungen von durch zielgerichtete Therapien ausgelöster Seneszenz auf das Immunsystem zu untersuchen. Führen die durch seneszente Zellen sezernierten Faktoren zu einer vermehrten Beseitigung ebendieser seneszenter Zellen durch aktivierte Immunzellen wie natürliche Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen, wäre dies ein wünschenswerter Effekt zielgerichteter Therapieansätze. Sollte es aber wie oben beschrieben zu einer chronischen Immunreaktion mit Veränderung der Mikroumgebung und im Endeffekt vermehrtem Tumorwachstum kommen, sollte auch hier die sekundäre Anwendung senolytischer oder senomorphischer Therapien getestet werden. So könnte der initial positive Effekt zellulärer Seneszenz therapeutisch zunächst ausgenutzt werden, sekundär schädliche Effekte aber vermieden werden.

Diese senolytischen und senomorphischen Therapieansätze bedürfen jedoch zunächst weiterer Untersuchungen. Zwar konnten bereits einige niedermolekulare Stoffe mit senolytischen Eigenschaften identifiziert werden, jedoch konnte ihr Nutzen in der Behandlung maligner Erkrankungen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auch Therapien, die die Produktion oder Ausschüttung von SASP-Faktoren eindämmen und

darüber eine chronische Inflammation abschwächen, oder Therapien, die beispielsweise über die Inhibition des Wnt-Signalweges die selbsterneuernden Fähigkeiten seneszenten Zellen eindämmen, könnten die nachteiligen Folgen der Seneszenz-Auslösung zumindest vermindern.

Die hier dargestellte Zweischneidigkeit der Auslösung zellulärer Seneszenz im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen erschwert die Beantwortung der Frage, ob bzw. in welchem Rahmen Seneszenz einen gewünschten Effekt antineoplastischer Therapien darstellt. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, geht zelluläre Seneszenz zunächst mit einer verminderten Proliferation von Tumorzellen einher und schränkt somit das Tumorwachstum ein. Gleichzeitig scheint die Auslösung zellulärer Seneszenz durch zielgerichtete Therapien vergleichbar mit der Auslösung zellulärer Seneszenz durch klassische Chemotherapeutika zu einem komplexen sekretorischen Phänotyp, dessen biologische Folgen noch genaueren Untersuchungen bedürfen, zu führen. Insbesondere müssen hier auch die komplexen Dynamiken der zellulären Eigenschaften seneszenten Zellen sowie die Kommunikation seneszenten Zellen mit ihrem Mikromilieu Bestandteil intensiver Forschung sein. Zum anderen zeigt sich nach Behandlung mit Seneszenz-auslösenden Inhibitoren ein Anstieg von Stammzellmarkern. Auch hier muss weiter untersucht werden, ob dies zu einem Wiedereintritt in den Zellzyklus oder zu einer erhöhten zellulären Plastizität führt. Zusätzlich sind genauere Untersuchungen der exakten Mechanismen des Wiedereintritts ehemals seneszenten Zellen in den Zellzyklus notwendig, um dies gegebenenfalls verhindern oder therapeutisch ausnutzen zu können. Insgesamt muss immer bedacht werden, dass zelluläre Seneszenz kein binärer Zustand ist, sondern Seneszenz-assoziierte Veränderungen je nach auslösendem Stimulus und Zelltyp in unterschiedlichen Intensitäten auftreten können.¹²⁴ Die hier gezeigten Ergebnisse können aufgrund der Limitationen der Arbeit durch die eingeschränkte Anzahl untersuchter Zelllinien und die ausschließlich *in vitro* durchgeführten Experimente nur Hinweise auf spezifische Effekte der untersuchten zielgerichteten Therapien geben. In Folgestudien muss mittels größer angelegter Fallzahlen sowie Untersuchungen sowohl *in vitro* in Zelllinien verschiedener Gewebearten als auch *in vivo* zunächst im Mausmodell das hier gezeigte bestätigt und hinsichtlich der biologischen Folgen einer so ausgelösten Seneszenz genauer betrachtet werden.

Jedoch scheint im Wesentlichen der Ansatz, zelluläre Seneszenz zur Eindämmung des Tumorwachstums initial im Rahmen antineoplastischer Therapien auszulösen, um dann mittels senolytischer bzw. senomorphischer Therapien die potentiell schädlichen

seneszenten Zellen zu eliminieren, vielversprechend. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch die Behandlung mit klinisch bereits eingesetzten Inhibitoren teils *off target* zu zellulärer Seneszenz mit Entwicklung eines SASP und der Hochregulation von Stemness-Genen führen kann und daher in Hinblick auf die möglicherweise schädlichen Folgen dieser Seneszenz ebenfalls weiter untersucht werden muss, um gegebenenfalls auch hier eine oben beschriebene zweifache Therapiestrategie verfolgen zu können.

Literaturverzeichnis

1. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-11.
2. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature*. 2014;15(7):482-96.
3. Coppé J-P, Desprez P, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2010;5:99-118.
4. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585-621.
5. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*. 1996;16(3):859-67.
6. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602.
7. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*. 1998;12(19):3008-19.
8. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003;113(6):703-16.
9. Ito Y, Hoare M, Narita M. Spatial and temporal control of senescence. *Trends Cell Biol*. 2017;27(11):820-32.
10. Dimri GP, Leet X, Basile G, Acosta M, Scortt G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9363–7.
11. Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JHM, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S,

Schmitt CA. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 2013;501(7467):421-5.

12. Sun Y, Coppé JP, Lam EWF. Cellular senescence: the sought or the unwanted? *Trends Mol Med*. 2018;24(10):871-85.

13. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978-90.

14. Takasugi M, Okada R, Takahashi A, Virya Chen D, Watanabe S, Hara E. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun*. 2017;8:15729.

15. Farsam V, Basu A, Gatzka M, Treiber N, Schneider LA, Mulaw MA, Lucas T, Kochanek S, Dummer R, Levesque MP, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Senescent fibroblast-derived Chemerin promotes squamous cell carcinoma migration. *Oncotarget*. 2016;7(50):83554-69.

16. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7193):306–13.

17. Krizhanovsky V, Lowe SW. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature*. 2009;460(7259):1085-6.

18. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A, Nimer SD. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):37-48.

19. Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 2006;443(7110):421-6.

20. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombrowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000;287(5459):1804-9.

21. Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chrontronasiou D, Rovira M, Fernandez-Marcos PJ, Muñoz-Martin M, Blanco-Aparicio C, Pastor J, Gómez-López G, De Martino A, Blasco MA, Abad M, Serrano M. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming. *Science*. 2016; 354(6315):aaf4445.
22. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, Dörr JR, Dimitrova L, Lenze D, Monteiro Barbosa IA, Mendoza-Parra MA, Kanashova T, Metzner M, Pardon K, Reimann M, Trumpp A, Dörken B, Zuber J, Gronemeyer H, Hummel M, Dittmar G, Lee S, Schmitt CA. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100.
23. Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, Sansom OJ, Zender L, Keyes WM. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*. 2017;31(2):172-83.
24. Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseeff JH. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1229-37.
25. Walaszczyk A, Dookun E, Redgrave R, Tual S, Victorelli S, Spyridopoulos I, Owens A, Arthur HM, Passos JF, Richardson GD. Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction. *Aging Cell*. 2019;e12945:1-5.
26. Hamsanathan S, Alder JK, Sellares J, Rojas M, Gurkar AU. Cellular senescence: the trojan horse in chronic lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;1-25.
27. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today*. 2017;22(5):786-95.
28. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge R. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):718-35.
29. Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LaBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Furhmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. 2015;14(4):644-58.

30. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge R, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, Krager K, Ponnappan U, Hauer-Jensen M, Meng A, Zhou D. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*. 2015;22(1):1-9.
31. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Johnson KO, Giles CB, Wren JD, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Kirkland JL. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*. 2016;15(3):428-35.
32. Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech Ageing Dev*. 2018;170:30-6.
33. Maddick M, Miwa S, Jurk D, Czapiewski R, Saretzki G, Langie SAS, Godschalk RWL, Cameron K, von Zglinicki T. Adult-onset, short-term dietary restriction reduces cell senescence in mice. *Aging*. 2010;2(9):555-66.
34. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, Caples K, Bradley L, Beaver LM, Ho E, Löhr CV, Perez VI. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*. 2017;16(3):564-74.
35. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyre G. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*. 2013;12(3):489-98.
36. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, Inman CL, Ogrodnik MB, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, Langhi LGP, Weigl M, Giorgadze N, LeBrasseur NK, Miller JD, Jurk D, Singh RJ, Allison DB, Ejima K, Hubbard GB, Ikeno Y, Cubro H, Garovic VD, Hou X, Weroha SJ, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Khosla S, Tchkonina T, Kirkland JL. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*. 2018;24(8):1246-56.
37. Weinberg RA. *The biology of cancer*. 2nd edition. New York: Garland Science; 2014: 815-22.
38. Soverini S, Mancini M, Bavaro L, Cavo M, Martinelli G. Chronic myeloid leukemia: The paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol Cancer*. 2018;17(1):49.

39. Clark SS, McLaughlin J, Crist WM, Champlin R, Witte ON. Unique forms of the abl tyrosine kinase Distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. *Science*. 1987;235(4784):85-8.
40. Salette S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2002;21(56):8547-59.
41. Soverini S, Martinelli G, Baccarani M. Imatinib mesylate for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008;8(6):853-64.
42. Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur R. Approval summary: Imatinib Mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin Cancer Res*. 2003;9(6):1972-9.
43. Montor WR, Salas AROSE, de Melo FHM. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: The current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer*. 2018;17(1):55.
44. Dziadziuszko R, Jassem J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors and derived treatments. *Ann Oncol*. 2012 Sep 1;23(suppl_10):x193-6.
45. Liu TC, Jin X, Wang Y, Wang K. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *Am J Cancer Res*. 2017;7(2):187-202.
46. Adjei AA, Mauer A, Bruzek L, Marks RS, Hillman S, Geyer S, Hanson LJ, Wright JJ, Erlichman C, Kaufmann SH, Vokes EE. Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(9):1760-6.
47. Cohen SJ, Ho L, Ranganathan S, Abbruzzese JL, Alpaugh RK, Beard M, Lewis NL, McLaughlin S, Rogatko A, Perez-Ruixo JJ, Thistle AM, Verhaeghe T, Wang H, Weiner LM, Wright JJ, Hudes GR, Meropol NJ. Phase II and pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 as initial therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(7):1301-6.
48. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes

R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Jo JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.

49. McGettigan S. Dabrafenib: A new therapy for use in BRAF-mutated metastatic melanoma. *J Adv Pract Oncol*. 2014;5(3):211-5.

50. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dréno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): Extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):323-32.

51. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, Garbe C, Schadendorf D, Krajsova I, Gutzmer R, Chiarion-Sileni V, Dutriaux C, de Groot JWB, Yamazaki N, Loguai C, Moutouh-de Parseval LA, Pickard MD, Sandor V, Robert C, Flaherty KT. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):603-15.

52. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9992):444-51.

53. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:535-602.

54. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(12):921-9.

55. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. 2008;27(41):5486-96.
56. Yang Q, Modi P, Newcomb T, Quéva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-class PI3K delta inhibitor for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic leukemia, and follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1537-42.
57. Johnson A, Skotheim JM. Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(6):717-23.
58. Parylo S, Vennepureddy A, Dhar V, Patibandla P, Sokoloff A. Role of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in the current and future eras of cancer treatment. *J Oncol Pharm Pract*. 2018;25(1):110-29.
59. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153-66.
60. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1770-83.
61. Cassier P, Trédan O, Seigne C, Lavergne E, Fayette J, Desseigne F, Biron P, La Vecchia C, Ray-Coquard IL, Perol M, Frappaz D, Bernardin M, Wang Q, Attignon V, Pissaloux D, Combaret V, Agrapart V, Fondrevelle ME, Perol D, Blay J. Identifying actionable targets in advanced cancer patients: Preliminary results from the Profiler program. *J Clin Oncol*. 2014;32(15_suppl):2621.
62. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
63. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(16):3630-3.
64. Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant p16(INK4A) expression in human breast cancer. *Am J Pathol*. 1996;149(1):15-20.
65. Spring L, Bardia A, Modi S, Physician A. Targeting the cyclin D-cyclin-dependent kinase (CDK)4/6-retinoblastoma pathway with selective CDK 4/6 inhibitors in hormone

receptor-positive breast cancer: rationale, current status, and future directions. *Discov Med*. 2016;21(113):65-74.

66. Perini GF, Ribeiro GN, Pinto Neto JV, Campos LT, Hamerschlak N. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):65.

67. Valentin R, Grabow S, Davids MS. The rise of apoptosis: Targeting apoptosis in hematologic malignancies. *Blood*. 2018;132(12):1248-64.

68. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao Y, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008;68(9):3421-8.

69. Khaw SL, Mérimo D, Anderson MA, Glaser SP, Bouillet P, Roberts AW, Huang DC. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia*. 2014;28(6):1207-15.

70. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-22.

71. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, Owen C, Gerecitano J, Robak T, De la Serna J, Jaeger U, Cartron G, Montillo M, Humerickhouse R, Punnoose EA, Li Y, Boyer M, Humphrey K, Mobasher M, Kater AP. Venetoclax–Rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Pak Med Assoc*. 2018;378(12):1107-20.

72. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*. 2018;17(1):57.

73. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(4):219-32.

74. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, Kolibaba KS, Furman RR, Rodriguez S, Chang BY, Sukbuntherng J, Izumi R, Hamdy A, Hedrick E,

Fowler NH. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):88-94.

75. De Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, Pals ST, Spaargaren M. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(11):2590-4.

76. Stiff A, Trikha P, Wesolowski R, Kendra K, Hsu V, Uppati S, McMichael E, Duggan M, Campbell A, Keller K, Landi I, Thong Y, Dubovsky J, Howard JH, Yu L, Harrington B, Old M, Reiff S, Mace T, Tridandapani S, Muthusamy N, Caligiuri MA, Byrd JC, Carson WE 3rd. Myeloid-derived suppressor cells express Bruton's tyrosine kinase and can be depleted in tumor-bearing hosts by ibrutinib treatment. *Cancer Res*. 2016;76(8):2125-36.

77. Chauhan D, Bianchi G, Anderson KC. Targeting the UPS as therapy in multiple myeloma. *BMC Biochem*. 2008;9(Suppl 1):S1.

78. Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M. Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem*. 1999;274(20):13886-93.

79. Li CCH, Dai RM, Longo DL. Inactivation of NF- κ B inhibitor I κ B α : ubiquitin-dependent proteolysis and its degradation product. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):292-301.

80. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994;78(5):773-85.

81. Matthews GM, de Matos Simoes R, Dhimolea E, Sheffer M, Gandolfi S, Dashevsky O, Sorrell JD, Mitsiades CS. NF- κ B dysregulation in multiple myeloma. *Semin Cancer Biol*. 2016;39:68-76.

82. Adams J. The proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):349-60.

83. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(4):561-84.

84. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001;61(29):3071-6.
85. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai Y, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood.* 2003;101(6):2377-80.
86. Wang M, Han XH, Zhang L, Yang J, Qian JF, Shi YK, Kwak LW, Romaguera J, Yi Q. Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia.* 2008;22(1):179–85.
87. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, Vánky F. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 1976;18(4):421-31
88. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, Faldella A, Rege-Cambrin G, Thunberg U, Nilsson K, Caligaris-Cappio F. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res.* 1999;23(2):127-36.
89. Kubonishi I, Niiya K, Yamashita M, Yano S, Abe T, Ohtsuki Y, Miyoshi I. Characterization of a new human lymphoma cell line (RC-K8) with t(11;14) chromosome abnormality. *Cancer.* 1986;58(7):1453-60.
90. Dhut S, Gibbons B, Chaplin T, Young BD. Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the p190 bcr-abl chimaeric protein. *Leukemia.* 1991;5(1):49-55.
91. Cang S, Iragavarapu C, Savooji J, Song Y, Liu D. ABT-199 (venetoclax) and BCL2-inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol.* 2015;8:129.
92. Levêque D, Carvalho MC, Maloisel F. Review. Clinical pharmacokinetics of bortezomib. *In Vivo.* 2007;21(2):273-8.
93. McKillop D, Partridge EA, Kemp JV, Spence MP, Kendrew J, Barnett S, Wood PG, Giles PC, Patterson AB, Bichat F, Guilbaud N, Stephens TC. Tumor penetration of

Gefitinib (Iressa), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(4):641-9.

94. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, Kolibaba KS, Furman RR, Rodriguez S, Chang BY, Sukbuntherng J, Izumi R, Hamdy A, Hedrick E, Fowler NH. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol.* 2013;31(1):88-94.

95. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, Spurgeon SE, Kahl BS, Bello C, Webb HK, Johnson DM, Peterman S, Li D, Jahn TM, Lannutti BJ, Ulrich RG, Yu AS, Miller LL, Furman RR. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase $p110\delta$, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(22):3390-7.

96. De Francia S, D'Avolio A, Ariaudo A, Pirro E, Piccione F, Simiele M, Fava C, Calcagno A, Di Perri G, Saglio G. Plasma and intracellular imatinib concentrations in patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Drug Monit.* 2014;36(3):410-2.

97. Tamura K, Mukai H, Naito Y, Yonemori K, Kodaira M, Tanabe Y, Yamamoto N, Osera S, Sasaki M, Mori Y, Hashigaki S, Nagasawa T, Umeyama Y, Yoshino T. Phase I study of palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in Japanese patients. *Cancer Sci.* 2016;107(6):755-63.

98. Zhang S, Zannikos P, Awada A, Piccart-Gebhart M, Dirix LY, Fumoleau P, Verhaeghe T, Francois M, De Porre P. Pharmacokinetics of tipifarnib after oral and intravenous administration in subjects with advanced cancer. *J Clin Pharmacol.* 2006;46(10):1116-27.

99. Kramkimel N, Thomas-Schoemann A, Sakji L, Golmard J, Noe G, Regnier-Rosencher E, Chapuis N, Maubex E, Vidal M, Avril M, Goldwasser F, Mortier L, Dupin N, Blanchet B. Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target Oncol.* 2016;11(1):59-69.

100. EMD Millipore Corporation. Guava easyCyte HT System User's Guide. Burlington, United States: EMD Millipore Corporation; 2012: 73-94.

101. Debacq-chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798-806.

102. Tonbo Biosciences. Ghost Dye Violet 450 [Internet]. San Diego, United States: Tonbo Biosciences; 2019 [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://www.tonbobio.com/ghost-dye-violet-510.html>
103. Qiagen. RNeasy Mini Handbook. 4th edition. Venlo, Netherlands: Qiagen; 2012: 4-71.
104. Life Technologies Corporation. SuperScript II Reverse Transcriptase. Carlsbad, United States: Life Technologies Corporation; 2010: 1-4.
105. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* 1994;6(10):986-94.
106. Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezzella F, Pierotti MA, Della Porta G. Bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood.* 1992;79(5):1291-8.
107. Yeo AT, Porco JA Jr, Gilmore TD. Bcl-X_L, but not Bcl-2, can protect human B-lymphoma cell lines from parthenolide-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2012;318(1):53-60.
108. Sun JZ, Lu Y, Xu Y, Liu F, Li FQ, Wang QL, Wu CT, Hu XW, Duan HF. Epidermal growth factor receptor expression in acute myelogenous leukaemia is associated with clinical prognosis. *Hematol Oncol.* 2012;30(2):89-97.
109. Liu Y, Dong Y, Jian QL, Zhang B, Hu AM. Bruton's tyrosine kinase: potential target in human multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(1):177-81.
110. Li PP, Lu K, Geng LY, Zhou XX, Li XY, Wang X. Bruton's tyrosine kinase inhibitor restrains Wnt signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):4934-8.
111. Kozaki R, Vogler M, Walter HS, Jayne S, Dinsdale D, Siebert R, Dyer MJS, Yoshizawa T. Responses to the selective Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) inhibitor tirabrutinib (ONO/GS-4059) in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Cancers (Basel).* 2018;10(4):E127.
112. Chen Y, Wang T, Du J, Li Y, Wang X, Zhou Y, Yu X, Fan W, Zhu Q, Tong X, Wang Y. The critical role of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in Shikonin-induced apoptosis

and proliferation inhibition of chronic myeloid leukemia. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(3):981-93.

113. Liu X, Wang A, Liang X, Chen C, Liu J, Zhao Z, Wu H, Deng Y, Wang L, Wang B, Wu J, Liu F, Fernandes SM, Adamia S, Stone RM, Galinsky IA, Brown JR, Griffin JD, Zhang S, Loh T, Zhang X, Wang W, Weisberg EL, Liu J, Liu Q. Characterization of selective and potent PI3K δ inhibitor (PI3KDIN-015) for B-cell malignancies. *Oncotarget*. 2016;7(22):32641-51.

114. Tarantelli C, Gaudio E, Arribas AJ, Kwee I, Hillmann P, Rinaldi A, Cascione L, Spriano F, Bernasconi E, Guidetti F, Carrassa L, Pittau RB, Beaufile F, Ritschard R, Rageot D, Sele A, Dossena B, Rossi FM, Zucchetto A, Taborelli M, Gattei V, Rossi D, Stathis A, Stussi G, Broggin M, Wymann MP, Wicki A, Zucca E, Cmiljanovic V, Fabbro D, Bertoni F. PQR309 is a novel dual PI3K/mTOR inhibitor with preclinical antitumor activity in lymphomas as a single agent and in combination therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(1):120-9.

115. Vaqué JP, Navascues J, Shiio Y, Laiho M, Ajenjo N, Mauleon I, Matallanas D, Crespo P, León J. Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1112-22.

116. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(20):1536-46.

117. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12072-7.

118. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):94-101.

119. Tsimberidou AM, Chandhasin C, Kurzrock R, Tsimberidou AM, Chandhasin C, Kurzrock R. Farnesyltransferase inhibitors: where are we now? *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(12):1569-80.

120. Nagai T, Ohmine K, Fujiwara S, Uesawa M, Sakurai C, Ozawa K. Combination of tipifarnib and rapamycin synergistically inhibits the growth of leukemia cells and overcomes resistance to tipifarnib via alteration of cellular signaling pathways. *Leuk Res*. 2010;34(8):1057-63.

121. Boehrer S, Adès L, Braun T, Galluzzi L, Grosjean J, Fabre C, Le Roux G, Gardin C, Martin A, de Botton S, Fenaux P, Kroemer G. Erlotinib exhibits antineoplastic off-target effects in AML and MDS: a preclinical study. *Blood*. 2008;111(4):2170-80.
122. Stegmaier K, Corsello SM, Ross KN, Wong JS, Deangelo DJ, Golub TR. Gefitinib induces myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(8):2841-9.
123. Diaz-Flores E, Comeaux EQ, Kim KL, Melnik E, Beckman K, Davis KL, Wu K, Akutagawa J, Bridges O, Marino R, Wohlfeil M, Braun BS, Mullighan CG, Loh ML. Bcl-2 is a therapeutic target for hypodiploid B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2019;79(9):2339-51.
124. Milanovic M, Yu Y, Schmitt CA. The senescence–stemness alliance – a cancer-hijacked regeneration principle. *Trends Cell Biol*. 2018;28(12):1049-61.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Friederike Schömig, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zelluläre Seneszenz induziert durch neue zielgerichtete Therapien selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt zuvorderst Herrn Professor Clemens Schmitt für die Überlassung dieser herausfordernden wissenschaftlichen Arbeit, seine stetige Unterstützung auch in schwierigen Phasen des Projekts sowie die anregenden Diskussionen mit ihm.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern der von Herrn Professor Schmitt geleiteten Arbeitsgruppe für ihre ständige Hilfe im Erlernen der Methoden der Molekularbiologie sowie für ihre konstruktiven Vorschläge zur Optimierung des Projekts danken. Hier möchte ich insbesondere Katharina Pardon, Dimitri Belenki, Martin Schönlein, Dorothy Fan sowie Stefanie Brückner hervorheben.

Meinen Eltern, Ulrike und Edgar Schömig, sowie meinen Geschwistern, Charlotte und Thomas Schömig, danke ich für ihren bedingungslosen Rückhalt, ihre beständige Geduld und ihre zielführenden Ratschläge, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.