

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion Dermatologische Onkologie Hautklinik

**Einfluss Apoptose-regulierender Proteine der BCL-2-
Familie auf die Seneszenzinduktion in Tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Meurer, Amelie Johanna

2022

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Thomas Wieder
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 20.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III

1. EINLEITUNG 1

1.1 Krebstherapie im Wandel	1
1.2 Seneszenz.....	3
1.2.1 Replikative und Physiologische Seneszenz	3
1.2.2 Stress-induzierte Formen von Seneszenz	5
1.2.3 Merkmale seneszenter Zellen	8
1.3 Apoptose	10
1.3.1 Charakteristika und Pathways der Apoptose.....	10
1.3.2 Die Rolle von Proteinen der BCL-2-Familie in der Apoptose	15
1.4 Die „Entscheidung“ zwischen Apoptose und Seneszenz.....	16
1.5 Die HCT-116-Zelllinie und Doxorubicin	18
1.6 Fragestellung.....	19

2. MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterial	23
2.1.3 Reagenzien und Kits	24
2.1.4 Antikörper.....	26
2.1.5 Primer	26
2.1.6 HCT-116-Zellen.....	27

2.2 Methoden	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 Behandlung der Zellen	30
2.2.3 In-vitro Growth-Arrest-Assays	31
2.2.4 XTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität	32
2.2.5 LDH-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	32
2.2.6 Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Assay	34
2.2.7 Western Blot.....	35
2.2.8 Aktivitätsbestimmung der Caspase 3	38
2.2.9 Durchflusszytometrie nach TMRE und Annexin.....	39
2.2.10 Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	41
2.2.11 Statistische Auswertung.....	43
3. ERGEBNISSE	44
3.1 Kontrolle der Expression Apoptose-relevanter Proteine in den HCT-116-Zelllinien	44
3.1.1 Bestimmung der Bax- und Bak-Expression.....	44
3.1.2 Western Blot zum Nachweis der Caspase 3 in den HCT-116-Zellen ...	45
3.2 Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf Apoptose- und Seneszenzinduktion in den HCT-116-Zelllinien	46
3.2.1 Effekte von IFN- γ und TNF- α auf die Zellviabilität und den Zelltod.....	46
3.2.2 Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf das Wachstumsverhalten im Growth Arrest Assay.....	50
3.2.3 qPCR für CXCL-10 zur Kontrolle des IFN- γ -Signalwegs in den HCT-116-Zellen	51
3.3 Einfluss des Zytostatikums Doxorubicin auf die Induktion von Apoptose und Seneszenz in HCT-116-Zellen	53
3.3.1 Einfluss von Doxorubicin auf Zellviabilität und Zelltod.....	53
3.3.2 Einfluss von Doxorubicin auf den Zelltod im LDH-Test	54

3.3.3 Untersuchung der Zelltodinduktion in der Durchflusszytometrie und im Caspase-3-Assay	55
3.3.4 Effekte von Doxorubicin auf das Wachstumsverhalten der HCT-116-Zellen	59
3.3.5 Beurteilung der Seneszenzinduktion durch Doxorubicin im SA- β -Galactosidase-Assay	62
3.3.6 Untersuchung im Vergleich mit HCT-116 Bax-Bak-Doppelknockout-Zellen	65
4. DISKUSSION	68
4.1 Methodendiskussion.....	69
4.1.1 Zellkultur	69
4.1.2 Charakterisierung von Zellviabilität und Zelltod.....	71
4.1.3 Bestimmung von Seneszenz.....	73
4.2 Ergebnisdiskussion	74
4.2.1 Seneszenzfähigkeit der HCT-116-Zellen	74
4.2.2 Einfluss einer Bax-Defizienz auf Apoptose- und Seneszenzinduktion .	77
4.2.3 Zusätzliche Effekte eines Bax-und Bak-Doppel-Knockouts	79
4.3 Ausblick: Nutzung des Einflusses der BCL-2-Familie auf Seneszenz und Apoptose in der Tumorthherapie	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	83
6. LITERATUR	85
7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	103
8. DANKSAGUNG.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Replikative und Physiologische Seneszenz	5
Abbildung 2	Formen der Stress-induzierten Seneszenz	7
Abbildung 3	Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Pathway	13
Abbildung 4	Expression von Bak und Bax in HCT-116-Zellen	45
Abbildung 5	Expression von Procaspase 3 in HCT-116-Zellen	46
Abbildung 6	Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf Zellmorphologie und Viabilität	47
Abbildung 7	Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf die Induktion von Zelltod	49
Abbildung 8	Growth-Arrest-Assay der HCT-116-Zellen nach TH1-Zytokin-Behandlung	50
Abbildung 9	Expression von CXCL-10 nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α	52
Abbildung 10	Einfluss von Doxorubicin auf die Zellviabilität	53
Abbildung 11	Einfluss von Doxorubicin auf Zelltodinduktion	54
Abbildung 12	Nachweis von TMRE zur Zelltodanalyse	56
Abbildung 13	Durchflusszytometrische Messung der Annexin-Bindung an HCT-116-Zellen mittels APC	57
Abbildung 14	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Caspase-3-Assay	59
Abbildung 15	Morphologie nach Doxorubicin-Behandlung	60
Abbildung 16	Wachstumsverhalten der HCT-116-Zellen unter Doxorubicin-Behandlung	61
Abbildung 17	SA- β -Galactosidase-Assay	64
Abbildung 18	Zelltodinduktion durch Doxorubicin in DKO-Zellen im Vergleich zu WT und Bax ^{-/-}	66
Abbildung 19	Effekte von Doxorubicin auf Seneszenzinduktion in DKO-Zellen im Vergleich zu WT und Bax ^{-/-}	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Geräte	21
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 3	Reagenzien und Kits	24
Tabelle 4	Verwendete Antikörper für den Western Blot	26
Tabelle 5	Basensequenzen der verwendeten Primer	26
Tabelle 6	Zusammensetzung des modifizierten RPMI- Zellkultur-Mediums	28
Tabelle 7	Rezepturen für den Western Blot	35
Tabelle 8	Zusammensetzung der Gele	37

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis-inducing Factor
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating Factor 1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	anti-sense
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
ATR	ATM- and Rad3-Related
Bak	BCL-2-homologous Antagonist/Killer
Bax	BCL-2-associated X Protein
Bax ^{-/-}	Bax-defiziente Zellen
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-X _L	B-Cell Lymphoma extra large
BH	BCL-2-Homology
(t)Bid	(truncated) BH3 interacting-domain death agonist
BIM	BCL-2 interacting Mediator of Cell Death
BP	Basenpaare
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal (an der freien COOH-Gruppe)
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Zyclin-abhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases)
CIS	Zytokin-induzierte Seneszenz
C _T	Zyklusschwelle (cycle threshold)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCL-10	IFN-inducible protein 10 (C-X-C motif chemokine 10)

CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 / IL-8-Rezeptor beta
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA Damage Response
DFF	DNA Fragmentation Factor
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DKO	Doppel-Knockout (von Bak und Bax)
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNTM3a	DNA-Methyltransferase 3 alpha
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Endo-G	Endonuclease G
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated Death Domain
Fas(L)	First apoptosis signal (Ligand)
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCT	Human Colon Cancer
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRAS	Harvey Rat sarcoma virus GTPase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
INPP4B	Inositolpolyphosphat-4-phosphatase, Typ II
JAK	Janus-Kinase
lat.	lateinisch

LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7 (Brustkrebs-Zelllinie)
MCL-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein 1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLH-1	MutL Homolog 1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MW	(arithmetischer) Mittelwert
n	Anzahl der technical replicates
N-terminal	Amino-terminal (an der freien Aminogruppe)
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	Nuclear factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
OD	optische Dichte
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
p (p0, p1, p2)	Passage
p16 ^{INK4A}	Zyclin-abhängige Kinasen-Inhibitor 2A (CDKN2A)
p21 ^(Cip1)	Zyclin-abhängige Kinasen-Inhibitor 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
(q)PCR	(quantitative) Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed cell death Protein 1
PE	Phycoerythrin
pH	Potenzial des Wasserstoffs
PICS	PTEN loss-induced cellular senescence
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene

RB	Retinoblastom
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
se	sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins
T	Thymin
TBP	TATA-Box Binding Protein
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline with Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH1	T-Helfer-1
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV (A/B/C)	Ultraviolettstrahlung (A/B/C)
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser

WT

Wildtyp

XTT

2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphenyl)-(2H)-
Tetrazolium-5-Carboxanilid

1. Einleitung

1.1 Krebstherapie im Wandel

Im Jahre 1971 rief der amerikanische Präsident Richard Nixon in einer Rede an die Nation den *War on Cancer*, den Krieg gegen Krebs, aus. Doch trotz großer Investitionen in die Krebsforschung gehen auch heute, 50 Jahre später, noch ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland auf Tumore zurück; die Inzidenz von Tumorerkrankungen ist seitdem sogar deutlich gestiegen (Statistisches Bundesamt, 2021). Auch wenn einzelne Tumorentitäten wie Hodgkin-Lymphome oder Hodenkrebs heutzutage selbst bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium häufig geheilt werden können, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei metastasiertem Darmkrebs immer noch bei nur ca. 16%, bei metastasiertem Bronchialkarzinom sind es sogar nur ca. 7% (National Cancer Institute, USA, 2021).

Von den Anfängen der Krebstherapie bis heute gilt die vollständige Beseitigung des Tumorgewebes als ideales Ziel der Behandlung; der Goldstandard hierfür ist bei den meisten soliden Tumoren die chirurgische Entfernung (Sporn, 1996). Zudem wird versucht, Tumorzellen über Schädigung ihrer DNA abzutöten – durch Bestrahlung oder medikamentös mittels Chemotherapie (Sorenson et al., 1990; Hickman et al., 1994). Eine neuere Entwicklung sind die sogenannten *targeted therapies*, also gezielte Therapien, bei denen bestimmte Strukturen des Tumors, z.B. überexprimierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren, durch monoklonale Antikörper angegriffen werden. Auch diese Behandlung zielt vor allem auf eine Zerstörung der Tumorzellen, beispielsweise durch Antikörper- oder Komplement-abhängige Zytotoxizität oder durch Induktion von Apoptose, ab (Boross und Leusen, 2012; Salles et al., 2017).

Nachteil der bisherigen Therapien ist zum einen die häufige Resistenzbildung gegen die eingesetzten Medikamente: So ist die Chemotherapie mit Taxanen oder Anthrazyklinen heutzutage die Standardtherapie bei Triple-negativem Brustkrebs, jedoch entwickelt ein großer Teil der Patientinnen spätestens

innerhalb von drei bis fünf Jahren eine Resistenz (Nedeljković und Damjanović, 2019). In malignen Melanomen führen BRAF-/MEK-Inhibitoren als Vertreter der *targeted therapies* zu teils beeindruckendem Schrumpfen der Tumormasse, allerdings kommt es auch hier häufig zu einer Resistenzbildung mit rasanter Rückkehr des Tumors (Kozar et al., 2019). Außerdem können Bestrahlung und Chemotherapie, aber auch *targeted therapies*, zu teils lebensbedrohlichen Nebenwirkungen führen, die in vielen Fällen therapielimitierend sind – von Panzytopenien mit konsekutiver Immunschwäche bis hin zu Pankreatitiden oder Strahlennekrosen.

In den letzten Jahren kamen als neue Säule der Tumorthherapie die Immun-Checkpoint-Inhibitoren hinzu. Diese Medikamente basieren darauf, dass bestimmte Oberflächenproteine auf T-Zellen, sogenannte Immun-„Checkpoints“, die Immunantwort bremsen, um überschießende Reaktionen des Immunsystems zu verhindern. Allerdings kann dadurch auch die Tumorbekämpfung durch das Immunsystem abgeschwächt werden. Durch Inhibition dieser Oberflächenproteine wie CTLA-4 oder PD-1 werden die T-Zellen „enthemmt“ und können stärker auf Tumore reagieren (Walunas et al., 1994; Carter et al., 2002; Schreiber et al., 2011). 2011 kam als erster Immun-Checkpoint-Inhibitor der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab auf den Markt, später folgten PD-1-Antikörper wie Nivolumab und Pembrolizumab. Vor allem in der Behandlung von metastasierten malignen Melanomen, die nur sehr schlecht auf die Standard-Chemotherapie mit Dacarbazin ansprechen, konnten durch die Immun-Checkpoint-Inhibitoren große Erfolge erzielt werden (Robert et al., 2015; Carreau und Pavlick, 2019). Aber auch bei metastasierten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen verlängert Pembrolizumab das Überleben (Reck et al., 2016). Durch die Disinhibition des Immunsystems zeigt sich in der Behandlung zunächst vor allem ein zytoreduktiver Effekt, der durch die Induktion von Zelltod im Tumor erklärt werden kann. Interessanterweise bleibt bei einem Teil der Patient*innen im Anschluss ein stabiler Tumorrest zurück, der nicht mehr wesentlich proliferiert, aber auch nicht weiter zurückgeht (Topalian et al., 2012). Dies könnte durch die sogenannte

Seneszenz erklärt werden, ein Ruhezustand der Zellen, in dem sie zwar nicht sterben, aber auch nicht weiter proliferieren (Wieder et al., 2017).

Seit ihrer Entdeckung wird die Seneszenz in der Wissenschaft sehr ambivalent betrachtet: Zum einen wird sie als unerwünschter Alterungsprozess gesehen, der zur Pathogenese diverser degenerativer Erkrankungen beiträgt, der dem Erfolg verschiedener Tumorthérapien im Weg steht und der teilweise sogar die Entstehung von Malignomen fördern kann. Andererseits werden aber auch große Hoffnungen in die Bedeutung der Seneszenz für die Kontrolle fortgeschrittener Tumorerkrankungen gesetzt. Statt einer kompletten Auslöschung des Tumors mit häufig lebensgefährlichen Nebenwirkungen könnte sie eine Kontrolle des Tumors in einem stabilen Zustand ermöglichen – ein neuartiger und womöglich erfolgversprechender Ansatz für die Krebstherapie (Wang et al., 2003; Ewald et al., 2010).

1.2 Seneszenz

1.2.1 Replikative und Physiologische Seneszenz

Im Jahre 1961 beschrieben zwei US-amerikanische Forscher erstmals, dass menschliche Fibroblasten in Kultur nur ca. 50 Zellteilungen durchlaufen können, bevor sie einen Wachstumsstillstand erreichen (Hayflick und Moorhead, 1961). Dieser Zustand wurde später als replikative Seneszenz (lat. *senescere* = altern) bezeichnet. Während dieses Phänomen zunächst von vielen Wissenschaftler*innen als Artefakt der Zellkultur abgetan wurde, weiß man heute, dass sich beim Menschen auch in vivo in alternden Geweben senescente Zellen ansammeln (Dimri et al., 1995; Ressler et al., 2006). An den Enden der menschlichen Chromosomen befinden sich Telomere, repetitive DNA-Sequenzen, die sich – wie in Abbildung 1 dargestellt – bei jeder Zellteilung etwas verkürzen. Sind die Telomere komplett abgebaut, ist nach einer bestimmten Zahl von Zellteilungen keine weitere Proliferation mehr möglich bzw. kommt es zu einer Schädigung der DNA (Harley et al., 1990). Bestimmte Proteine wie ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und ATR (ATM- and Rad3-Related) leiten

daraufhin eine sogenannte *DNA Damage Response* (DDR) ein, bei der über das Protein p53 ein Zellzyklusarrest bewirkt wird (D'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004). Eines der wichtigsten Ziele von p53 ist p21^{Cip1}, das Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) inhibiert und zu einem initial transienten Zellzyklusarrest führt. Bleibt eine Reparatur des Schadens aus und dauert der Wachstumsstillstand über längere Zeit an, wird p16^{INK4A} aktiviert, ebenfalls ein CDK-Inhibitor, der über Aktivierung des Retinoblastom-Gens (RB) zu einem permanenten Wachstumsstillstand führt (Stein et al., 1999; Rodriguez und Meuth, 2006).

Manche Zellen können der Alterung durch Telomerverkürzung aus dem Weg gehen, indem sie das Enzym Telomerase bilden, welches die Telomere verlängert und somit zu einer längeren Teilungsfähigkeit führt (Bodnar et al., 1998). Dieses Enzym ist beispielsweise in Keimzellen vorhanden, aber normalerweise nicht in somatischen humanen Zellen (Wright et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass manche Tumorzellen Telomerase bilden und somit ein Werkzeug besitzen, um die Seneszenz umgehen und sich weiter zu teilen (Shay und Bacchetti, 1997).

Seneszenz wird jedoch nicht nur durch Zellerterung und Telomerverkürzung verursacht; sie ist auch an der physiologischen Morphogenese bestimmter Gewebe in der Embryonalentwicklung beteiligt, beispielsweise des Mesonephros (Urnieren) oder des Saccus endolymphaticus im Innenohr (Nacher et al., 2006). Für die Induktion dieser programmierten, sogenannten physiologischen Seneszenz scheint vor allem p21^{Cip1} eine Rolle zu spielen. Während in p21-Knockout-Mäusen deutlich weniger seneszenten Zellen auftraten, schien der Knockout von p53 keinen Effekt auf diese Art von Seneszenz zu haben, sodass hier von einem p53-unabhängigen Signalweg ausgegangen wird. Auch p16^{INK4A} scheint hier keine Voraussetzung für den Wachstumsstillstand zu sein (Muñoz-Espín et al., 2013, Storer et al., 2013).

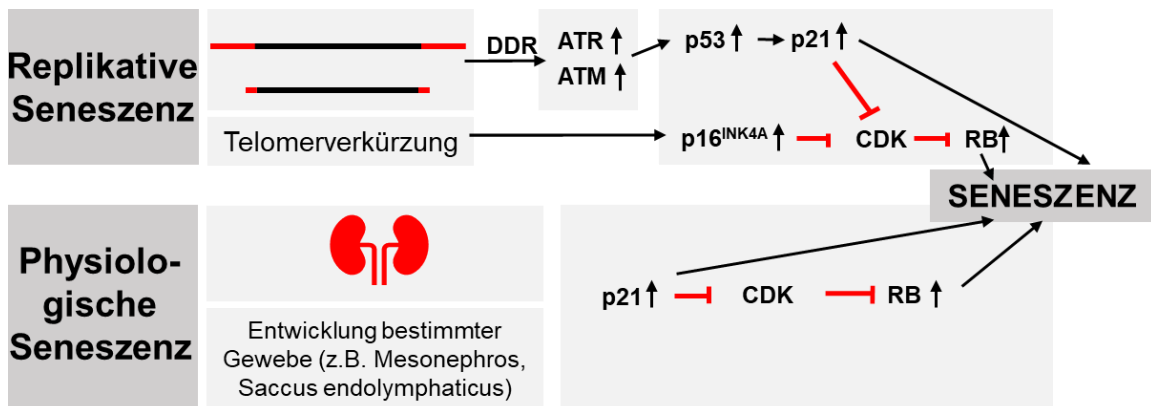


Abbildung 1: Replikative und Physiologische Seneszenz

Nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen kommt es zu einer zunehmenden Telomerverkürzung mit DNA-Schädigung. Dies führt über die DDR zur Aktivierung von ATR und ATM, die über p53 und p21, teilweise auch über p16^{INK4A}, zur relikativen Seneszenz führen. Die physiologische Seneszenz dient der embryonalen Entwicklung bestimmter Gewebe und wird über p21- und RB-Aktivierung eingeleitet.

ATM Ataxia Teleangiectasia Mutated, **ATR** ATM- and Rad3-Related, **CDK** Zyklin-abhängige Kinasen, **DDR** DNA Damage Response, **RB** Retinoblastom.

1.2.2 Stress-induzierte Formen von Seneszenz

Oft scheint Seneszenz auch eine Reaktion auf Stress zu sein oder einen Schutz vor Krebsentstehung zum Ziel haben. Ist in einer Zelle ein Onkogen wie HRAS durch eine Mutation überaktiv und bewirkt dadurch eine überschießende Proliferation der Zelle, kann dies zur Tumorentstehung beitragen (Bos, 1988). Wird jedoch mutiertes HRAS in gesunde Fibroblasten transfiziert, führt die hohe Mitogenität und wahrscheinlich die erhöhte Anzahl von DNA-Schäden bei Hyperproliferation zunächst zu einer DDR mit vermehrter Expression von p53 und p16^{INK4A} und somit, wie in Abbildung 2 zu sehen, zur OIS, der *Onkogen-induzierten Seneszenz* (Di Micco et al., 2006). Es sind weitere Mutationen von Seneszenz-relevanten Genen wie p53, p16^{INK4A} oder RB nötig, damit ein mutiertes HRAS zu dauerhaft erhöhter Zellproliferation führen kann (Serrano et al., 1997). Auch Mutationen des Onkogens BRAF führen zu einer OIS, wie z.B. in Nävi der Haut, die häufig eine BRAF^{V600E}-Mutation aufweisen. Allerdings führen hier DDR-unabhängige Signalwege zu einer Aktivierung von p16^{INK4A}

(Michaloglou et al., 2005). In Mäusen mit einem p16^{INK4A}-Knockout konnte eine erhöhte Rate an spontanen Tumoren beobachtet werden, was für eine Tumorprotektive Funktion der OIS spricht (Sharpless et al., 2001).

Der Verlust von Tumorsuppressorgenen wie PTEN kann über mTOR zu einer p53-abhängigen Seneszenz führen, die in der Literatur als PICS, *PTEN loss-induced cellular senescence*, bezeichnet wird (Chen et al., 2005; Alimonti et al., 2010). Für den Verlust anderer Tumorsuppressorgene wie Neurofibromin 1, RB oder INPP4B wurde ebenfalls eine DDR-abhängige Seneszenz-induzierende Wirkung beschrieben (Shamma et al., 2009; Gewinner et al., 2009; Nardella et al., 2011). Auch DNA-schädigende Tumorthherapie, beispielsweise Bestrahlung oder Chemotherapeutika wie Docetaxel, Bleomycin, Cyclophosphamid oder das Anthrazyklin Doxorubicin, können eine Seneszenz, die sogenannte *Therapie-induzierte Seneszenz* (TIS), bewirken, indem sie zu einer DDR mit einer vermehrten Expression von p53 sowie zur Aktivierung von p16^{INK4A} führen (te Poele et al., 2002, Ewald et al., 2010).

Eine neuere Entdeckung ist, dass auch das menschliche Immunsystem für die Seneszenzeinleitung eine Rolle spielen kann. Beispielsweise zeigten Patient*innen mit metastasiertem Melanom nach Transfusion autologer CD4-positiver T-Zellen eine stabile Remission (Hunder et al., 2008). Insbesondere den T-Helfer-1-Zytokinen *Interferon- γ* (IFN- γ) und *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α) kommt eine tragende Rolle bei der Tumorkontrolle durch T-Zellen zu (Müller-Hermelink et al., 2008). Sie dienen normalerweise vor allem der Immunabwehr gegen Viren, bestimmte Bakterien und Protozoen (Fitzgerald et al., 2001; Schroder et al., 2004). IFN- γ induziert den JAK-STAT-Pathway und führt neben einer Hochregulation der MHC-Oberflächenproteine Typ I und II auch zu einer Expression diverser antiviral oder apoptotisch wirkender Proteine, z.B. *IFN-inducible protein 10* (CXCL-10), welches als chemischer Lockstoff für Monozyten und T-Lymphozyten fungiert (Taub et al., 1993). TNF- α bindet an TNF-Rezeptor-1 und -2 und kann diverse Pathways aktivieren, unter anderem den NF- κ B-Signalweg, der zu Inflammation und Proliferation führt, aber auch den

extrinsischen Pathway der Apoptose, der den Tod der Zelle bewirkt (Wajant et al., 2003).

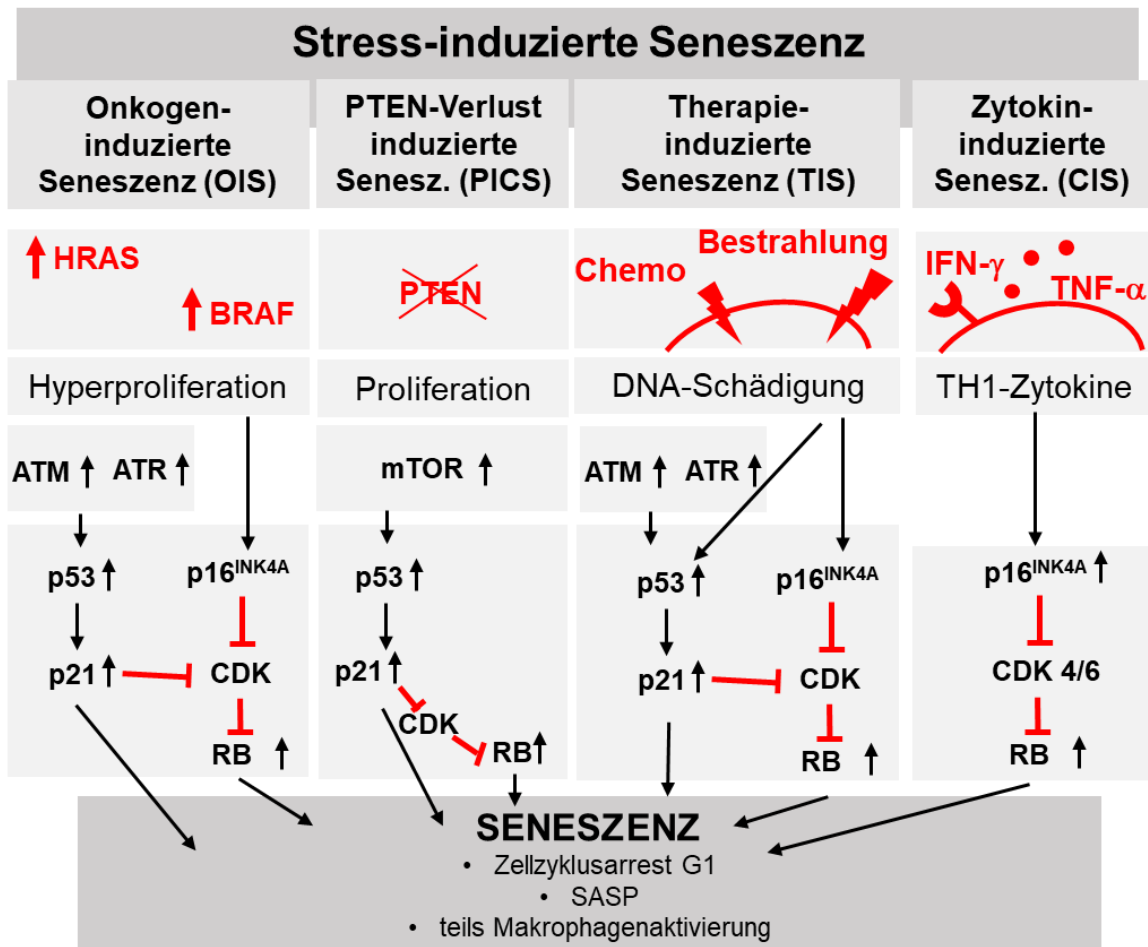


Abbildung 2: Formen der Stress-induzierten Seneszenz

Zur Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) kommt es durch überaktive Onkogene wie HRAS oder BRAF, die zu einer Hyperproliferation der Zelle führen. Über DNA-Schäden kommt es entweder zur Einleitung einer DDR mit p53-Aktivierung über ATM und ATR oder direkt zur Aktivierung des p16^{INK4A}/RB-Pathways. Verlust des Tumorsuppressors PTEN führt über mTOR und p53 zur PTEN-Verlust-induzierten Seneszenz (PICS). Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung bewirken über DNA-Schädigung und entweder den p53- oder den p16^{INK4A}/RB-Pathway die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS). Die Zytokine IFN-γ und TNF-α können über den p16^{INK4A}/RB-Pathway zur Zytokin-induzierten Seneszenz (CIS) führen.

ATM Ataxia Teleangiectasia Mutated, **ATR** ATM- and Rad3-Related, **BRAF** v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, **CDK** Zyklin-abhängige Kinasen, **DDR** DNA Damage Response, **HRAS** Harvey Rat sarcoma virus GTPase, **IFN-γ** Interferon-gamma, **mTOR** mammalian target of rapamycin, **PTEN** Phosphatase and Tensin homolog, **RB** Retinoblastom, **SASP** Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp, **TNF-α** Tumornekrosefaktor alpha.

Es konnte in Maustumoren gezeigt werden, dass IFN- γ und TNF- α kombiniert über den p16^{INK4A}/RB-Pathway die sogenannte *Zytokin-induzierte Seneszenz* (CIS) auslösen können; Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein des STAT1-Rezeptors sowie des TNF-Rezeptors 1 (Braumüller et al., 2013). Auch in humanen Zellmodellen konnte dies bestätigt werden (Hubackova et al., 2016; Rentschler et al., 2018). Die CIS ist insofern eine besondere Form der Seneszenz, als dass sie nicht primär Zell-intrinsisch durch DNA-Schäden, sondern durch einen externen Reiz in Form von Rezeptorbindung verursacht wird (Wieder et al., 2017).

1.2.3 Merkmale seneszenter Zellen

Die Seneszenz ist ein permanenter Wachstumsstillstand, bei dem die Zelle per definitionem in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert ist und nicht mehr weiter proliferiert, obwohl sie metabolisch aktiv bleibt (Di Leonardo et al., 1994). Im Gegensatz zu anderen Formen des Wachstumsstillstands wie der sogenannten *Quieszenz* kann die Seneszenz auch durch eine pro-mitogene Umgebung nicht wieder aufgehoben werden (Dimri und Campisi, 1994). Da zumindest physiologische Einflussfaktoren die Zellen normalerweise nicht mehr zur Proliferation bringen können, wird Seneszenz auch als *irreversibler* Zellzyklusarrest bezeichnet (Campisi, 2013). Jedoch kann beispielsweise die Inaktivierung des p53-Pathways zuvor seneszente Zellen, abhängig von deren p16^{INK4A}-Expression, wieder proliferieren lassen (Beauséjour et al., 2003, Dirac und Bernards, 2003). Der Zellzyklusarrest ist das zentrale Merkmal der Seneszenz, er kommt jedoch auch bei nicht-seneszenten Zellen vor, beispielsweise nach terminaler Differenzierung, und kann somit nicht allein zur Definition der Seneszenz herangezogen werden (Kuilman et al., 2010).

Neben dem Wachstumsstillstand besitzen seneszente Zellen meist diverse weitere Besonderheiten, die aber ebenfalls solitär betrachtet keine exklusiven Merkmale der Seneszenz darstellen: Typischerweise nehmen seneszente Zellen eine große und flache, Spiegelei-ähnliche Morphologie mit zahlreichen

Ausläufern an; häufig sind auch multiple Zellkerne zu finden (Serrano et al., 1997).

Seneszente Zellen weisen eine hohe Aktivität der sogenannten *Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase* (SA- β -Gal) auf (Dimri et al., 1995). Während diese lysosomale Hydrolase bei einem pH von 4,0 auch bei proliferierenden Zellen nachweisbar ist, ist sie bei einem suboptimalen pH von 6,0 normalerweise nur in seneszenten Zellen deutlich mittels Blaufärbung detektierbar, und zwar auch außerhalb der Lysosomen (Lee et al., 2006). Da sie sowohl in Zellkulturen als auch in Geweben relativ leicht anfärbbar ist, wird die SA- β -Gal seit nunmehr zwanzig Jahren als einer der wichtigsten Biomarker für Seneszenz verwendet (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Calcinotto et al., 2019).

Zudem können seneszente Zellen zahlreiche, oft pro-inflammatorische, Faktoren sezernieren, die nicht ihrem ursprünglichen Sekretom entsprechen (Campisi, 2005). Dieser sogenannte *Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp* (SASP) entwickelt sich einige Tage nach Induktion der Seneszenz und wird durch persistierende DNA-Schädigung stimuliert, besonders durch DDR-Proteine wie ATM, das DNA-Reparaturprotein Nibrin und das Tumorsuppressorgen CHK2 (Rodier et al., 2009). Der SASP enthält diverse Zytokine und Chemokine, Proteasen und Wachstumsfaktoren und ist ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal seneszenten Zellen von Zellen in anderen Formen des Wachstumsstillstands.

Die Rolle des SASP im Körper wird oft als zweischneidiges Schwert mit Vor- und Nachteilen angesehen (Zender und Rudolph, 2009). Einige der im SASP enthaltenen Faktoren wie IL-6 und IL-8 führen zu chronischer Inflammation und können eine Tumor-fördernde Wirkung auf die Zellen der Umgebung entfalten, indem sie das Wachstum und die Aggressivität umliegender präkanzeröser Zellen stimulieren (Coppé et al., 2008). So können seneszente Fibroblasten in umgebenden prämaligen Epithelzellen die Proliferationsrate, Migration und Invasivität erhöhen (Krtolica et al., 2001, Parrinello et al., 2005). Allerdings scheint eine weitere Funktion des SASP auch zu sein, umliegende Zellen in Seneszenz zu bringen und zu halten, da z.B. die enthaltenen Interleukine 6 und

8 u.a. durch Stimulation des Rezeptors CXCR2 Wachstumsstillstand fördern (Acosta et al., 2008, Kuilman et al., 2008). Weitere positive Effekte des SASP sind sein Beitrag zur Gewebeformung in der Embryonalentwicklung sowie seine Fibrose-hemmende Wirkung und die Förderung der Wundheilung, z.B. über den enthaltenen *Platelet-derived Growth Factor AA* (Krizhanovsky et al., 2008; Jun und Lau, 2010; Demaria et al., 2014).

Auf molekularer Ebene weisen seneszente Zellen typischerweise erhöhte Level an p16^{INK4A} und/oder p21^{Cip1} auf, die über die Inhibition von CDK zum Zellzyklusarrest führen (Calcinotto und Alimonti, 2017). Außerdem sind in seneszenten Zellen kondensierte, sogenannte Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) zu finden und z.B. mittels DAPI anfärbbar, die abhängig von RB pro-proliferative Transkriptionsfaktoren supprimieren (Narita et al., 2003).

1.3 Apoptose

1.3.1 Charakteristika und Pathways der Apoptose

Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der zunächst zu einer Kondensierung von DNA und Zellkern, später zu einer Fragmentierung der Zelle und einer raschen und geordneten Phagozytose durch umgebende Zellen führt (Kerr et al., 1972). Im Gegensatz dazu ist die Nekrose ein unkontrollierter und pathologischer Zelltod, bei dem es aufgrund der Unfähigkeit der Zelle, das Membranpotential aufrecht zu erhalten, zu einer Zellschwellung, zum Platzen der Zelle und zur Freisetzung von Zellbestandteilen in die Umgebung kommt, was eine Inflammation im umliegenden Gewebe zur Folge hat (Leist und Jäättelä, 2001).

Die Apoptose ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus und hat in multizellulären Organismen einen wesentlichen Anteil an der physiologischen Homöostase von Geweben, an der Embryonalentwicklung und an der Befreiung des Organismus von infizierten oder entarteten Zellen (Zou und Niswander, 1996; Elmore, 2007; Goldar et al., 2015). Defekte in der Apoptose können beim

Menschen zu Entwicklungsstörungen, Autoimmunerkrankungen oder Tumoren führen (Mountz et al., 1994; Fulda, 2010; Hassan et al., 2014). Die Umgehung der Apoptose wird als eines der prominentesten Merkmale bzw. *Hallmarks* von Malignomen angesehen (Hanahan und Weinberg, 2000); sie ist auch eine Hauptursache für deren häufige Resistenz gegen Chemotherapeutika (Chen et al., 2018).

Typische Charakteristika der Apoptose umfassen das pyknotische Schrumpfen der Zelle, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensierung, während die Zellmembran zunächst intakt bleibt (Häcker, 2000; Saraste und Pulkki, 2000; Kroemer und Martin, 2005). Die Zellmembran kann aufgrund des Abbaus der intrazellulären Strukturproteine Bläschen, sogenannte Blebs, ausbilden. Später teilt sich die Zelle in mehrere Apoptosekörperchen auf, die Zellorganellen oder Kernbestandteile enthalten und deren Plasmamembran immer noch intakt ist. Das Phospholipid Phosphatidylserin, das normalerweise nur auf der inneren Seite der Zellmembran vorhanden ist, wird durch sogenannte Flippasen auf die äußere Membranseite gekehrt; hierdurch werden die apoptotischen Zellen bzw. Apoptosekörperchen von Makrophagen erkannt und phagozytiert (Hengartner, 2001; van Cruchten und van den Broeck, 2002).

Als Hauptmerkmal der Apoptose wird häufig die Aktivierung von Cysteinproteasen, die ihr Substrat C-terminal von Aspartat spalten, sogenannten Caspasen, angesehen (Alnemri et al., 1996). Diese liegen normalerweise in der Zelle in inaktiver Form, als Zymogene, vor und bilden eine Enzymkaskade, bei der zunächst die Initiatorcaspasen wie Caspase 8, 9 oder 10 autokatalytisch aktiv werden müssen. Die Initiatorcaspasen aktivieren im Anschluss Effektorcaspasen wie Caspase 3, 6 und 7. Diese können diverse zelluläre Proteine spalten, z.B. Strukturproteine wie Aktin und Lamin, aber auch den *DNA Fragmentation Factor* (DFF), der durch Abspaltung seiner α -Untereinheit aktiv wird und dann zur DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation führt (Enari et al., 1998; Liu et al., 1998; Shi, 2002).

Die Aktivierung der Caspasen kann vorwiegend über zwei verschiedene Pathways eingeleitet werden (s. Abb. 3). Beim extrinsischen Pathway bindet ein

sogenannter Todesligand wie $TNF-\alpha$, Fas-Ligand oder *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) an einen Todesrezeptor wie CD95 (auch: Fas), TNF-Rezeptor Typ 1 oder den TRAIL-Rezeptor auf der Zellmembran (Jin und El-Deiry, 2005). Nach Aktivierung des Todesrezeptors kommt es zur Rekrutierung der *Fas-associated death domain* (FADD) bzw. *TNF receptor-associated death domain* (TRADD) und der Procaspase 8 und/oder 10, die zusammen den *death-inducing signaling complex* (DISC) bilden. Durch den DISC kann die Procaspase 8/10 in aktive Caspase 8/10 umgewandelt werden. Diese spaltet dann unter anderem die Caspase 3, wodurch die Caspasenkaskade aktiviert und die Apoptose eingeleitet wird (Guicciardi und Gores, 2009; Pistritto et al., 2016).

Zum intrinsischen Pathway kommt es durch eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Ursache ist meist eine irreparable DNA-Schädigung, beispielsweise aufgrund von oxidativem Stress, ionisierender Strahlung oder Chemotherapie (Green und Kroemer, 2004; Kroemer et al., 2007). Diese führt zu einer Aktivierung von p53, welches die Transkription bestimmter pro-apoptotischer Proteine aus der BCL-2-Familie fördert und zu einer Aktivierung von Bax und Bak führt. Diese bewirken eine Porenbildung in den Mitochondrien und somit eine Freisetzung von Cytochrom C. Das Cytochrom C bindet im Zytosol an den *apoptosis protease-activating factor 1* (Apaf-1) und Procaspase 9, wodurch sich das sogenannte Apoptosom bildet, was dem DISC des extrinsischen Pathways ähnelt. Innerhalb dieses Apoptosoms kann die Caspase 9 aktiviert werden, die nun ebenfalls die Caspasen-Kaskade aktiviert, beginnend mit der Caspase 3 (Shi, 2002).

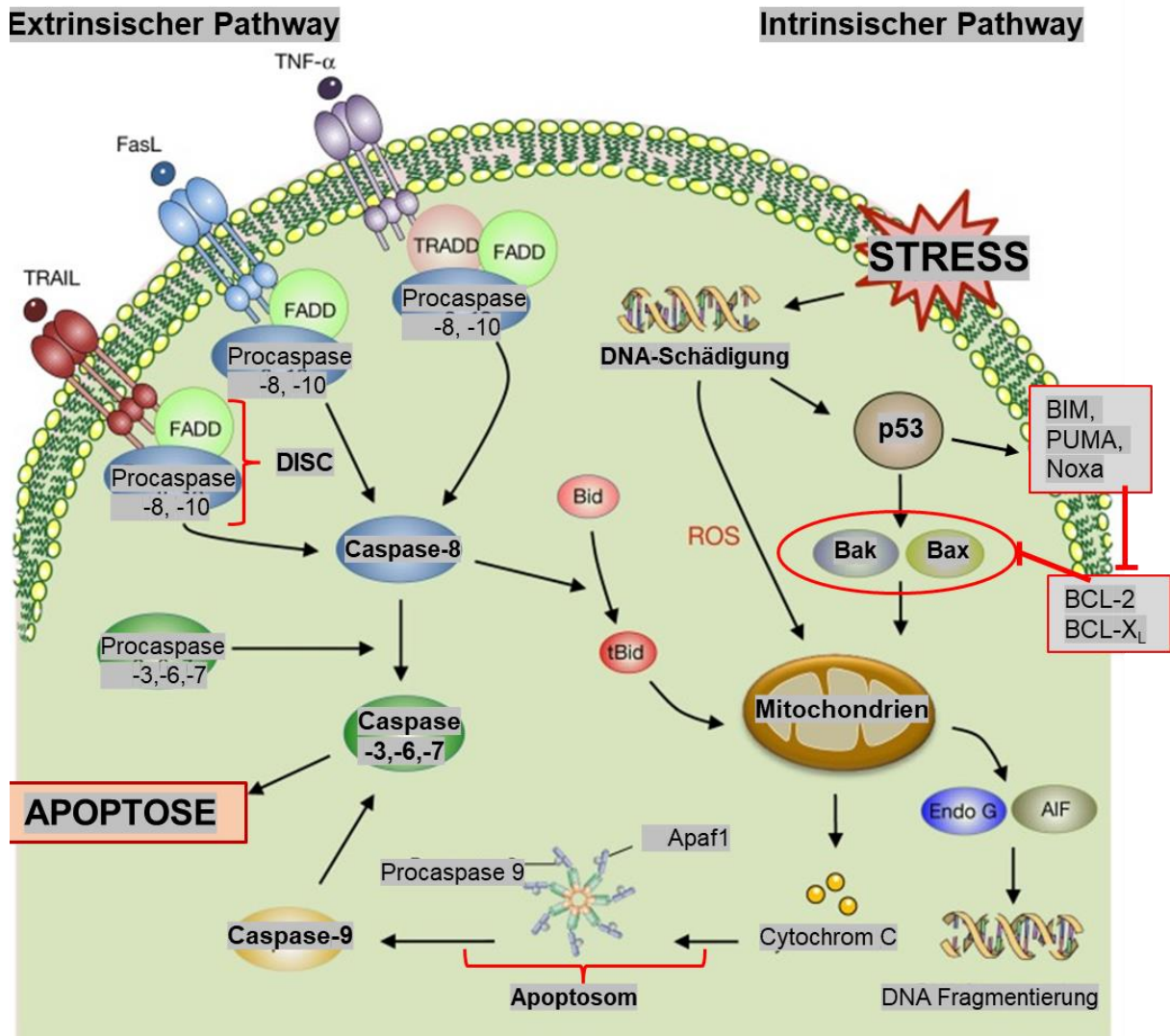


Abbildung 3: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Pathway

Die Apoptose kann einerseits über den extrinsischen Weg eingeleitet werden, bei dem ein Ligand wie TRAIL, FasL oder TNF- α an die entsprechenden Rezeptoren bindet und zur Bildung eines DISC führt, der die Caspase 8 aktiviert. Diese spaltet Procaspase 3, 6 und 7 und führt so zur Apoptose. Beim intrinsischen Weg führen diverse Stressoren zu DNA-Schädigung, dies aktiviert p53, welches zum einen direkt über Aktivierung von Bax und Bak zur Permeabilisierung der Mitochondrien und Cytochrom-C-Austritt führt, zum anderen indirekt über Stimulation von BH3-only-Proteinen wie BIM, PUMA oder Noxa, die anti-apoptotische Proteine wie BCL-2 inhibieren. Der Cytochrom-C-Austritt führt zur Bildung eines Apoptosoms mit Apaf1, was zur Spaltung der Procaspase 9 führt, die ebenfalls die Caspasenkaskade einleitet und zur Apoptose führt. Die Caspase 8 aus dem extrinsischen Weg kann über Spaltung von Bid auch den intrinsischen Weg aktivieren.

AIF Apoptosis-inducing factor, **Apaf1** Apoptosis protease-activating factor 1, **Bak** Bcl-2 homologous killer, **Bax** Bcl-2 associated X protein, **BCL-2** B-cell lymphoma 2, **BCL-X_L** B-cell lymphoma extra large, **(t)Bid** (truncated) BH3 interacting-domain death agonist, **BIM** BCL-2-interacting mediator of cell death, **DISC** Death-inducing signaling complex, **Endo G**

Endonuclease G, **FADD** Fas-associated death domain, **FasL** First Apoptosis Signal-Ligand, **PUMA** p53 upregulated mediator of apoptosis, **ROS** reaktive Sauerstoffspezies, **TNF- α** Tumornekrosefaktor- α , **TRADD** TNF-receptor-associated death domain, **TRAIL** TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Modifiziert nach Iranpour et al., 2016.

Der extrinsische und intrinsische Pathway laufen jedoch nicht streng getrennt voneinander ab, sondern besitzen zahlreiche Interaktionen. So konnte gezeigt werden, dass auch für eine Apoptose über den extrinsischen Aktivierungsweg eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und eine Aktivierung des Apoptosoms erforderlich sein kann, da die Caspase-8-Aktivität allein oft nicht ausreichend ist, um die Caspase 3 in genügendem Ausmaß zu spalten. Der Zwischenschritt erfolgt über die Aktivierung des Proteins Bid aus der BCL-2-Familie durch die Caspase 8, das wiederum zu einem Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt (Danial und Korsmeyer, 2004).

Zudem gibt es auch Mechanismen im Prozess der Apoptoseeinleitung, die unabhängig von Caspasen ablaufen. Oxidativer Stress und Porenbildung in der Mitochondrienmembran führen beispielsweise auch zu einer Aktivierung und Migration der Proteine Apoptosis-inducing factor (AIF) und Endonuclease G (Endo-G) aus den Mitochondrien in den Zellkern, wo sie eine DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensierung bewirken (Joza et al., 2008; Vařecha et al., 2012).

Nichtsdestotrotz scheint vor allem die Caspase 3 bei der Apoptose eine essenzielle Rolle einzunehmen: In MCF-7-Zellen, die aufgrund einer Deletion im Exon 3 des CASP3-Gens nicht mehr über eine funktionierende Caspase 3 verfügen, konnten Mikroinjektionen des Apoptose-auslösenden Cytochrom C keine Apoptose auslösen; nach Transfektion eines für Procaspase 3 codierenden Plasmiden jedoch wurde die Apoptosefähigkeit wiederhergestellt (Li et al., 1997). Zudem zeigen MCF-7-Zellen auch unter Stimulation mit TNF- α keine Apoptose-typische DNA-Fragmentierung und kein Blebbing der Membran, was ebenfalls durch die Transfektion eines für Procaspase 3 codierenden Plasmiden rückgängig gemacht werden kann (Jänicke et al., 1998).

1.3.2 Die Rolle von Proteinen der BCL-2-Familie in der Apoptose

Die *B cell lymphoma 2* (BCL-2)-Familie spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung des intrinsischen Apoptose-Pathways, da sie die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran reguliert. Sie enthält sowohl pro- also auch anti-apoptotische Proteine, die miteinander interagieren. Sie besitzen eine oder mehrere der insgesamt vier hochkonservierten *BCL-2-Homology* (BH)-Domänen BH-1, BH-2, BH-3 und BH-4 (Shamas-Din et al., 2013; Kvensakul und Hinds, 2014).

Die BCL-2-Familie lässt sich in drei Gruppen unterteilen: Eine Gruppe umfasst Proteine, die bei der Initiierung der Apoptose mitwirken. Diese enthalten nur die BH-3-Domäne und werden daher auch *BH-3-only*-Proteine genannt. Ihre Transkription wird beispielsweise durch p53 gefördert und sie führen zu einer Disinhibition der Apoptose. Wichtige Vertreter der BH-3-only-Proteine sind Bid, BIM, PUMA und Noxa (Czabotar et al., 2014). Die zweite Gruppe besteht hauptsächlich aus den Apoptose-Effektoren Bax (BCL-2 associated X protein) und Bak (BCL-2 antagonist/killer), die multiple BH-Domänen besitzen und durch Formung von Oligomeren Poren in der Mitochondrienmembran bilden können, durch die Cytochrom C ins Zytosol entweichen kann. In proliferierenden Zellen sind Bax und Bak meist durch die dritte Gruppe der BCL-2-Familie gehemmt. Diese ist anti-apoptotisch und beinhaltet ebenfalls Proteine mit multiplen BH-Domänen, die jedoch das Überleben der Zelle fördern sollen, beispielsweise BCL-2, BCL-X_L oder MCL-1 (Pistritto et al., 2016).

Defekte und Fehlregulationen der BCL-2-Familie können die Malignomentstehung fördern. So liegt beispielsweise in über 90% der folliculären Lymphome eine Translokation zwischen Chromosom 14 und 18 vor, die zu einer Überexpression von BCL-2 und somit zu einer Apoptoseresistenz des Tumors führt (Tsujimoto et al., 1984). Viele Malignome weisen außerdem eine Amplifizierung der Anti-Apoptose-Proteine BCL-X_L oder MCL-1 auf (Fernández-Marrero et al., 2016). Einige Tumore besitzen Deletionen oder Promotor-Hypermethylierungen der BH-3-only-Proteine BIM oder PUMA (Tagawa et al., 2005; Zantl et al., 2007).

Da der intrinsische Apoptose-Pathway essenziell für die Reaktion der Zelle auf Chemotherapie oder Bestrahlung ist, tragen Defekte der BCL-2-Familie auch häufig zur Therapieresistenz von Tumoren bei. Die Expression der BH-3-only-Proteine PUMA, Noxa oder BIM hat beispielsweise eine große Relevanz für das Ansprechen von Tumoren auf Chemotherapeutika, aber auch Tyrosinkinaseinhibitoren oder Glucocorticoide (Happo et al., 2010; Bachmann et al., 2005; Kuroda et al., 2006).

Aufgrund der hohen Relevanz für Tumorwachstum und Zelltod sind die Proteine der BCL-2-Familie heute das Ziel moderner Therapieansätze. Venetoclax ist beispielsweise ein BH-3-Mimetikum, das an das anti-apoptotische Protein BCL-2 bindet, dieses somit inaktiviert und die Apoptose der Zelle fördert. Besonders bei der chronischen lymphatischen Leukämie konnten mit Venetoclax deutliche Fortschritte in der Therapie erzielt werden (Schieber und Ma, 2019; Rohner et al., 2020). Erste Inhibitoren von MCL-1, das eine besonders hohe anti-apoptotische Potenz besitzt und in diversen Tumoren überexprimiert ist, wurden auch bereits entwickelt und zeigten Erfolge (Kotschy et al., 2016).

1.4 Die „Entscheidung“ zwischen Apoptose und Seneszenz

Eine Schädigung der DNA kann, wie bereits oben beschrieben, sowohl über die DDR zur Seneszenz als auch über den intrinsischen Pathway zur Apoptose der Zelle führen. Da die Apoptose eine sicherere und endgültigere Lösung bei entarteten Zellen zu sein scheint und seneszente Zellen mit ihrem SASP sogar kanzerogen wirken können, stellt sich die Frage, warum die Seneszenz überhaupt noch parallel zur Apoptose existiert. Ist sie ein „Back-up-Mechanismus“, falls eine Apoptose nicht möglich ist? Hat sie vielleicht auch Vorteile gegenüber der Apoptose? Und welche Faktoren entscheiden darüber, welchen der beiden Wege die Zelle nach DNA-Schädigung oder nach Stimulation des Todesrezeptoren einschlägt?

Ein Kriterium, das hierbei eine Rolle spielt, scheint der Level an Stress zu sein, dem die Zelle ausgesetzt ist. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine

hohe Dosis von Doxorubicin in Brustkrebszellen oder Kardiomyozyten zur Apoptose führt, während bei niedrigeren Konzentrationen eher eine Seneszenz eintritt (Song et al., 2005; Spallarossa et al., 2009). Gleiches wurde auch für verschiedene Dosen von Etoposid, UVB und oxidativem Stress durch H₂O₂ beschrieben (Chen und Ames, 1994; Debacq-Chanieux et al., 2005; Probin et al., 2006). Zudem spielt die Art der Zellen eine Rolle: Während bei T-Lymphozyten bereits eine Strahlendosis von 2 Gy zur Auslösung der Apoptose ausreicht, gehen Fibroblasten bei 50 Gy immer noch eher in Seneszenz (Childs et al., 2014).

Auf molekularer Ebene scheinen die Konzentration und die Art der Aktivierung von p53 und p21^{Cip1} eine Schlüsselrolle zu spielen. Bei der Behandlung humaner Fibroblasten mit einer mittelstarken Dosis von H₂O₂, bei der ein Teil der Fibroblasten in Seneszenz und ein Teil in Apoptose geht, wird in beiden Fällen p53 aktiviert, jedoch ist die Expression in den apoptotischen Zellen ca. doppelt so hoch (Chen et al., 2000). Ob eher pro-apoptische oder pro-seneszente Zielgene durch p53 aktiviert werden, hängt auch von posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierungen ab: Mutationen an bestimmten Acetylierungsstellen von p53 führen zu einer Unfähigkeit, Apoptose einzuleiten, bei gleichzeitig erhaltener Möglichkeit zum Zellzyklusarrest mittels Seneszenz (Li et al., 2012). Auch eine Behinderung der Kooperativität der vier Untereinheiten von p53 führt zu einem selektiven Verlust der Apoptosefähigkeit (Timofeev et al., 2013).

p21^{Cip1} gilt als eines der wichtigsten pro-seneszenten Zielgene von p53. Es konnte gezeigt werden, dass die Methyltransferase DNMT3a bei apoptotischen Zellen die Expression von p21 inhibiert. Eine Antagonisierung von DNMT3a bewirkt bei Behandlung mit Doxorubicin auch in sonst Apoptose-auslösenden Dosierungen einen wesentlich höheren Anteil von seneszenten Zellen (Gartel und Tyner, 2002; Zhang et al., 2011). Wird in Mäusen das p21-Gen ausgeknockt, das für die embryonale Seneszenz benötigt wird, wird dies im Gegenzug zumindest teilweise durch Apoptose kompensiert (Muñoz-Espin et al., 2013; Storer et al., 2013).

Zudem kann eine Behinderung der Apoptosefähigkeit, beispielsweise durch Modifikationen der Proteine aus der BCL-2-Familie, in bestimmten Fällen zu einer begünstigten Einleitung von Seneszenz führen. So führt eine Überexpression des anti-apoptischen BCL-2 in Fibroblasten zu einer verminderten Apoptosefähigkeit, die unter Behandlung mit Adriamycin in einer erhöhten Fraktion seneszenten Zellen resultiert (Nelyudova et al., 2007). Werden Neuroblastom-Zellen mit Doxorubicin behandelt und gleichzeitig mit einem Pan-Caspasen-Inhibitor in ihrer Apoptosefähigkeit behindert, so geht ein signifikant höherer Anteil der Zellen in Seneszenz mit erhöhter Expression von p21 und SA- β -Gal (Rebbaa et al., 2003).

1.5 Die HCT-116-Zelllinie und Doxorubicin

HCT-116 ist eine humane Zelllinie aus dem Kolonkarzinom eines erwachsenen Mannes und ist in der Forschung für diagnostische und therapeutische Verfahren in der Krebstherapie etabliert (Brattain et al., 1981). Zu ihren Charakteristika gehört eine Mutation im Codon 13 des RAS-Protoonkogens (American Type Culture Collection, 2021) sowie eine Störung der DNA-Mismatch-Reparatur bzw. Mikrosatelliteninstabilität aufgrund eines MLH-1-Defekts (Bronner et al., 1994; Mohr und Illmer, 2005). Zudem können HCT-116-Zellen p16^{INK4A} nicht richtig exprimieren, da sie in einem Allel eine Frameshift-Mutation besitzen und das andere Allel durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert ist (Myöhänen et al., 1998).

Sowohl p53 als auch Bax und Bak sind in den HCT-116-Wildtyp-Zellen (WT) intakt. Es konnte jedoch mittels Einzelzelldilution und PCR-Analyse der verschiedenen Subklone der HCT-116-Zellen eine neue Zelllinie mit spontaner homozygoter inaktivierender Mutation im Bax-Gen (Bax^{-/-}) kultiviert werden (Zhang et al., 2000). HCT-116-Linien mit Bak-Knockout (Bak^{-/-}) bzw. doppelter Bax-Defizienz und Bak-Knockout, vereinfacht Bax-Bak-Doppelknockout (DKO), wurden aus WT- bzw. Bax^{-/-}-Zellen gewonnen, indem in das Exon 5 des Bak-Gens ein vorzeitiges Stop-Codon über einen Vektor eingeführt wurde, was zur

Inaktivierung von Bak führt. Studien mit Apoptose-Stimuli zeigten jedoch einen stärkeren Apoptose-hemmenden Effekt einer Bax-Defizienz im Vergleich zum Bak-Knockout in HCT-116-Zellen (Wang und Youle, 2012).

Doxorubicin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline. Diese interkalieren in die DNA und stören dadurch die weitere Zellteilung, außerdem führen sie zu einer Hemmung der Topoisomerase-II, die für eine ungestörte Verdopplung der DNA bzw. Auflockerung der Helix-Windungen während der Zellteilung benötigt wird. Es kommt zu DNA-Strangbrüchen und durch die DNA-Schädigung auch zu einer Induktion des p53-abhängigen intrinsischen Apoptose-Pathways (Wang et al., 2004). Doxorubicin wird in Kolonkarzinomen zwar nicht mehr als Standardtherapie angewandt, kommt jedoch weiterhin zum Einsatz (Colombo et al., 2011). In der Behandlung mit Doxorubicin geht bei einer Dosierung von 1 mM ein Großteil der HCT-116-WT-Zellen in Apoptose, während eine deutlich höhere Doxorubicin-Dosierung von 100 mM keine Apoptose, sondern Nekrose verursacht (Yokochi und Robertson, 2004). Eine Behandlung von HCT-116-Zellen mit sehr geringen Dosen Doxorubicin löst hingegen in den meisten Zellen Seneszenz aus, während ein kleiner Anteil an aneuploiden Zellen weiter proliferiert (Sliwinska et al., 2009).

1.6 Fragestellung

Apoptose und Seneszenz sind zwei parallel existierende Mechanismen des menschlichen Körpers, um auf DNA-Schädigung zu reagieren und die entsprechend veränderten Zellen an der Proliferation zu hindern. Während die Apoptose der definitivere und weniger riskante Weg zu sein scheint, hat sich die Seneszenz trotzdem evolutionär gehalten und besitzt gleichermaßen eine große Relevanz für die Verhinderung von Krebs, da beispielsweise das Fehlen des Seneszenz-Mediators p16^{INK4A} zu einer erhöhten Tumorraten führt.

Wie unter 1.4 beschrieben, gibt es erste Hinweise darauf, dass Zellen in Reaktion auf Stress vermehrt in Seneszenz gehen, wenn ihre Apoptosefähigkeit beispielsweise durch Caspase-Inhibitoren oder durch Überexpression von BCL-

2 eingeschränkt ist. Dies legt den Schluss nahe, dass Seneszenz bei DNA-Schädigung ein alternativer Pathway zur Apoptose sein könnte, der vermehrt in Anspruch genommen wird, wenn die Apoptosefähigkeit einer Zelle beeinträchtigt ist.

Um diese Hypothese weiter zu ergründen, soll in dieser Arbeit analysiert werden, ob eine Defizienz der pro-apoptischen Proteine aus der BCL-2-Familie Bax bzw. Bak, die vor allem den intrinsischen bzw. mitochondrialen Apoptose-Pathway betreffen und zu einer Freisetzung von Cytochrom C führen, eine vermehrte Seneszenzinduktion als Reaktion auf Tumortherapie bewirken kann. Hierzu sollen die oben beschriebenen HCT-116-Zelllinien verwendet werden. Da das Fehlen von Bax einen größeren Effekt auf die Apoptosefähigkeit der HCT-Zellen hat (siehe 1.5), wird in den meisten folgenden Experimenten auf die zusätzliche Testung mit Bak^{-/-}-Zellen verzichtet. Zunächst soll untersucht werden, ob eine Behandlung mit den TH1-Zytokinen IFN- γ und TNF- α in WT- und Bax^{-/-}-Zellen zu unterschiedlichen Wachstumsraten führt und ob es in Bax^{-/-}-Zellen eventuell aufgrund verminderter Apoptosefähigkeit vermehrt zu einer Zytokin-induzierten Seneszenz kommt.

Da Bax und Bak größtenteils für den intrinsischen p53-abhängigen Apoptose-Pathway relevant sind, soll im Anschluss noch der Effekt des DNA-schädigenden Anthrazyklins Doxorubicin auf die unterschiedlichen Linien der HCT-116-Zellen beobachtet werden. Auch hier sollen vor allem die Unterschiede in der Fraktion apoptotischer Zellen nach Behandlung sowie im Wachstumsverhalten nach Behandlungsstopp beleuchtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte wurden für diese Arbeit verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät und Gerätename	Firma
Abzugshaube	
Airflow Controller AC2	Waldner
Brutschrank	
Hera Cell 240	ThermoFisher Scientific
Durchflusszytometer	
BD LSR II	BD Biosciences
ELISA-Reader	
Multiskan EX	ThermoFisher Scientific
Plate Reader Infinite 200 Pro	Tecan
Gelelektrophoresegerät	
PowerPac Basic Power Supply	Biorad
Gelelektrophoresekammern	
Sub Cell GT	Biorad
Gelelektrophoresesystem, vertikal	
Mini-Protean Tetra System	Biorad
Heizblock	
Metallblock-Thermostat Typ LS-2	VLM
Infrarot Imaging System	
Li-Cor Odyssey	Li-Cor
Light Cycler	
Light Cycler 480 II	Roche

Mikroskope

Inverses Phasenkontrastmikroskop DMIL Leica

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 Zeiss

Mikroskopkamera

AxioCam MRc Zeiss

Nassblotter

10 x 10 cm Elektrobloetter Biostep

Neubauer-Zählkammern

Neubauer improved (1 mm² Fläche pro
Quadrat, 0,1 mm Tiefe) Glaswarenfabrik Karl Hecht

PCR-Cycler

Peqlab Primus 96 Advanced Peqlab Biotechnologie

pH-Meter

CG842 Schott

Photometer

BioPhotometer 6131; 8,5 mm Eppendorf

Pipettierhilfe

Pipet Boy acu Integrated Biosciences

Sterile Werkbank

HeraSafe KS 18 ThermoFisher Scientific

UV-Transilluminator

UVT-28 ME mit 442K Easy Kamera Herolab

Vortexmischer

MS2 Minishaker IKA

Waage

Typ CP224S, Wiegegenauigkeit: 0,1 mg Sartorius

Wasserbad

Wasserbad, 14 Liter, Typ 1003 GFL

Wippe

Plattform STR8 Stuart Scientific

Zentrifugen

Biofuge pico	ThermoFisher Scientific
Heraeus Multifuge 3S-R	ThermoFisher Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit benutzten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Gefäße und Röhrchen	
CELLSTAR Polypropylen Röhrchen: 15, 50 ml	Greiner
CryoTubes Cryo.s, 2ml	Greiner
Eppendorf Safe-Lock Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Falcon Round-Bottom Polystyrene Tubes (FACS)	ThermoFisher
UV-transparente Küvetten	Sarstedt
Pipettenspitzen	
gestopfte: 10 µl, 100 µl, 1000 µl Filter Tips	Sarstedt
ungestopfte: 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Stabpipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar
Zellkulturflaschen und -platten	
CELLSTAR Zellkulturflaschen: 25, 75, 175 cm ²	Greiner
CELLSTAR Zellkulturplatten: 6 & 12 Well	Greiner
CELLSTAR Zellkulturplatten: 96 Well: weiß und transparent	Greiner
CELLSTAR Zellkulturschale, Durchmesser 100 mm	Greiner
Sonstiges	
Immobilon-FL Transfer Membran (LICOR)	Merck
Whatman Filterpapier, Typ 3017-915	GE Healthcare Life Science

2.1.3 Reagenzien und Kits

In der folgenden Tabelle 3 sind die verwendeten Reagenzien und Kits aufgeführt.

Tabelle 3: Reagenzien und Kits

Reagenzien und Kits	Firma
Beta-Galactosidase Staining Kit	US Biological
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche
DAPI	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Doxorubicinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut	VWR
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Perbio-Science
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
Glycin	Roth
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), ohne Phenolrot	ThermoFisher
HEPES-Puffer 1 M	Biochrome GmbH
Interferon- γ , rekombinant, human	R&D Systems
iScript cDNA Synthesis Kit	Biorad
KAPA® SYBR Fast qPCR Kit	Roche
L-Glutamin	Merck
MEM Amino Acids (50X), ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Methanol	VWR
Milchpulver, Blotting grade, fettarm	Roth
Natriumchlorid $\geq 99,5$ %	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrome GmbH
Nonident P40 Substitute	Fluka BioChemie
Nucleospin RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel

PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Merck
PhosStop EASYpack	Roche
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	ThermoFisher
Proteaseinhibitoren "complete" Tabletten	Roche
RPMI 1640 Medium	Biochrome GmbH
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot	ThermoFisher
SDS	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	AppliChem
Tetramethylrhodamin-Methylester	ThermoFisher
Tris ultrapure	AppliChem
Trypanblau (0,4%)	ThermoFisher
Trypsin-EDTA (0,05%)	ThermoFisher
Tumornekrosefaktor- α , rekombinant, human	R&D Systems
Tween-20	Carl Roth
Wasser, ultrapur	Merck

2.1.4 Antikörper

Die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper wurden in dieser Arbeit für den Western Blot verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für den Western Blot

Art des Antikörpers	Spezies	Verdünnung	Firma
Primärantikörper			
Bax, N-Terminus, polyklonal	Kaninchen	1 : 20.000	Acris
Bak, N-Terminus, polyklonal	Kaninchen	1 : 500	Merck
Caspase-3, monoklonal	Maus	1 : 500	Acris
beta-Aktin, Klon C4, monoklonal	Maus	1 : 5.000	Merck
beta-Aktin, monoklonal	Kaninchen	1 : 1.000	Cell Signaling
Sekundärantikörper			
anti-Maus-IgG, IRDye, rot	Ziege	1 : 15.000	Li-Cor
anti-Kaninchen-IgG, IRDye, grün	Ziege	1 : 15.000	Li-Cor

2.1.5 Primer

Die in Tabelle 5 genannten Primer wurden zur Durchführung der quantitativen Polymerasekettenreaktion verwendet.

Tabelle 5: Basensequenzen der verwendeten Primer

BP = Basenpaare, se = sense, as = anti-sense.

Gen	Sequenz	BP
Housekeeping-Gene		
Actin	AGC CTC GCC TTT GCC GA (se) CTG GTG CCT GGG GCG (as)	174
Aldolase	GTG TTG TGG GCA TCA AGG TAG A (se) CGA AGT CAG CTC CGT CCT TCT (as)	129
GAPDH	CAG CCT CAA GAT CAT CAG CAA TG (se) ATA CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC TT (as)	84

HPRT	TGA TAG ATC CAT TCC TAT GAC TGT AGA (se) AAG ACA TTC TTT CCA GTT AAA GTT GAG (as)	126
TBP	CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT (se) TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C (as)	89
Gene of Interest		
CXCL-10	GAA AGC AGT TAG CAA GGA AAG GT (se) GAC ATA TAC TCC ATG TAG GGA AGT GA (as)	132

2.1.6 HCT-116-Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden in dieser Arbeit HCT-116-Zellen untersucht – humane Colonkarzinom-Zellen (Brattain et al., 1981). Diese lagen in drei verschiedenen Linien vor:

1. HCT-116-WT-Zellen: Wildtyp mit intaktem Bax und Bak
2. HCT-116-Bax^{-/-}-Zellen: spontane, homozygote, inaktivierende Mutation in Bax, Bak intakt (Zhang et al., 2000)
3. HCT-116-DKO-Zellen: „Doppelknockout“: Bax^{-/-}-Zellen mit zusätzlichem Vektor-vermittelten Bak-Knockout (Wang und Youle, 2012)

Die Zellen wurden freundlicherweise von Privatdozent Dr. Frank Essmann vom Interfakultären Institut für Biochemie (IFIB) in Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden Versuche *in vitro* mit Tumorzellen der Zelllinie HCT-116 durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden im Brutschrank *Hera Cell 240* bei einer Temperatur von 37°C mit einem CO₂-Anteil von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von über 95% kultiviert. Normalerweise lagen die Zellen in T175-Zellkultur-Flaschen vor und wurden mindestens einmal wöchentlich bzw. bei

Konfluenz trypsiniert und neu ausgesät. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte mindestens ein weiteres Mal pro Woche.

Zellkulturmedium

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in einem modifizierten RPMI-Medium kultiviert. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des modifizierten RPMI-Zellkultur-Mediums

Inhaltsstoffe	Volumen [ml]
RPMI 1640 Medium	500
Fetales Kälberserum (FCS)	50
Penicillin/Streptomycin	5
L-Glutamin	2,5
Hepes-Puffer	5
Natriumpyruvat	5
Aminosäuren-Mix	5

Passage der Zellen

Um die Zellen zu passagieren, wurden zunächst Zellkulturmedium sowie Trypsin auf 37°C erwärmt. Auf einer sterilen Werkbank wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Danach wurde in jede Flasche bzw. auf jede Zellkulturplatte so viel Trypsin gegeben, dass die Zellen damit bedeckt waren. Nun wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, damit sie sich vom Boden der Flasche ablösen können. Diese Dissoziation wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei ungenügender Ablösung wurden die Zellen entweder noch wenige Minuten weiter inkubiert oder sie wurden mechanisch durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche gelöst.

Im Anschluss wurde die Reaktion des Trypsins durch Hinzugabe von der dreifachen Menge an Zellkulturmedium gestoppt, die abgelösten Zellen wurden in Falcon-Röhrchen transferiert und für fünf Minuten bei 1.500 rpm in der *Heraeus Multifuge 3S-R* zentrifugiert (entspricht 189 g). Danach konnte der Überstand entfernt werden und das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium suspendiert werden. Um nun die Zellzahl zu bestimmen, wurden je nach Größe des Zellpellets 10-50 μ l der Zellsuspension 1:1 bis 1:10 mit Trypanblau verdünnt bzw. angefärbt und in Neubauer-Zählkammern übertragen. Es wurde die Zellzahl in vier Quadraten der Zählkammer bestimmt und mithilfe des Durchschnitts der Zellzahl aus den Quadraten und dem Verdünnungsfaktor die Gesamtzellzahl berechnet. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Zellen in die gewünschten Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.

Einfrieren der Zellen

Um Zellen zur späteren Weiterverwendung und Kultivierung einzufrieren, wurde ein Gefriermedium aus fetalem Kälberserum und 10% DMSO verwendet. Es wurden pro einzufrierender Zelllinie ca. 10^6 bis 10^7 Zellen mit einer möglichst niedrigen Passagenzahl mit PBS gewaschen, in 1 ml des Gefriermediums suspendiert und in CryoTubes übertragen. Diese wurden dann innerhalb eines CryoFreezers in einen Gefrierschrank mit -80°C überführt, wo sie kontrolliert um 1°C pro Minute heruntergekühlt wurden. Wenn sie -80°C erreicht hatten, konnten sie aus dem CryoFreezer entnommen und in einem Gefrierfach gelagert werden.

Auftauen der Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder aufzutauen, wurden diese ca. eine Minute in ein Wasserbad mit 37°C gehalten und anschließend vorsichtig in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium suspendiert. Danach wurden sie für 5 min bei 1.500 rpm (189 g) in der *Heraeus Multifuge 3S-R* zentrifugiert, der Überstand wurde im Anschluss abgenommen und die Zellen dicht in eine Zellkulturflasche ausgesät. Nach dem Auftauen von Zellen wurde mindestens eine Woche gewartet, bis die ersten Versuche mit diesen Zellen gestartet wurden, um Einflüsse des Zellstress durch das Auftauen zu minimieren.

2.2.2 Behandlung der Zellen

Um die Effekte der Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie des Zytostatikums Doxorubicin beurteilen zu können, wurden die HCT-116-Zellen zunächst auf frischen Platten oder Wells ausgesät und erhielten für die ersten 24 Stunden noch keine Behandlung, damit sie adhären konnten. Anschließend wurde der Überstand entfernt und neues Medium, das die entsprechende zu testende Substanz enthielt, wurde hinzugegeben. Grundsätzlich wurde für jeden Versuch auch eine Negativkontrolle angelegt, bei der die Zellen nur eine Kontrollbehandlung erhielten.

Behandlung mit Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α

Sowohl Interferon- γ (IFN- γ) als auch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) lagen in PBS gelöst in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und waren als Aliquots bei -20°C gelagert. Um Zellen mit IFN- γ und TNF- α zu behandeln, wurde von den bereits seit 24 Stunden ausgesäten Zellen der Überstand abgenommen und verworfen. Nun wurde aus frischem Zellkultur-Medium und den Zytokinen eine Mischung hergestellt, die je nach Versuch falls nicht anders angegeben 100 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α enthielt, da sich diese Dosierung in der Vergangenheit als effektiv zur Induktion von Seneszenz erwiesen hat (Braumüller et al., 2013). Die Zellen wurden nun mit dem Medium, das die Zytokine enthält, je nach Experiment für mindestens 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde parallel eine weitere Probe von Zellen unter den gleichen Bedingungen mit reinem Zellkulturmedium ohne Zugabe der Zytokine behandelt.

Behandlung mit Doxorubicin

Doxorubicin lag in DMSO gelöst in einer Konzentration von 1 mM vor und wurde lichtgeschützt bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Auch hier wurde zur Behandlung die gewünschte Menge an Doxorubicin mit Zellkulturmedium vermischt und auf die Zellen gegeben. Falls nicht anders angegeben, wurde eine Standardkonzentration von 0,5 μ M verwendet. Als Negativkontrolle diente hier Zellkulturmedium gemischt mit der gleichen Menge an DMSO wie in der Behandlung.

2.2.3 In-vitro Growth-Arrest-Assays

Um den Einfluss von IFN- γ und TNF- α bzw. von Doxorubicin auf die Zellzahl in vitro zu ermitteln, wurden sogenannte Growth-Assays oder Growth-Arrest-Assays, also Wachstumsuntersuchungen, mit den Zellen durchgeführt. Hier wurden die Zellen zunächst für eine Passage mit dem Substrat bzw. der entsprechenden Mediumkontrolle behandelt und im Anschluss wurde für mindestens zwei weitere Passagen das Wachstumsverhalten der Zellen bzw. die Entwicklung der Zellzahl beobachtet (Braumüller et al., 2013).

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät und zum Adhärenzieren für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand von den Wells abgenommen, verworfen und frisches Medium mit der gewünschten Behandlung, z.B. Doxorubicin, hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden stets auch Zellen nur mit Zellkulturmedium (ggf. mit DMSO-Zusatz als Kontrolle zur Doxorubicin-Behandlung) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit der Behandlung im Brutschrank inkubiert (Passage 0, p0). Nach der gewünschten Behandlungszeit wurden die Zellen gewaschen und trypsiniert. Hier wurde besonders darauf geachtet, nach dem Trypsinieren keine Zellen mehr auf der Platte zu hinterlassen, damit die Zellzahl genau bestimmt werden kann. Die Zellen wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt; durch Färbung mit Trypanblau konnten nicht-lebendige Zellen detektiert werden und wurden nicht mitgezählt. Im Anschluss wurde eine definierte Zahl an Zellen neu ausgesät. Diese Zellen wurden nun nur noch mit Zellkulturmedium ohne weitere Substrate inkubiert, für ca. 96 h oder bis die Zellen der Mediumkontrolle konfluent waren (Passage 1, p1). Nach Ablauf dieser Passage wurden die Zellen trypsiniert und gezählt, für die zweite Passage (p2) ausgesät und wieder für ca. 96 h im Brutschrank inkubiert. Nach der zweiten Passage wurden die Zellen ein letztes Mal trypsiniert und gezählt.

2.2.4 XTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität

Der XTT-Test ist ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Er beruht darauf, dass nur durch stoffwechselaktive Zellen mit intakten Mitochondrien das gelbe Tetrazoliumsalz XTT gespalten werden kann, da das dafür benötigte Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System Teil der mitochondrialen Atmungskette ist. Bei der Spaltung entsteht orangefarbenes Formazan, das kolorimetrisch quantifiziert werden kann und somit eine Aussage über die Menge lebendiger Zellen in verschiedenen Proben erlaubt (Paull et al., 1988; Roehm et al., 1991). Der Test wurde nach Behandlung der HCT-116-Zellen mit den Substanzen IFN- γ und TNF- α oder Doxorubicin bzw. der entsprechenden Mediumkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde das *Cell Proliferation Kit II (XTT)* der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet.

Zunächst wurden das im Kit enthaltene Electron-coupling reagent und das XTT labeling reagent im Verhältnis 1:50 vermischt und diese Lösung 3:7 in RPMI Medium zum fertigen XTT Reaction Mix verdünnt. Die behandelten Zellen lagen auf 96-Well-Platten vor. Der Überstand aus den Wells wurde entfernt und in jede Well wurden 100 μ l des XTT Reaction Mix hinzugegeben. Nun wurde sofort bei einer Wellenlänge von 492 nm die Ausgangsextinktion gemessen und die Platte im Anschluss bei 37°C inkubiert. Danach wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, beispielsweise nach 30 Minuten, einer Stunde, drei Stunden und vier Stunden, erneut die Extinktion bestimmt und die Ausgangsextinktion davon subtrahiert. So konnte die Aktivität der lebendigen Zellen während der Inkubationszeit bestimmt werden. Im Anschluss wurden die Werte der behandelten Zellen mit jenen der nur mit Zellkulturmedium kontrollbehandelten Zellen verglichen.

2.2.5 LDH-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität

Der LDH-Test dient der Ermittlung des Anteils toter Zellen nach verschiedenen Behandlungen und somit der Untersuchung der Zytotoxizität bestimmter Substanzen. Er beruht auf der Tatsache, dass sterbende Zellen ihre Membranintegrität verlieren und somit das normalerweise im Zytosol vorliegende Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) nach extrazellulär gelangt. Da die LDH die

Umwandlung von Laktat zu Pyruvat katalysiert und dabei zu einer Reduktion von NAD^+ zu NADH führt, kann die LDH-Aktivität über NADH bestimmt werden, das ein Tetrazoliumsalz zu rotem Formazan reduziert, dessen Menge wiederum kolorimetrisch bestimmt werden kann (Nachlas et al., 1960; Decker und Lohmann-Matthes, 1988). In dieser Arbeit wurde dazu das *Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit* der Firma *ThermoFisher Scientific* verwendet.

Der im Kit enthaltene Substrat-Mix wurde in 11,4 ml ultrapurem Wasser gelöst und mit dem Assay-Puffer zur *Reaction Mixture* vereinigt, der Lysepuffer 1:10 mit RPMI-Medium verdünnt und 1 μl der LDH-Positivkontrolle in 10 ml PBS gelöst. Zur Durchführung des Tests wurden bereits im Voraus die Zellen auf eine 96-Well-Platte ausgesät, konnten 24 h adhären und wurden anschließend für den gewünschten Zeitraum mit der gewünschten Substanz behandelt. Zu Beginn des Tests wurden je 50 μl des Überstandes der behandelten 96-Well-Platten auf eine neue 96-Well-Platte übertragen und der restliche Überstand verworfen. Die adhären Zellen wurden anschließend mit 100 μl des verdünnten Lysepuffers aus dem Kit lysiert und pro Well je 50 μl des Lysats ebenfalls auf eine neue 96-Well-Platte als LDH-Maximalwerte übertragen. Als Negativkontrolle wurden 50 μl reines RPMI-Medium verwendet, als Positivkontrolle die zuvor aus dem Kit hergestellte LDH-Positivkontrolle.

Im Anschluss wurden in jede Well 50 μl der *Reaction Mixture* hinzugefügt und somit die Reaktion gestartet. Die Platten wurden nun für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden nach Ablauf der Zeit in jede Well 50 μl der im Kit enthaltenen Stop Solution gegeben und anschließend die Extinktion bei 492 nm sowie bei 620 nm (Hintergrundaktivität) gemessen. Für die Auswertung wurde die jeweilige Extinktion bei 620 nm von der Extinktion bei 492 nm subtrahiert, auch der Mittelwert der Extinktion der Medium-Negativkontrolle wurde von den restlichen Werten abgezogen. Um nun den Prozentsatz der getöteten Zellen zu bestimmen, wurde pro Well der Wert der LDH-Aktivität des Überstandes auf den Gesamtwert inklusive der lysierten Zellen aus der gleichen Well bezogen.

2.2.6 Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Assay

Die β -Galaktosidase ist ein Enzym, das Galaktose aus glykosidischen Bindungen abspalten kann. Sie kommt normalerweise vorzugsweise in Lysosomen vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei vielen seneszenten Zellen die β -Galaktosidase hochreguliert und bei einem pH von 6 im gesamten Zytosol verteilt zu finden ist (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000). Daher spricht man hier auch von der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase (SA- β -Gal), die als ein Standard-Biomarker für seneszente Zellen gilt. Im SA- β -Gal-Assay wird die SA- β -Galaktosidase mithilfe von X-Gal nachgewiesen, einer Verbindung aus Galaktose und einem Indolfarbstoff. Wenn das Enzym in den Zellen vorhanden ist, spaltet es die Galaktosidase ab und bewirkt so, dass das übrige Indol zu einer Blaufärbung der Zelle führen kann (Itahana et al., 2007). In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der SA- β -Galaktosidase das *beta-Galactosidase Staining Kit* der Firma *USBiological* verwendet.

Die zu untersuchenden und bereits behandelten Zellen lagen auf einer 96-Well-Platte vor. Zunächst wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zum Fixieren der Zellen auf der Platte in jede Well 100 μ l der im Kit enthaltenen Fixierlösung (1:10 mit Reinstwasser verdünnt) pipettiert und die Platte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden je 100 μ l der laut Anleitung des Kits hergestellten Färbelösung in die Wells pipettiert und die Platte mit Alufolie geschützt über Nacht bei 37 °C und 0% CO₂ inkubiert. CO₂-Freiheit und Stabilität des pH-Werts sind für diesen Assay essenziell, da die SA- β -Galactosidase-Färbung nur bei einem pH-Wert von 6 optimal funktioniert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, und anschließend zur Anfärbung der Zellkerne je 100 μ l DAPI (1:360 in PBS verdünnt) hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und am Ende wurde jede Well mit 50 μ l PBS zum Mikroskopieren überschichtet. Nun konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop die Gesamtzellzahl mittels der durch DAPI angefärbten Zellkerne bestimmt und

davon der Anteil an blau gefärbten, SA- β -Galaktosidase-positiven Zellen bestimmt werden. Pro Well wurden mindestens drei Bildausschnitte ausgewertet, um eine möglichst repräsentative Auszählung zu gewährleisten. Zum Fotografieren der Zellen wurde das Programm *AxioVision* von Carl Zeiss verwendet, zum anschließenden Auszählen die Anwendung *ImageJ*.

2.2.7 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen wurde in dieser Arbeit der Western Blot verwendet. Bei dieser Methode werden die Proteine aus den Zellen zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Membran übertragen bzw. „geblottet“. Mithilfe von Antikörpern können die Proteine, die von Interesse sind, auf der Membran markiert und den einzelnen Proben zugeordnet werden (Laemmli, 1970; Burnette, 1981). Zunächst müssen die Proteine mittels Lyse aus den Zellen gewonnen werden. Hierzu wurde stets auf Eis gearbeitet, um eine Aktivierung der zelleigenen Proteasen zu vermeiden. Zum Lysieren der Zellen wurde ein RIPA-Lysepuffer mit der aus Tabelle 7 ersichtlichen Zusammensetzung verwendet. Zusätzlich wurden dem Lysepuffer jeweils 10 % PhosStop zur Hemmung der Phosphatasen und 10 % Proteaseinhibitoren hinzugefügt. Zu 5×10^6 Zellen wurden 200 μ l des Lysepuffers pipettiert und die Mischung anschließend im Vortexmischer geschüttelt. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und auf einem Heizblock wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde fünf Mal wiederholt, um die Zerstörung der Zellmembran sicherzustellen. Nach dem letzten Auftauen wurden die Zellen bei 13.000 rpm (entspricht 16.060 g) für eine Minute in der *Biofuge pico* zentrifugiert.

Tabelle 7: Rezepturen für den Western Blot

<i>Name</i>	<i>Rezeptur</i>	
RIPA-Lysepuffer	50 mM	TRIS
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	0,5 %	Natriumdeoxycholat
	0,1 %	SDS
	2,5 mM	EDTA

10X TBS	ad 100ml	VE-H ₂ O
	24,23 g	Trizma
	80,06 g	NaCl
1X TBST	ad 1 l, pH 7,6	VE-H ₂ O
	100 ml	10X TBS
	900 ml	VE-H ₂ O
2X Laemmli Puffer	0,5 ml	Tween-20
	125 mM	TRIS-HCl
	20 %	Glycerol
	10%	2-Mercaptoethanol
	4 %	SDS
	0,04 %	Bromphenol-Blau
Semi-Dry-Puffer	ad pH 6,8	HCl (37%)
	48 mM	TRIS
	29 mM	Glycin
	13 mM	SDS
	20 %	Methanol
	ad 1 l	VE-H ₂ O
Trenngelpuffer (Lower Tris)	1,5 M	TRIS
	10 %	SDS
	250 ml	H ₂ O
	ad pH 8,8	HCl (37%)
Sammelgelpuffer (Upper Tris)	0,5 M	TRIS
	10 %	SDS
	250 ml	H ₂ O
	ad pH 6,8	HCl (37%)
10X Laufpuffer	248 mM	TRIS
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l	VE-H ₂ O

Für jede Probe musste im Anschluss die Proteinkonzentration bestimmt werden. Hierzu wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* von *ThermoFisher Scientific* verwendet. Grundlage des Assays ist, dass Cu²⁺-Ionen durch Proteine in alkalischer Umgebung zu Cu⁺-Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Bicinchoninsäure (BCA) bildet einen farbigen Komplex mit den Cu⁺-Ionen, der bei 562 nm Wellenlänge eine starke Absorption zeigt, die photometrisch bestimmt werden kann und die Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration erlaubt (Smith et al., 1985). Pro Probe wurden Doppelwerte bestimmt, zudem wurde der Leerwert des Lysepuffers abgezogen und eine Standardreihe mit Albumin in bekannten Konzentrationen verwendet.

Nun wurden die Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dieses Verfahren beruht darauf, dass durch das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und die Proteine aufgrund von Abstoßung durch die negative Ladung und Denaturierung durch Wärme ihre Struktur verlieren und linearisiert werden, sodass sie im Anschluss nach ihrer Kettenlänge aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurden in dieser Arbeit ausschließlich 12%iges Sammelgel sowie 5%iges Trenngel verwendet. Deren Zusammensetzung lässt sich Tabelle 8 entnehmen.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Gele

	Substanz	Volumen [ml] pro Gel
Sammelgel, 5 %	H ₂ O	3,4
	Polyacrylamid, 30%	0,85
	Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,625
	SDS	0,05
	APS	0,05
	TEMED	0,005
Trenngel, 12 %	H ₂ O	3,3
	Polyacrylamid, 30 %	4
	Trenngelpuffer, pH 8,8	2,5
	SDS	0,1
	APS	0,1
	TEMED	0,004

Die Gele wurden zwischen 1,5 mm voneinander entfernte Glasplatten gegossen – zuerst das Trenngel und nach ca. 15 min das Sammelgel. Nachdem die Gele fest geworden sind, wurden sie in die Gelelektrophorese-Kammer gestellt und mit Laufpuffer übergossen. In die linke Geltasche wurden zur späteren Bestimmung der Proteingrößen 5 µl des Molekulargewichtsmarketers *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* gegeben; die übrigen Taschen wurden mit je 5 µg Protein aus jeder Probe befüllt und mit dem gleichen Volumen an Laemmli-Puffer gemischt. Als Positivkontrolle diente ein Lysat aus Hela-Zellen. Die Gele wurden zunächst für 15 min bei 90 V, danach bei 120 V laufen gelassen, bis die

Lauffront fast das Ende des Gels erreicht hat. Um die Proteine auf eine Membran zu übertragen, wurde in dieser Arbeit die Methode des Wet-Blot verwendet (Renart et al., 1979). Die Polyvinylidendifluorid-Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert, anschließend wurde sie – umgeben von Schwämmen und Whatman-Filterpapieren – auf das Gel gelegt und so in die Kammer gespannt, dass die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran wandern konnten. Die Kammer wurde mit Semi-Dry-Puffer befüllt, geschlossen und für 120 Minuten bei 100 V und 300 mA laufen gelassen.

Nach dem Blot mussten zunächst die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran geblockt werden. Hierzu wurde in dieser Arbeit 5%ige Milchpulverlösung verwendet, von der die Membran 30 min bedeckt wurde, danach wurde sie für weitere 30 min mit TBST gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 5 µl Primärantikörperlösung inkubiert, die zu gleichen Teilen aus Odyssey-Block-Puffer und TBST bestand. Danach wurde die Membran 3x für jeweils 15 min mit TBST gewaschen und lichtgeschützt für eine Stunde mit den Sekundärantikörpern in TBST inkubiert. Eine Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper ist Tabelle 4 zu entnehmen. Es folgten 4 Waschschriffe mit TBST für jeweils 10 min und ein Waschschriff für 5 min mit TBS. Nun konnte die Membran mithilfe des *LiCor-Odyssey Imaging Systems* auf Fluoreszenzsignale untersucht werden. Im Anschluss wurden die Scans mit dem Programm *Image Studio Lite* der Firma LiCor bearbeitet.

2.2.8 Aktivitätsbestimmung der Caspase 3

Die Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym für die Initialisierung der Exekutionsphase der Apoptose. Mithilfe des Caspase-Glo-3/7-Assays kann die Aktivität der Caspase 3 und damit die Apoptoseaktivität verschiedener Zellen über Lumineszenzmessung quantifiziert werden. Das in dem Caspase-Assay-Substrat enthaltene Aminoluziferin wird durch die Caspase 3 gespalten und verursacht dann ein Lumineszenzsignal, das gemessen werden kann und dessen Höhe proportional zur Caspase-3-Aktivität ansteigt (O'Brien et al., 2005).

Für die Caspase-3-Aktivitätsbestimmung wurden die zu untersuchenden Zellen auf 12-Well-Plates ausgesät und nach 24 h Adhäsionszeit mit Doxorubicin bzw. Mediumkontrolle + DMSO behandelt (für jede Bedingung drei Wells). Nach der Behandlung wurden der Überstand sowie die trypsinisierten Zellen in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm (189 g) in der *Heraeus Multifuge 3S-R* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets jeweils in 1 ml PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden pro Röhrchen je 5 µl auf eine weiße 96-Well-Platte übertragen (jeweils Doppelwerte) und pro Well 45 µl des Caspase-Assay-Substrats aus dem Kit hinzugegeben. Anschließend wurde in einem Tecan Multiplate Reader die Platte auf Temperaturen zwischen 20 und 30°C erwärmt und es wurde vierzig Zyklen lang alle zwei Minuten die Lumineszenz gemessen. Für die Auswertung wurde ein Zyklus ausgesucht, bei dem die Caspase-Aktivität bereits hoch war, jedoch noch keine Sättigung erreicht hat. Um auszuschließen, dass durch die Behandlung und die damit verbundene niedrigere Zellzahl eine falsch niedrige Caspase-Aktivität gemessen wird, wurde parallel ein BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit den gleichen Proben durchgeführt (zur Durchführung s. 2.2.7) und die Ergebnisse der Caspase-Aktivitätsmessung auf die Proteinkonzentration normiert.

2.2.9 Durchflusszytometrie nach TMRE und Annexin

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Zelltods ist die Quantifizierung von apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip, dass Zellen in einem laminaren Strom an einem Laser vorbeigeleitet werden. Die dabei entstehende Lichtstreuung wird gemessen und erlaubt Aussagen über die Zusammensetzung der Zellpopulation. Am relevantesten sind die Vorwärtsstreuung (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreuung (SSC, side scatter) des Lichts, die Aussagen über Größe bzw. Granularität und Kernstruktur der Zellen erlauben. Zudem können mittels diverser Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Targets in oder auf den Zellen markiert werden und die Zellen ebenfalls im Hinblick auf das Vorhandensein dieses Targets quantifiziert werden (Hulett et al., 1969). Gelegentlich wird der Begriff

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) synonym für die Durchflusszytometrie verwendet, auch wenn hier genau genommen zusätzlich eine Sortierung der Zellen vorgenommen wird.

In vitalen Zellen liegt das Phospholipid Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran und gelangt nur in apoptotischen Zellen durch sogenannte Flippasen nach außen (Verhoven et al., 1995). Annexin-V ist ein Protein, welches sich spezifisch an Phosphatidylserin binden kann und somit, wenn es mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Allophycocyanin (APC) markiert ist, in der Durchflusszytometrie zur Detektion apoptotischer Zellen herangezogen werden kann (van Engeland et al., 1998; Crowley et al., 2016). TMRE (Tetramethylrhodamin-Methylester) ist ein Farbstoff, der sich aufgrund seiner positiven Ladung in aktiven Mitochondrien ansammelt, da sie in Relation ein negatives Membranpotential $\Delta\psi_m$ besitzen. In apoptotischen Zellen kommt es jedoch, insbesondere nach Einleitung des intrinsischen Pathways, bereits früh im Ablauf der Apoptose zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien und TMRE akkumuliert nicht mehr, ist also in diesen Zellen niedriger (Jayaraman, 2005; Perry et al., 2011). Dies kann mittels Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall Phycoerythrin (PE), durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die behandelten und unbehandelten HCT-116-Zellen sorgfältig trypsiniert und zentrifugiert; der Überstand wurde entfernt. Zur Färbung mit TMRE wurde ein Gemisch aus 8,35 ml RPMI-Medium, 170 μ l FCS und 3,4 μ l TMRE hergestellt, jede Probe mit 300 μ l dieser Lösung vermischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Markierung mit Annexin-V wurde eine 1:200-Verdünnung von Annexin-V mit HBSS vorgenommen und wiederum 300 μ l der Lösung mit den Zellpellets vermischt. Das Gemisch wurde lichtgeschützt und auf Eis gelagert und möglichst rasch die Durchflusszytometrie begonnen. Hierzu wurden die Proben, die in FACS-Röhrchen vorlagen, mithilfe des Durchflusszytometers BD LSR II analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels BD FACS-Suite-Software. Es wurden zunächst mithilfe des FSC und SSC

Einzelzellen definiert, indem kleine sowie zu große Partikel aus der Quantifizierung ausgenommen wurden. Somit sollte eine Verfälschung der Werte durch Zelldetritus bzw. verklumpte Zellen minimiert werden. Im Anschluss wurde der Anteil der Annexin-positiven bzw. TMRE-niedrigen Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt.

2.2.10 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten in einer Probe. Dazu werden Primer verwendet, die zu einem bestimmten Gen passen, und der entsprechende DNA-Abschnitt wird mittels DNA-Polymerasen vervielfältigt (Saiki et al., 1988). Bei der quantitativen PCR (qPCR) soll zusätzlich die Genexpression auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Dazu wird die zelleigene RNA mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert (Spiegelman et al., 1971). Um eine Aussage über die Quantität der ursprünglich vorliegenden RNA treffen zu können, kann im Rahmen einer sogenannten Real-Time-qPCR ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, der in die DNA interkaliert und dessen Signalstärke proportional mit der Menge an PCR-Produkten zunimmt (Heid et al., 1996). Da jedoch in unterschiedlichen Proben aufgrund diverser Fehlerquellen unterschiedliche Mengen an RNA und cDNA vorliegen können, werden zur Reduktion von daraus resultierenden Fehlern ebenfalls sogenannte Housekeeping-Gene analysiert, also Gene wie Actin oder Aldolase, die in der Zelle immer gebraucht und stabil exprimiert werden. Indem die Quantität des „Gene of Interest“, in dieser Arbeit CXCL-10, mit der Quantität der Housekeeping-Gene in Relation gesetzt wird, können Messfehler aufgrund von abweichender Menge an DNA oder RNA ausgeglichen werden.

Die Zellen, die in der qPCR untersucht werden sollten, lagen als Pellets bei - 80 °C eingefroren vor. Zunächst musste die RNA aus diesen Zellen isoliert werden, dazu wurde das NucleoSpin-RNA-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Gemäß dem Protokoll des Kits wurden die Zellen zunächst lysiert, im Anschluss wurde die RNA gebunden, die DNA mittels DNase verdaut und die Probe in mehreren Schritten filtriert, sodass am Ende pure RNA vorlag. Dann wurde die

Konzentration der RNA in den einzelnen Proben photometrisch über die optische Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Zudem wurde kontrolliert, ob die OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio zwischen 1,8 und 2,0 liegt, um eine zu große Kontamination mit Proteinen auszuschließen. Außerdem wurde zur Kontrolle der RNA-Qualität eine Elektrophorese in 1%igem Agarosegel durchgeführt und mithilfe eines UV-Transilluminators verifiziert, ob in allen Proben RNA vorhanden ist. Zur Synthese der cDNA wurde das iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Biorad verwendet. Gemäß Anleitung des Herstellers wurde der Mastermix aus Puffer und RT vorbereitet, zusammen mit 1 µg RNA gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Nun wurden die Proben im PCR-Gerät folgendem Programm unterzogen:

1. 25 °C für 5 min
2. 42 °C für 30 min
3. 85 °C für 5 min

Die Proben wurden danach bei 4°C gekühlt. Zur Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese erfolgte eine Test-PCR für das Housekeeping-Gen GAPDH. Im Anschluss wurde zur Qualitätskontrolle der cDNA, RNA und der Primer sowie zur Erstellung eines Standards eine Präamplifikation der gepoolten cDNA durchgeführt. Hierbei sollte die Differenz der C_T-Werte zwischen cDNA und Negativkontrolle mit H₂O mindestens 4 betragen. Nun folgte die eigentliche qPCR. Hierzu wurde die cDNA 1:5 verdünnt je 1 µl cDNA mit 9 µl Mastermix (bestehend aus 2 µl H₂O, 5 µl KAPA-SYBR-Mix, 1 µl sense-Primer und 1 µl antisense-Primer) in Doppelwerten auf eine PCR-Platte pipettiert, zentrifugiert und im LightCycler ® folgendem Programm unterzogen:

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. Präinkubation: | 95°C für 5 min |
| 2. Amplifikation: | 45 Zyklen à: 95°C für 10 s (Denaturierung)
60°C für 10 s (Annealing)
72°C für 10 s (Elongation) |
| 3. Schmelzkurvenbestimmung: | 95°C für 10 s
65°C für 1 min
Erhitzen auf 95°C mit 0,06°C/s |
| 4. Kühlung | 40°C |

Mithilfe der LightCycler® 480 II Software der Firma Roche konnte anhand der Standardreihen und der verdünnten cDNA-Proben der C_T -Wert von behandelten und unbehandelten Proben ermittelt werden. Pro Primer erfolgten zudem Negativkontrollen mit RNA und H₂O. Pro Bedingung bzw. Verdünnung wurden Doppelwerte bestimmt.

2.2.11 Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten in Form des arithmetischen Mittelwerts (MW) \pm Standard Error of the Mean (SEM) dargestellt. Die Berechnung erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Excel. Die Abkürzung n entspricht dabei den *technical replicates*, also der Anzahl der technischen Wiederholungen des Experiments, die in die Berechnung eingeflossen sind. Um Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen festzustellen, wurde eine statistische Testung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way-ANOVA) vorgenommen. Die Voraussetzungen zur Durchführung einer ANOVA waren bei den vorhandenen Daten erfüllt, nämlich die Unabhängigkeit der Messungen, die Nominalskalierung der unabhängigen Variable, die annähernde Normalverteilung sowie mindestens eine Intervallskalierung der abhängigen Variable und eine Varianzhomogenität (Howell, 2002). Im Anschluss wurde eine post-hoc-Testung mittels Tukey's post-hoc vorgenommen, um zu erkennen, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden. Das Signifikanzniveau betrug dabei, wenn nicht anders angegeben, 5%.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrolle der Expression Apoptose-relevanter Proteine in den HCT-116-Zelllinien

Das Ziel dieser Arbeit ist, Unterschiede im Apoptoseverhalten zwischen HCT-116-Zellen mit Wildtyp-Genen für Bax und Bak (im Folgenden: *WT*) sowie HCT-116-Zellen mit einer Defizienz der entsprechenden Gene herauszuarbeiten (im Folgenden: *Bax*^{-/-} für Zellen ohne Bax sowie *DKO* für *Bax*^{-/-}-Zellen mit zusätzlichem Knockout von Bak), nachdem diese mit IFN- γ und TNF- α bzw. mit Doxorubicin behandelt wurden. Im Anschluss soll, falls signifikante Unterschiede vorhanden sind, überprüft werden, ob dies einen Einfluss auf die Seneszenzinduktion hat. Um die Grundlage der Arbeit, nämlich die unterschiedliche Expression von Bax und Bak in den verschiedenen HCT-116-Zelllinien sowie die ansonsten vergleichbare Expression anderer Apoptose-relevanter Proteine, vor Beginn der eigentlichen Experimente zu verifizieren, wurden zunächst Western Blots zur Kontrolle des Vorhandenseins der jeweiligen Proteine durchgeführt.

3.1.1 Bestimmung der Bax- und Bak-Expression

Damit die Expression von Bax und Bak in den HCT-116-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurden von jeder der drei Zelllinien je zwei verschiedene Proben aufbereitet (s. Abb. 4). Im Western Blot für Bak (Abb. 4A) ist zu erkennen, dass sowohl die HCT-116-WT- als auch die *Bax*^{-/-}-Zellen eine deutliche Bande bei ca. 26 kDa haben und somit Bak exprimieren, während diese Bande – wie erwartet – bei den HCT-116-DKO-Zellen fehlt.

Im Western Blot für Bax (Abb. 4B) ist eine Bande bei 21 kDa nur bei HCT-116-WT zu finden, während die *Bax*^{-/-}- und DKO-Zellen kein Bax aufweisen. Somit entspricht die Bax- bzw. Bak-Proteinexpression in den drei HCT-116-Zelllinien den Erwartungen.

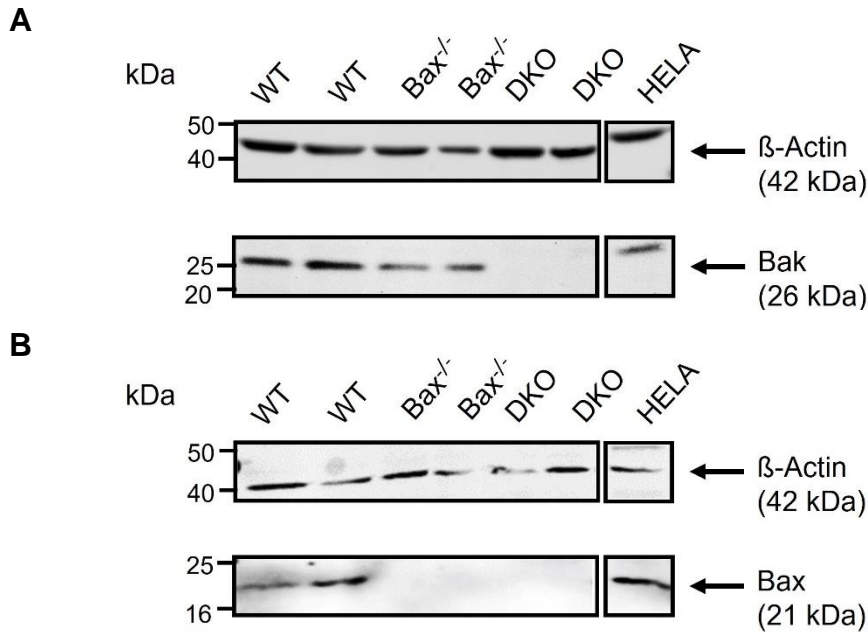


Abbildung 4: Expression von Bak und Bax in HCT-116-Zellen

A Western Blot zum Nachweis von Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak).

B Western Blot zum Nachweis von Bcl-2-associated protein (Bax).

Von jeder Zelllinie wurden jeweils zwei separat gewonnene Proben verwendet. Pro Probe wurden 5 µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle wurde β-Actin verwendet. Als Positivkontrolle für die Bak- bzw. Bax-Expression dient HELA-Zellextrakt. Scheinbares Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

DKO Doppel-Knockout, **HELA** Henrietta-Lacks-Zervixkarzinom-Zellen, **WT** Wildtyp.

3.1.2 Western Blot zum Nachweis der Caspase 3 in den HCT-116-Zellen

Um sonstige Defekte im Apoptose-Pathway bei den verschiedenen HCT-116-Zelllinien auszuschließen, wurde in dieser Arbeit auch noch das Vorhandensein eines essenziellen Proteins zur Einleitung der Apoptose untersucht – der Procaspase 3 (s. Abb. 5). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Caspase 3 ein Schlüsselprotein der Apoptose, das sowohl durch den intrinsischen als auch durch den extrinsischen Pathway aktiviert wird und u.a. die DNA-Fragmentierung einleitet. Daher sollte zur Beurteilung der Effekte einer Bax- bzw. einer kombinierten Bax- und Bak-Defizienz zunächst verifiziert werden, dass die Procaspase 3 in allen Zellen gleichermaßen vorhanden ist. In Abbildung 5 ist zu erkennen, dass alle drei HCT-116-Zelllinien eine Bande bei

32 kDa aufweisen und die Procaspase 3 exprimieren. Somit ist die Grundlage zum Vergleich der Apoptosefähigkeit dieser Zellen gegeben.

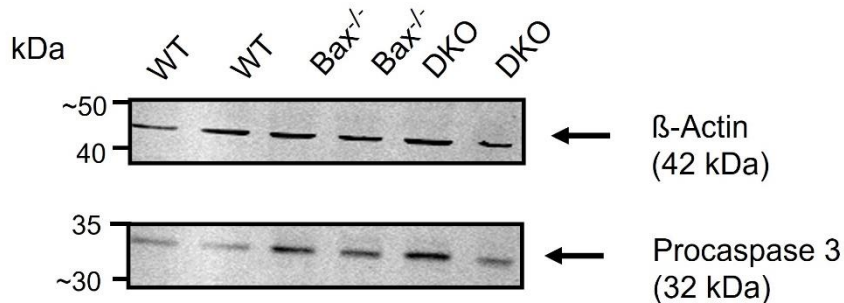


Abbildung 5: Expression von Procaspase 3 in HCT-116-Zellen

Western Blot zum Nachweis der Expression der Procaspase 3 in HCT-116-Zellen. Von jeder Zelllinie wurden jeweils zwei separat gewonnene Proben verwendet. Pro Probe wurden 5 µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle wurde β-Actin verwendet. Scheinbares Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

DKO Doppel-Knockout, **WT** Wildtyp.

3.2 Einfluss von IFN-γ und TNF-α auf Apoptose- und Seneszenzinduktion in den HCT-116-Zelllinien

Die Zytokine IFN-γ und TNF-α werden unter anderem von T-Helfer-1-Zellen gebildet und sezerniert. In den letzten Jahren sind sie auch in der Seneszenzforschung vermehrt in den Fokus gerückt, da sie – neben ihrer Abwehrfunktion gegen Viren sowie einige Bakterien und Protozoen – auch einen Zellzyklusarrest und somit eine sogenannte Zytokin-induzierte Seneszenz (CIS) einleiten können. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit auch für die HCT-116-Zellen überprüft werden, ob IFN-γ und TNF-α einen CIS bewirken, und wenn ja, ob dieser Effekt mit der Apoptosefähigkeit der Zellen im Zusammenhang steht.

3.2.1 Effekte von IFN-γ und TNF-α auf die Zellviabilität und den Zelltod

Zunächst sollte betrachtet werden, welchen Einfluss IFN-γ und TNF-α in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellviabilität haben und ob es hierbei einen Unterschied zwischen den WT- und den in ihrer Apoptosefähigkeit etwas eingeschränkten Bax^{-/-}-Zellen zu erkennen gibt. Zu diesem Zweck wurden die

Zellen über mehrere Tage mit den beiden Zytokinen in etablierten Standarddosierungen behandelt. In der lichtmikroskopischen Beurteilung der Morphologie (Abb. 6A) ist zu erkennen, dass in den mit IFN- γ und TNF- α behandelten Zellkulturen die Zellen deutlich weniger dicht angesiedelt sind als in der entsprechenden Mediumkontrolle. Der Effekt scheint sowohl bei den WT- als auch bei den Bax^{-/-}-Zellen gleichermaßen aufzutreten. Morphologische Unterschiede der einzelnen Zellen in Bezug auf Zellgröße, Zellbeschaffenheit oder Nucleoli sind maximal leicht ausgeprägt; die behandelten Zellen beider Zelllinien wirken im Vergleich zur Mediumkontrolle etwas abgerundet. Um im Folgenden eine genauere Aussage über die Quantität vitaler Zellen in den mit Zytokinen behandelten und den unbehandelten Proben treffen zu können, wurde ein XTT-Test durchgeführt (s. Abb. 6B).

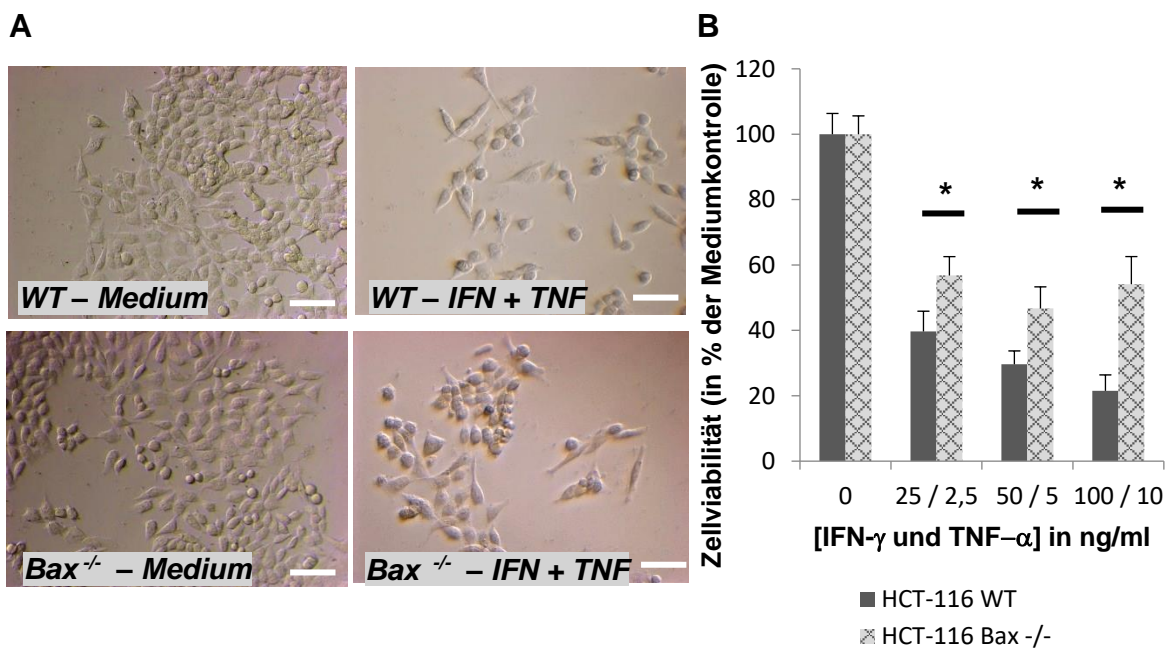


Abbildung 6: Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf Zellmorphologie und Viabilität

A Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der HCT-116-WT- bzw. Bax^{-/-}-Zellen nach 96 h Behandlung mit 200 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α . Vergrößerung 200x, Maßbalken entspricht 50 μ m.

B XTT-Test zur Beurteilung der Zellviabilität im Vergleich zur Mediumkontrolle nach 72-stündiger Behandlung mit IFN- γ und TNF- α in aufsteigenden Konzentrationen. Auswertung erfolgte nach 30 min Inkubationszeit. Mittelwert \pm SEM. n= 6 technical replicates pro Bedingung. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's post-hoc Test. Als statistisch signifikant (*) gelten p-Werte <0,05.

In diesem Test wird die Umwandlung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT in orangefarbenes Formazan photometrisch gemessen. Diese Umwandlung kann nur durch lebendige Zellen mit funktionsfähigen Mitochondrien durchgeführt werden. Der XTT-Test bestätigt in diesem Fall, dass sowohl bei den WT-, als auch bei den Bax^{-/-}- Zellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α weniger lebendige Zellen vorhanden sind als in der entsprechenden Mediumkontrolle. Dieser Effekt zeigt zudem eine Konzentrationsabhängigkeit. Desweiteren sind die WT-Zellen signifikant stärker von der Wachstumseinschränkung betroffen als die Bax^{-/-}-Zellen.

Allein durch den XTT-Test ist aber noch nicht erkennbar, ob die niedrigere Zellzahl nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α eher durch einen zytotoxischen Effekt der Zytokine, also durch die Induktion von Zelltod, zustande kommt, oder ob die Zellen unter Zytokinbehandlung nur eine geringere Wachstumsrate hatten, die die Unterschiede in der Zellzahl zur Mediumkontrolle erklären kann. Um zu untersuchen, inwieweit der Unterschied im obigen XTT-Test durch einen zytotoxischen Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf die HCT-116-Zellen bedingt ist, wurde daher ein LDH-Test durchgeführt (s. Abb. 7).

Ergebnisse

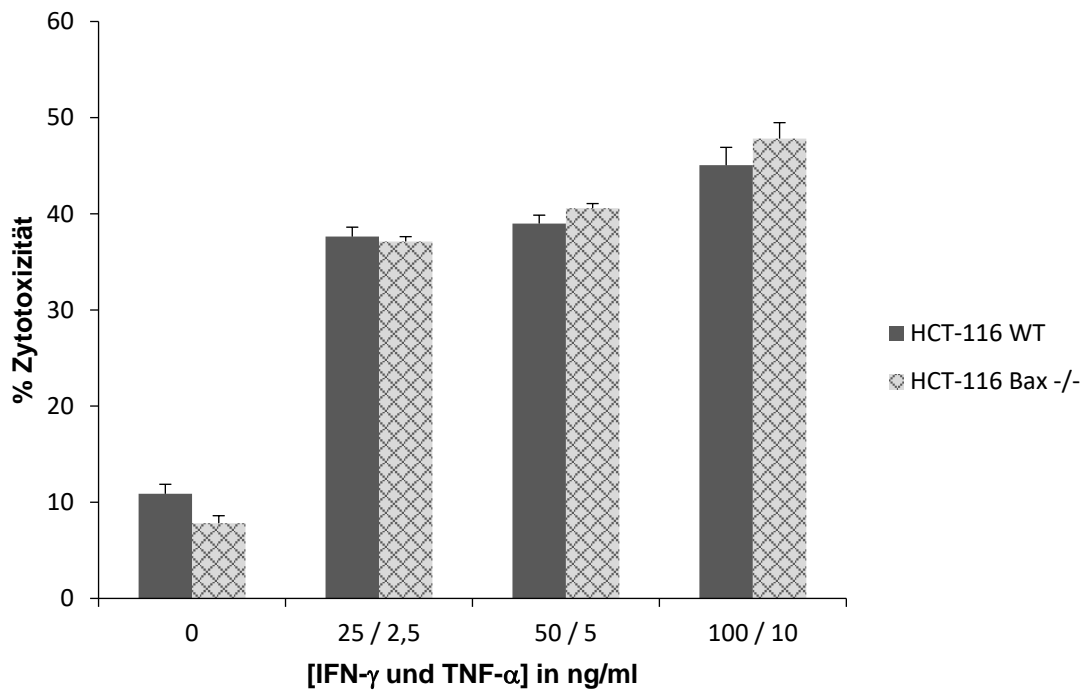


Abbildung 7: Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf die Induktion von Zelltod

LDH-Test zum Vergleich der Zytotoxizität von IFN- γ und TNF- α in aufsteigenden Konzentrationen nach 72-stündiger Behandlung. Zuvor wurden 40.000 Zellen/Well ausgesät. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen an der Gesamtzellzahl (% Zytotoxizität) wurde für jede Well die LDH im Überstand ins Verhältnis zur Gesamt-LDH nach Lyse der jeweils adhärenen Zellen gesetzt. Mittelwert \pm SEM. n = 6 technical replicates pro Bedingung.

Mit diesem Test wird das Vorhandensein des Enzyms Laktatdehydrogenase im Zellüberstand gemessen – ein Enzym, das normalerweise nur intrazellulär vorkommt und somit ein Marker für Zerstörung der Zellintegrität und Zelltod ist.

Die Ergebnisse des LDH-Tests zeigen, dass die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α einen zytotoxischen Effekt auf die HCT-116-Zellen hat und zu Zelltod führt, da in den Zytokin-behandelten Proben deutlich mehr LDH im Überstand zu finden ist als in den jeweiligen Mediumkontrollen. Dieser Effekt scheint nur sehr leicht konzentrationsabhängig zu sein bzw. bei den verwendeten Konzentrationen bereits gesättigt gewesen zu sein. Im Gegensatz zum XTT-Test ist hier kein signifikanter Unterschied zwischen den WT und Bax^{-/-} vorhanden.

3.2.2 Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf das Wachstumsverhalten im Growth Arrest Assay

Da sich die WT- und Bax^{-/-}-Zelllinien hinsichtlich der Zelltodinduktion durch IFN- γ und TNF- α nicht wesentlich unterscheiden, sollte daraufhin noch in einem Growth Arrest Assay untersucht werden, wie genau das Wachstum der beiden Zelllinien während und nach der Behandlung mit IFN- γ und TNF- α beeinträchtigt wird. Sowohl bei den WT-Zellen (Abb. 8A) als auch bei den Bax^{-/-}-Zellen (Abb. 8B) ist sogar während der Phase der Behandlung mit IFN- γ und TNF- α ein Wachstum zu erkennen, wenn auch schwächer ausgeprägt als in der entsprechenden Mediumkontrolle.

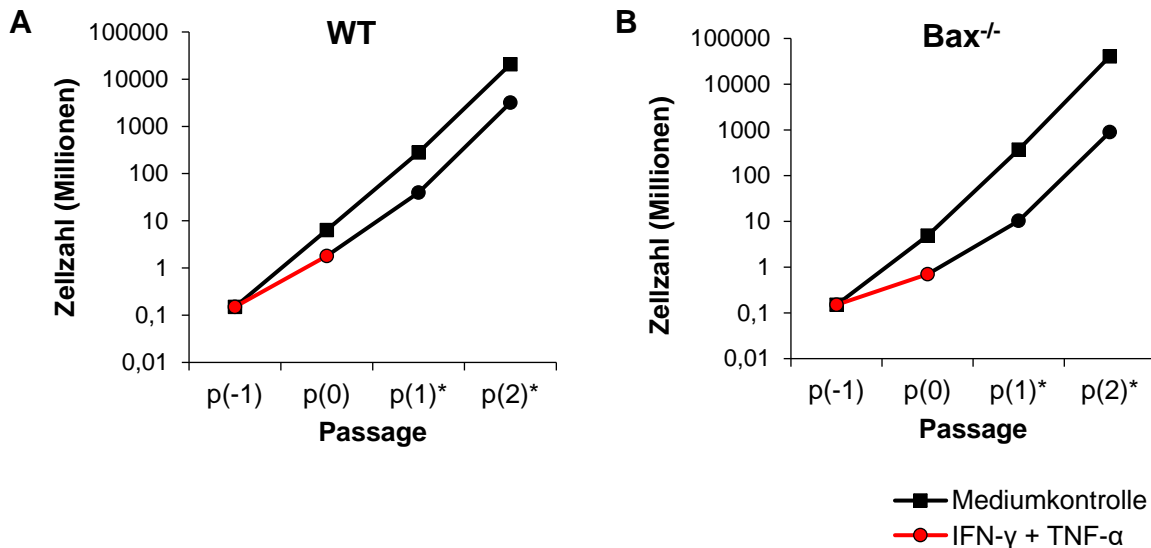


Abbildung 8: Growth-Arrest-Assay der HCT-116-Zellen nach TH1-Zytokin-Behandlung

Repräsentative Growth-Arrest-Assays nach 72 Stunden Behandlung mit 100 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α bzw. mit Zellkulturmedium als Kontrolle.

A Growth Arrest Assay der HCT-116-WT-Zellen

B Growth Arrest Assay der HCT-116-Bax^{-/-}-Zellen

Nach der jeweiligen Behandlung erfolgte eine Waschung und erneute Aussaat mit Zellkulturmedium für Passage (p) 1 und 2. Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Werte mit * sind extrapoliert. Versuch wurde unter ähnlichen Bedingungen sowie mit ähnlichen Ergebnissen drei weitere Male wiederholt.

Nachdem die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α beendet wurde und die Zellen nur noch mit Zellkulturmedium kultiviert wurden, stieg die Proliferationsrate wieder an und in der zweiten Passage war die Wachstumsgeschwindigkeit, erkennbar am Anstieg der Wachstumskurve, bereits wieder mit der der Mediumkontrolle zu vergleichen. Die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α haben also über die gesamte Zellpopulation gesehen maximal einen Wachstumsbremsenden Effekt, konnten aber nicht einmal während der Behandlung die Proliferation komplett stoppen. In diesem Versuch war der wachstumshemmende Effekt der beiden Zytokine bei den Bax^{-/-}-Zellen etwas stärker ausgeprägt, persistierte jedoch auch nicht in den anschließenden Passagen mit Medium.

3.2.3 qPCR für CXCL-10 zur Kontrolle des IFN- γ -Signalwegs in den HCT-116-Zellen

Da der gemessene Effekt von IFN- γ und TNF- α auf die HCT-116-Zellen insgesamt im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen relativ gering ist, sollte noch getestet werden, ob der entsprechende Signalweg für diese Zytokine in den HCT-116-Zellen überhaupt intakt ist oder ob die geringe Reaktion der Zellen auf die IFN- γ und TNF- α -Behandlung auf einen Defekt in der Signalkaskade zurückzuführen ist.

IFN- γ bindet im menschlichen Organismus an den IFN- γ -Rezeptor. Ein Protein, das in Zellen nach Stimulation durch IFN- γ vermehrt exprimiert wird, ist *IFN-inducible protein 10* (CXCL-10). Um die Aktivierung der IFN- γ -Signalkaskade zu untersuchen, wurden daher in einer quantitativen Polymerasekettenreaktion jeweils die mit IFN- γ und TNF- α behandelten Zellen und die entsprechenden Mediumkontrollen exemplarisch auf ihren CXCL-10-mRNA-Gehalt hin verglichen (s. Abb. 9).

Sowohl bei den HCT-116-WT-Zellen (Abb. 9A) als auch bei HCT-116-Bax^{-/-} (Abb. 9B) ist nach der Behandlung ein deutlicher Anstieg der CXCL-10-Expression zu erkennen. Dies spricht sehr dafür, dass IFN- γ an die Zellen gebunden und eine vermehrte Transkription von CXCL-10 bewirkt hat.

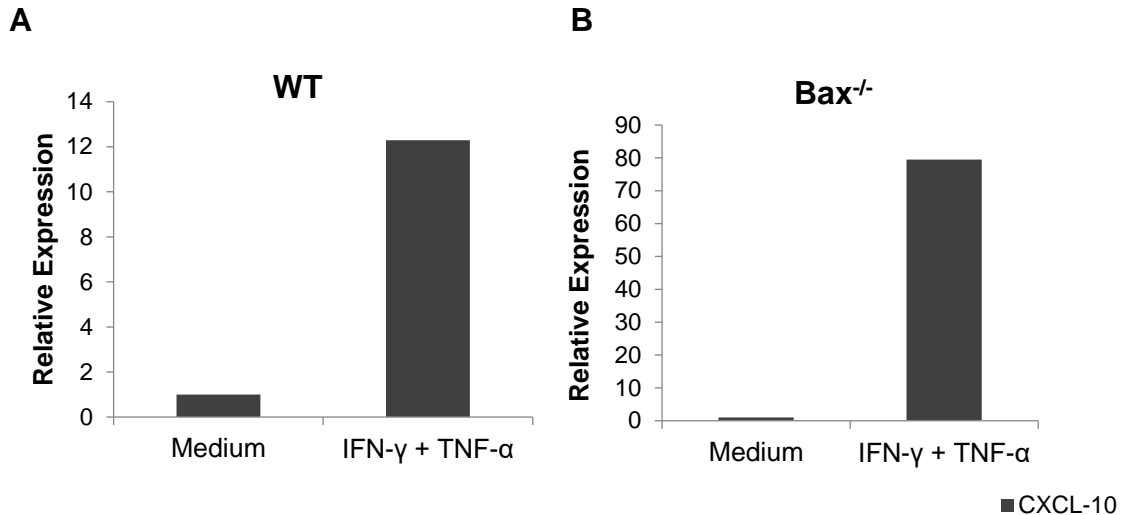


Abbildung 9: Expression von CXCL-10 nach Behandlung mit IFN- γ und TNF- α

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von CXCL-10-RNA nach 96-stündiger Behandlung der HCT-116-Zellen mit 100 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α bzw. mit Zellkulturmedium. Einzelexperiment mit Doppelwerten für jede Bedingung.

A Relative CXCL-10-Expression in HCT-116-WT-Zellen nach IFN- γ und TNF- α -Behandlung.

B Relative CXCL-10-Expression in HCT-116-Bax^{-/-}-Zellen nach IFN- γ und TNF- α -Behandlung.

Mit IFN- γ und TNF- α als Stimulatoren konnte in den HCT-116-Zellen also trotz intakter Signalwege kein stabiler Wachstumsarrest induziert werden, sodass bei fehlender Seneszenzinduktion auch keine Aussagen zum Einfluss Apoptose-regulierender Proteine auf ebendiese zu treffen sind. Zudem unterschieden sich die WT- und Bax^{-/-}-Zelllinien im Hinblick auf ihr Wachstums- und Zelltodverhalten unter der Zytokinbehandlung nur wenig, sodass der Ansatz mit IFN- γ - und TNF- α -Behandlung nicht weiterverfolgt wurde. Stattdessen sollte zur Einleitung von Seneszenz in den HCT-116-Zellen nun ein anderer etablierter Induktor verwendet werden, nämlich das Chemotherapeutikum Doxorubicin.

3.3 Einfluss des Zytostatikums Doxorubicin auf die Induktion von Apoptose und Seneszenz in HCT-116-Zellen

3.3.1 Einfluss von Doxorubicin auf Zellviabilität und Zelltod

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist Doxorubicin ein Zytostatikum, das in die DNA interkaliert und die Zellteilung stört. Da die Bax^{-/-}-Zellen einen Defekt im intrinsischen Apoptose-Pathway besitzen, wäre zu erwarten, dass es hier unter Behandlung mit Doxorubicin zu einem anderen Wachstums- und Zelltodverhalten kommt als bei den WT-Zellen. Um dies zu prüfen und um die richtige Dosierung für weitere Versuche zu etablieren, wurde zunächst mittels XTT-Test der Einfluss von Doxorubicin auf die Zellviabilität in den beiden Zelllinien untersucht (s. Abb. 10).

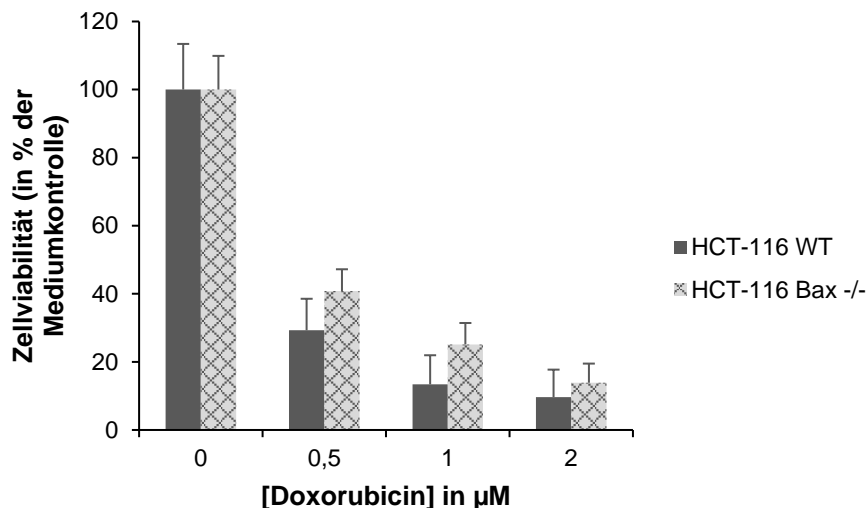


Abbildung 10: Einfluss von Doxorubicin auf die Zellviabilität

XTT-Test zur Beurteilung der Zellviabilität nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin in aufsteigenden Konzentrationen und anschließend 48-stündiger Inkubation in Zellkulturmedium. 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Auswertung erfolgte nach 30 min Inkubationszeit. Extinktion bei 492 nm gemessen und ins Verhältnis zur Mediumkontrolle gesetzt.

Mittelwert ± SEM. n= 6 technical replicates pro Bedingung. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's post-hoc Test. Keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert ≤0,05) zwischen WT- und Bax^{-/-}-Zellen bei Behandlung mit gleicher Konzentration an Doxorubicin.

Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Abnahme der lebendigen Zellen unter Doxorubicin-Behandlung, dieser Effekt war zudem angedeutet konzentrationsabhängig. In niedrigeren Dosierungen scheinen die Bax^{-/-}-Zellen

die Behandlung mit Doxorubicin etwas besser überlebt zu haben als die WT-Zellen mit dem funktionierenden Bax, allerdings war der Unterschied in diesem Experiment nicht statistisch signifikant.

3.3.2 Einfluss von Doxorubicin auf den Zelltod im LDH-Test

Der XTT-Test zeigte eine Reduktion der Zellzahl unter Behandlung mit Doxorubicin, aber da erstens durch diesen Test keine Aussage über den Zelltod gemacht werden kann und zweitens kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Bax^{-/-}-Zellen festgestellt werden konnte, sollte auch hier ein LDH-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität der Doxorubicin-Behandlung in den beiden Zelllinien durchgeführt werden (s. Abb. 11).

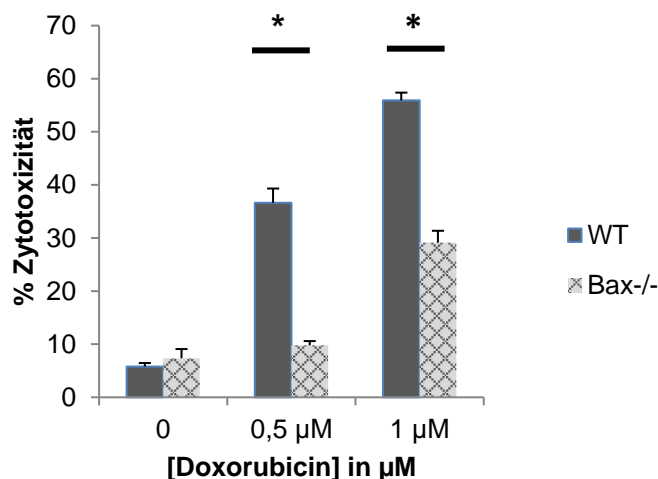


Abbildung 11: Einfluss von Doxorubicin auf Zelltodinduktion

LDH-Test zum Vergleich der Zytotoxizität von Doxorubicin in aufsteigenden Konzentrationen nach 72-stündiger Behandlung der HCT-116-Zellen. 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen (% Zytotoxizität) wurde für jede Well die LDH im Überstand ins Verhältnis zur Gesamt-LDH nach Lyse der jeweils adhären Zellen gesetzt.

Mittelwert ± SEM. n= 6 technical replicates pro Bedingung. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's post-hoc . Als statistisch signifikant (*) gelten p-Werte ≤0,05.

Hier zeigte sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt des Doxorubicins. In beiden Zelllinien führte das Zytostatikum zu einer Zunahme des Zelltods, jedoch in der WT-Gruppe zu einem signifikant höheren Anteil toter Zellen als in

der Bax^{-/-}-Gruppe, passend zur initialen Hypothese, dass die Bax-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der Apoptosefähigkeit unter Doxorubicin-Behandlung führen könnte.

3.3.3 Untersuchung der Zelltodinduktion in der Durchflusszytometrie und im Caspase-3-Assay

Um genauer spezifizieren zu können, inwieweit es sich bei dem Zelltod, der unter Doxorubicin-Behandlung vor allem in den WT-Zellen, weniger auch in den Bax^{-/-}-Zellen stattfindet, wirklich um Apoptose handelt, wurde diesbezüglich zunächst eine Durchflusszytometrie nach TMRE durchgeführt. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, sammelt sich TMRE in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential an, während es bei sterbenden Zellen nicht mehr akkumuliert und somit niedriger ist. In Abbildung 12A ist zu erkennen, dass es bei den WT-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin zu einem deutlichen zweiten Peak von Zellen mit niedrigem TMRE, also mit kollabiertem Membranpotential der Mitochondrien, kommt, während dieser bei den Bax^{-/-}-Zellen wesentlich kleiner ausgeprägt ist. Über alle Versuche gemittelt ergab sich bei den Bax^{-/-}-Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen hinsichtlich der TMRE-Akkumulation, während es bei den WT-Zellen zu einer deutlichen Zunahme TMRE-niedriger Zellen kam. Dies könnte darauf hinweisen, dass Doxorubicin nur in den WT-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion führt, während dies in den Bax^{-/-}-Zellen nicht der Fall ist.

Nun sollte noch mit einem weiteren Marker bestätigt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen den WT- und den Bax^{-/-}-Zellen in der Apoptosefähigkeit unter Doxorubicin-Behandlung gibt. Daher wurde, wie im Abschnitt *Material und Methoden* beschrieben, eine weitere durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, bei der mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs APC über Annexin-V eine Umkehrung der Zellmembran untersucht werden konnte, wie sie bei der Apoptose typisch ist (s. Abb. 13).

Ergebnisse

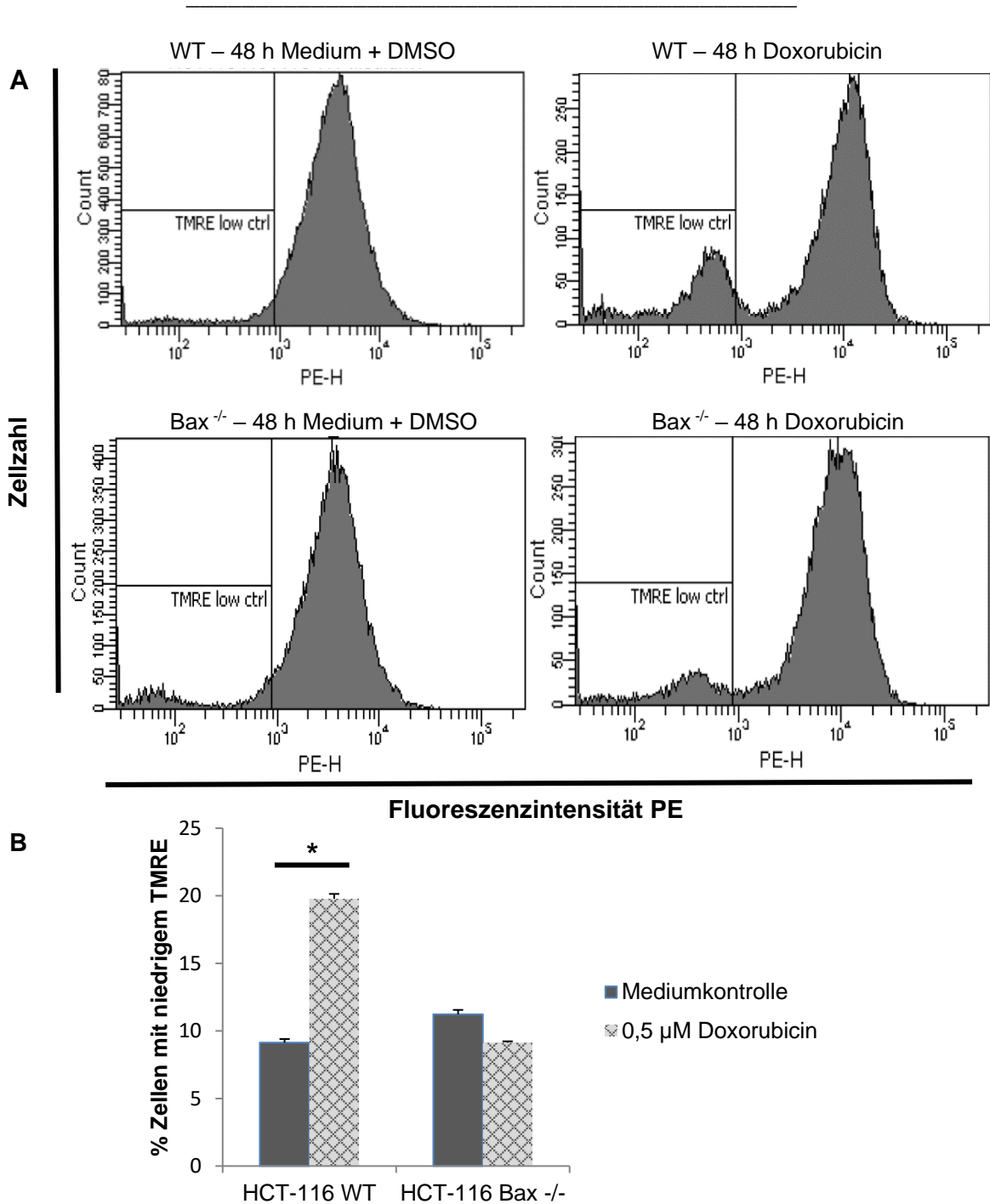


Abbildung 12: Nachweis von TMRE in zur Zelltodanalyse

Durchflusszytometrie zum Nachweis von TMRE nach 48 Stunden Behandlung der HCT-116-Zellen mit 0,5 µM Doxorubicin bzw. Mediumkontrolle mit der gleichen Menge DMSO versetzt. **PE** Phycoerythrin.

A Repräsentative Plots aus der Durchflusszytometrie für TMRE.

B Vergleich des Anteils der Zellen mit niedrigem TMRE in behandelten und unbehandelten Zellen. Grenzwert für „niedriges TMRE“ entspricht den Abbildungen in 12A. Mittelwert ± SEM. n = 6 technical replicates. Statistik mittels One-way ANOVA und Tukey's post-hoc. Als signifikant (*) gelten p-Werte ≤ 0,05.

Ergebnisse

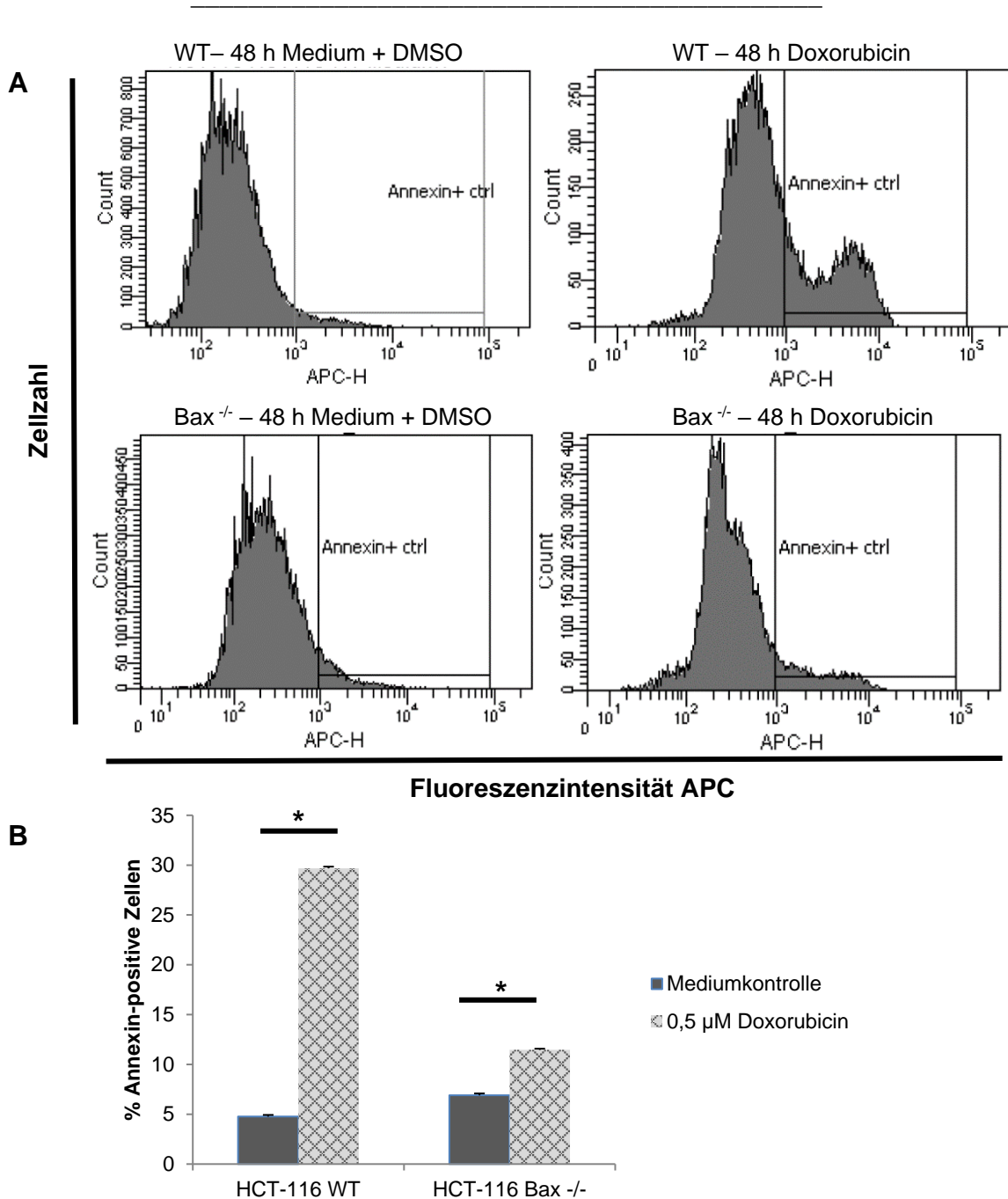


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung der Annexin-Bindung an HCT-116-Zellen mittels APC

Durchflusszytometrie zur Quantifizierung Annexin-V-markierter Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit 0,5 µM Doxorubicin bzw. Mediumkontrolle mit DMSO. **APC** Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin.

A Repräsentative Histogramme aus der Durchflusszytometrie.

B Vergleich des Anteils Annexin-positiver Zellen in behandelten und unbehandelten Gruppen. Grenzwert für „Annexin-positiv“ entspricht Abbildung 13A. Mittelwert ± SEM. n = 6 technical replicates. Statistik mittels One-way ANOVA sowie Tukey's post-hoc. Als statistisch signifikant (*) gelten p-Werte ≤ 0,05.

Werden WT-Zellen mit Doxorubicin behandelt, so zeigt sich im Histogramm der Durchflusszytometrie ein deutlicher Peak Annexin-positiver Zellen; in der Mediumkontrolle hingegen ist ein solcher Peak nicht zu erkennen (Abb. 13A). Bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen sieht man in den Histogrammen im Vergleich zur Mediumkontrolle nur einen geringen Anstieg Annexin-positiver Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin. Dieser Anstieg ist zwar ebenfalls signifikant (s. Abb. 13B), jedoch ist er bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen deutlich geringer ausgeprägt. Sowohl die Messung der Mitochondrienaktivität mittels TMRE als auch die Messung der Annexin-V-Bindung an Phosphatidylserin sprechen also dafür, dass die WT-Zellen unter Doxorubicin-Behandlung vermehrt in Apoptose gehen, während dies bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen nur äußerst begrenzt der Fall ist. Sie zeigen zwar einen geringen Anstieg an Zellen mit nach außen gekehrtem Phosphatidylserin, jedoch sind kaum Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wie es für Apoptose ebenfalls typisch wäre, zu finden.

Da die Durchflusszytometrie bereits Hinweise auf einen Unterschied im Apoptose-Verhalten zwischen WT- und $Bax^{-/-}$ -Zellen geliefert hat, sollte nun noch die Aktivität der Caspase 3 in beiden Zelllinien nach Behandlung mit Doxorubicin untersucht werden (s. Abb. 14). Hierzu wurde ein Caspase-3-Assay verwendet, bei dem die Aktivität der Caspase 3 über die Spaltung des Substrats Aminoluziferin gemessen wurde, dessen Spaltprodukte über Lumineszenz quantifiziert werden können (für eine genaue Beschreibung s. *Material und Methoden*). Um Verzerrungen durch eine unterschiedliche Zellzahl in mit Doxorubicin behandelten und unbehandelten Proben zu vermeiden, wurden die gemessenen Werte im Anschluss auf die Proteinmenge der Proben, die mittels BCA-Assay bestimmt wurde, normiert. In Abbildung 14 zeigt sich bei den WT-Zellen eine 6-fach gesteigerte Apoptoseaktivität der mit Doxorubicin behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen der Mediumkontrolle, während die Aktivität bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen nur ca. auf das 2-fache angestiegen war. Zudem ist nur bei den WT-Zellen der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen statistisch signifikant. Auch dieses Ergebnis spricht für eine durch die $Bax^{-/-}$ -

Defizienz deutliche Einschränkung in der Apoptosefähigkeit der Bax^{-/-}-Zellen unter Doxorubicin-Behandlung.

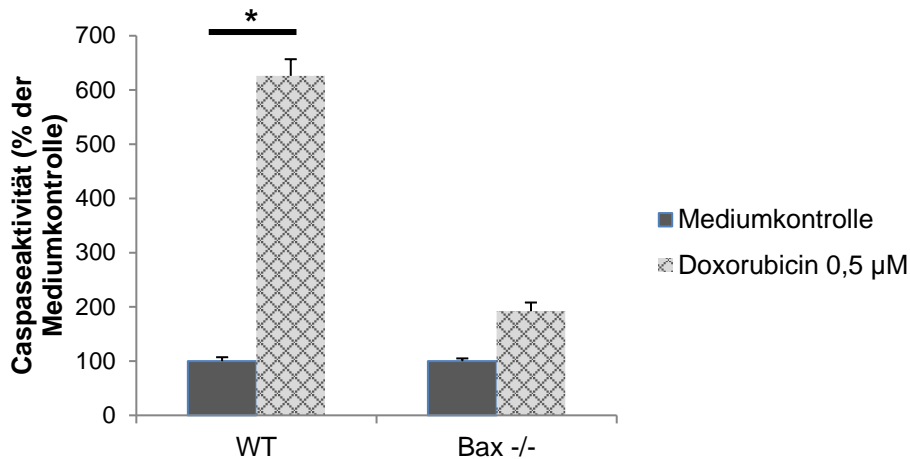


Abbildung 14: Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Caspase-3-Assay

Caspase-3-Aktivitätsassay nach 48 Stunden Behandlung mit Medium + DMSO bzw. 0,5 μM Doxorubicin. Lumineszenzbestimmung alle 2 min, Zur Berechnung Werte der Caspase-3-Aktivität nach 36 min verwendet, da hier höchste Aktivität. Werte normiert auf im BCA-Assay bestimmten Proteingehalt der Proben. Mittelwert ± SEM. n = 3 technical replicates. Statistik mittels One-way ANOVA sowie Tukey's post-hoc. Als signifikant (*) gelten p-Werte ≤0,05.

3.3.4 Effekte von Doxorubicin auf das Wachstumsverhalten der HCT-116-Zellen

Um nun zu beobachten, ob das Unvermögen bzw. die Schwierigkeit, unter Doxorubicin in Apoptose zu gehen, in den Bax^{-/-}-Zellen stattdessen zu einer vermehrten Induktion von Seneszenz führt, sollte zunächst das Wachstumsverhalten beider Zelllinien unter Doxorubicin-Behandlung beobachtet werden. Bereits morphologisch zeigten sich in beiden Zelllinien deutliche Effekte der Behandlung (s. Abb. 15). Während die unbehandelten Mediumkontrollen sowohl der WT- als auch der Bax^{-/-}-Zellen dicht mit Zellen bewachsen sind, zeigt sich in den behandelten Gruppen, passend zu den Ergebnissen des XTT- und LDH-Tests, ein deutlich vermindertes Wachstum. Unter den WT-Zellen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, sind außerdem geschrumpfte, zerfallene und fragmentierte Zellen zu sehen, passend zu einem durch Doxorubicin induzierten Zelltod. Die Bax^{-/-}-Zellen hingegen zeigten nach Doxorubicin-Behandlung

häufiger eine deutlich veränderte Morphologie: Die Zellen wirken insgesamt vergrößert, sie entwickeln eine flache, Spiegelei-ähnliche Morphologie, die Zellkerne sind sehr prominent und enthalten zum Teil sogar multiple Nucleoli. Dies spricht weniger für eine Induktion von Zelltod in dieser Gruppe, sondern eher für die Ausbildung seneszenten Zellen, deren Morphologie typischerweise ebenfalls durch große und flache Zellen gekennzeichnet ist.

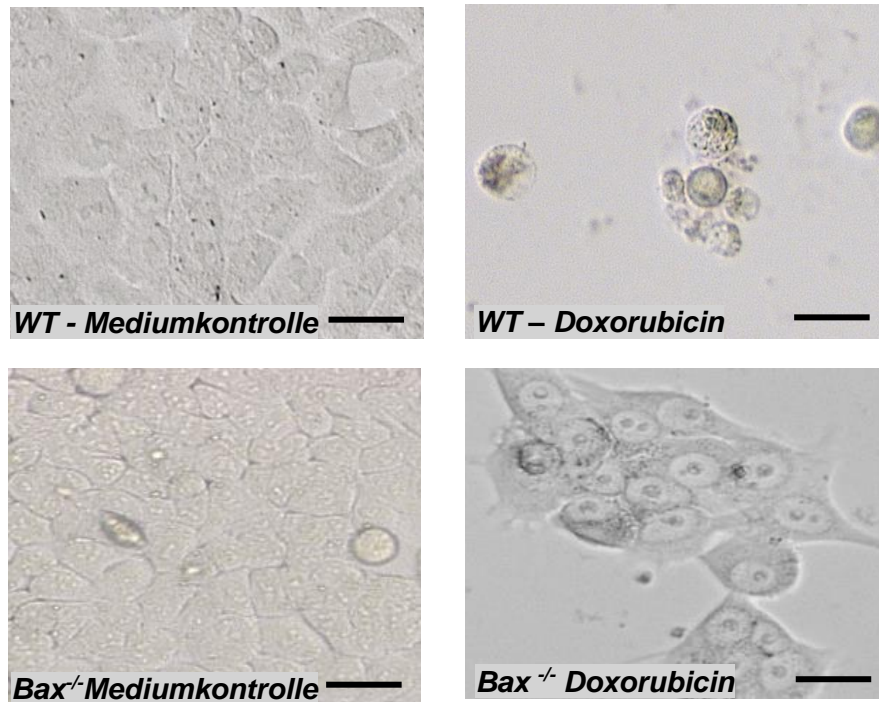


Abbildung 15: Morphologie nach Doxorubicin-Behandlung

Morphologie der HCT-116-Zellen nach 96-stündiger Behandlung mit 0,5 µM Doxorubicin. Lichtmikroskopische Aufnahmen unter 200-facher Vergrößerung. Repräsentative Bildausschnitte. Maßbalken entspricht 50 µm.

Nun sollte auch quantitativ beurteilt werden, inwieweit die Behandlung mit Doxorubicin in den WT- und Bax^{-/-}-Zellen zu unterschiedlichem Wachstumsverhalten führt (s. Abb. 16). Hierzu wurden pro Experiment von beiden Zelllinien je zwei Mal 100.000 Zellen ausgesät und mit Doxorubicin bzw. mit einer DMSO-Mediumkontrolle behandelt. Nach 24 Stunden wurden die überlebenden Zellen geerntet, gewaschen, gezählt und ohne Doxorubicin für zwei weitere Passagen ausgesät. Wie in Abbildung 16 zu sehen, wachsen

sowohl die WT- als auch die Bax^{-/-}-Zellen, sofern sie nicht mit Doxorubicin behandelt werden, exponentiell bis zu einer Zellzahl von über 1 Milliarde. Unter Behandlung mit Doxorubicin jedoch erreicht die maximale Zellzahl nicht einmal eine Million.

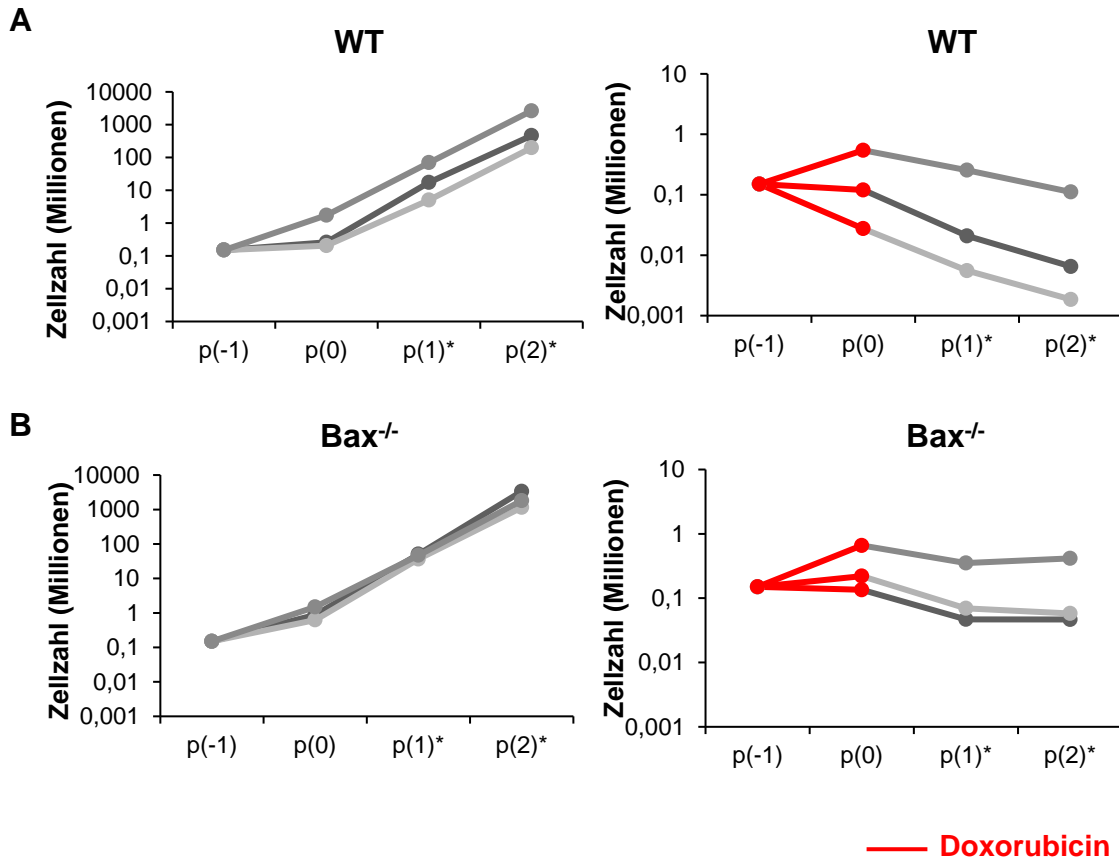


Abbildung 16: Wachstumsverhalten der HCT-116-Zellen unter Doxorubicin-Behandlung

Repräsentative Growth Arrest Assays nach 24 Stunden Behandlung mit 0,5 μ M Doxorubicin bzw. mit Zellkulturmedium und DMSO als Kontrolle. Anschließend jeweils Waschung und Neuaussaat mit Zellkulturmedium für Passage (p) 1 und 2. Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Pro Bedingung dreimalige Durchführung des Versuchs. * Werte für p(1) und p(2) sind extrapoliert.

A Growth Assays der HCT-116-WT-Zellen ohne bzw. mit Doxorubicin-Behandlung.

B Growth Assays der HCT-116-Bax^{-/-}-Zellen ohne bzw. mit Doxorubicin-Behandlung.

Bei den WT-Zellen, die keinen Defekt im Gen für Bax haben, sieht man in diesem Growth Arrest Assay unter der Behandlung einen reduktiven Effekt auf die Zellzahl; nach der Behandlung scheint sich der zytotoxische Effekt des

Doxorubicin weiterhin auf die Zellen auszuwirken und es kommt zu einer weiteren Abnahme der Zellzahl (Abb. 16A). Bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen ist der Effekt während der Behandlungs-Passage ähnlich, auch wenn es hier noch etwas weniger zu einer Reduktion der Zellzahl kommt (Abb. 16B). Interessanterweise bleibt die Zellzahl jedoch auch in den folgenden Passagen im Vergleich zu den WT-Zellen weitestgehend konstant, was ein weiterer Hinweis auf das Eintreten von Seneszenz sein könnte, die durch die Behandlung mit Doxorubicin induziert wurde.

3.3.5 Beurteilung der Seneszenzinduktion durch Doxorubicin im SA- β -Galactosidase-Assay

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass $Bax^{-/-}$ -Zellen weniger in Apoptose gehen als WT-Zellen, wenn sie Stress in Form von Doxorubicin ausgesetzt sind; zudem hat der Growth-Arrest-Assay gezeigt, dass es bei den $Bax^{-/-}$ -Zellen unter Doxorubicin-Behandlung zu einem Wachstumsstillstand sowie zu einer Seneszenz-charakteristischen Veränderung der Morphologie kommt. Daher sollte nun mit einer spezifischeren Methode überprüft werden, inwieweit die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin tatsächlich zur Seneszenzinduktion führt und ob es zwischen den WT- und $Bax^{-/-}$ -Zelllinien einen Unterschied gibt. Hierzu wurde der in der Seneszenz-Forschung weit verbreitete SA- β -Galactosidase-Assay verwendet (s. Abb. 17). Bei diesem Test wird die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase, ein lysosomales Enzym, das bei seneszenten Zellen verstärkt exprimiert wird, blau angefärbt und die Zellen mit Blaufärbung im Anschluss quantifiziert (s. 2.2.6).

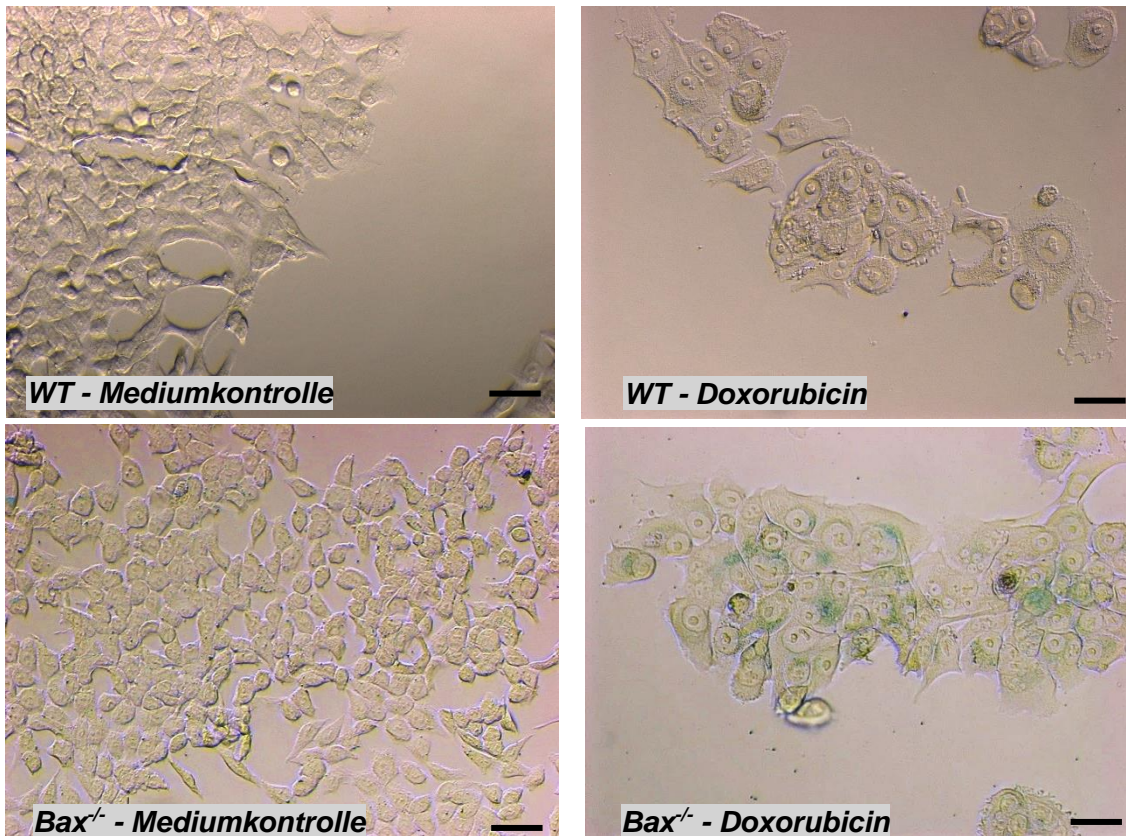
In Abbildung 17A sind repräsentative Ausschnitte der mit Doxorubicin bzw. mit Mediumkontrolle und DMSO behandelten WT- und $Bax^{-/-}$ -Zellen zu sehen. Es ist bei beiden Zelllinien ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit Doxorubicin behandelten Zellen zu erkennen. Während die unbehandelten Zellen relativ dicht wachsen und eine normale Form aufweisen, zeigen sowohl die WT- als auch die $Bax^{-/-}$ -Zellen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, eine Spiegelei-artige Vergrößerung und Abflachung der

Zellen, sowie prominente Nucleoli, wie sie auch für seneszente Zellen charakteristisch sind.

Allerdings gibt es unter den behandelten Bax^{-/-}-Zellen deutlich mehr blaugefärbte Zellen als unter den WT-Zellen. Auch in der Auszählung (s. Abb. 17B) bestätigt sich, dass es nach Behandlung mit 0,5 µM Doxorubicin einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Bax^{-/-}-Zellen in der Expression von SA-β-Galaktosidase gibt. Bei einer noch stärkeren Behandlung mit 1 µM Doxorubicin kommt es bei den Bax^{-/-}-Zellen eher wieder zu einer Abnahme des Anteils seneszenter Zellen und der Unterschied ist nicht mehr signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Experimente mit Doxorubicin in den HCT-116-Zellen, dass Zellen mit Bax-Defizienz unter Doxorubicin-Behandlung signifikant weniger in den Zelltod gehen als HCT116-WT-Zellen. Dies scheint vor allem durch den signifikant geringeren Anteil an apoptotischen Zellen begründet zu sein. Stattdessen zeigt sich unter Doxorubicin-Behandlung in den Bax^{-/-}-Zellen ein Wachstumsarrest, der auch nach Wegnahme der Behandlung persistiert, während die WT-Zellen in ihrer Anzahl deutlicher abnehmen. Der Anteil seneszenter Zellen ist bei den Bax^{-/-}-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin signifikant höher als bei den WT-Zellen, sodass ein Zusammenhang der verminderten Apoptosefähigkeit mit der Seneszenzinduktion vermutet werden kann.

A



B

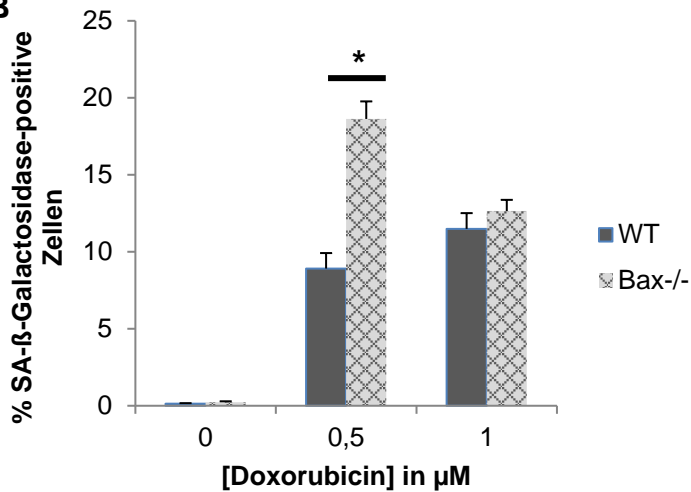


Abbildung 17: SA- β -Galactosidase-Assay

A Morphologie der HCT-116-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit 0,5 μM Doxorubicin bzw. entsprechendem Zellkulturmedium mit DMSO. Repräsentative Bildausschnitte. Lichtmikroskopische Aufnahmen in 200x Vergrößerung, Maßbalken = 100 μm .

B Kumulative Ergebnisse eines SA- β -Galactosidase-Assays nach 48 Stunden Behandlung mit Mediumkontrolle/DMSO, 0,5 μM oder 1 μM Doxorubicin. Gesamtzellzahl mithilfe von DAPI-Färbung ermittelt. Mittelwert \pm SEM. n = 9 technical replicates. Statistik mittels One-way ANOVA sowie Tukey's post hoc. Als statistisch signifikant (*) gelten p-Werte $\leq 0,05$.

3.3.6 Untersuchung im Vergleich mit HCT-116 Bax-Bak-Doppelknockout-Zellen

Zuletzt sollte noch mithilfe der HCT-116-DKO-Zellen untersucht werden, ob das Fehlen von Bax und Bak gleichzeitig einen stärkeren Effekt auf die Induktion von Seneszenz hat als eine alleinige Bax-Defizienz. Hierzu wurde zunächst ein weiterer LDH-Test durchgeführt, um die Induktion von Zelltod in den DKO-Zellen mit den WT- und Bax^{-/-}-Zellen zu vergleichen (s. Abb. 18). In diesem Versuch zeigt sich bereits bei der Mediumkontrolle der WT-Zellen eine relativ hohe LDH-Aktivität, möglicherweise durch die in diesem Experiment gewählte höhere Zelldichte. Wie bereits im vorhergegangenen LDH-Test in Abbildung 11 nimmt der Anteil toter Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin aber auch hier trotzdem noch deutlich zu. Bei den Bax^{-/-}-Zellen bleibt hingegen die LDH-Aktivität relativ stabil und steigt auch bei Behandlung mit 1 µM Doxorubicin nur leicht an. Bei den DKO-Zellen zeigen sich wie bei den Bax^{-/-}-Zellen bei Inkubation mit 0,5 µM Doxorubicin noch keine größeren LDH-Veränderungen, bei 1 µM Doxorubicin hingegen kommt es zu einem deutlicheren Anstieg der LDH-Aktivität, der sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausgangswerte in den Mediumkontrollen kaum noch von den WT-Zellen unterscheidet, sodass eine zusätzliche Hemmung des Zelltods durch das Bak-Knockout zumindest global im LDH-Test nicht erkennbar ist.

Nun sollte noch analysiert werden, ob es bei den DKO-Zellen im Vergleich zu den Bax^{-/-}-Zellen eine ähnliche oder sogar eine stärkere Seneszenzinduktion unter der Doxorubicin-Behandlung gibt. Hierzu wurde zunächst ein Growth Arrest Assay durchgeführt (s. Abb. 19A). Es zeigte sich bei den WT-Zellen, ähnlich wie in den Versuchen in Abbildung 16 ein deutlicher Abfall der Zellzahl unter der Behandlung und auch fortgesetzt in den nachfolgenden Passagen, in denen die Zellen nur noch in Mediumkontrolle inkubiert waren. Wie in den Vorexperimenten blieb die Zellzahl bei den Bax^{-/-}-Zellen hingegen eher auf einem konstanten Level. Die DKO-Zellen waren während der Doxorubicin-Behandlung ähnlich stabil wie die Bax^{-/-}-Zellen, im Anschluss nahm ihre Zellzahl aber minimal stärker ab. In diesem Experiment ist also kein additiver Effekt des Bak-Knockouts auf die

Induktion eines Wachstumsarrests zu erkennen, im Gegenteil scheint sogar bei den Zellen mit alleinigem Fehlen von Bax ein etwas stabilerer Wachstumsarrest induziert zu werden.

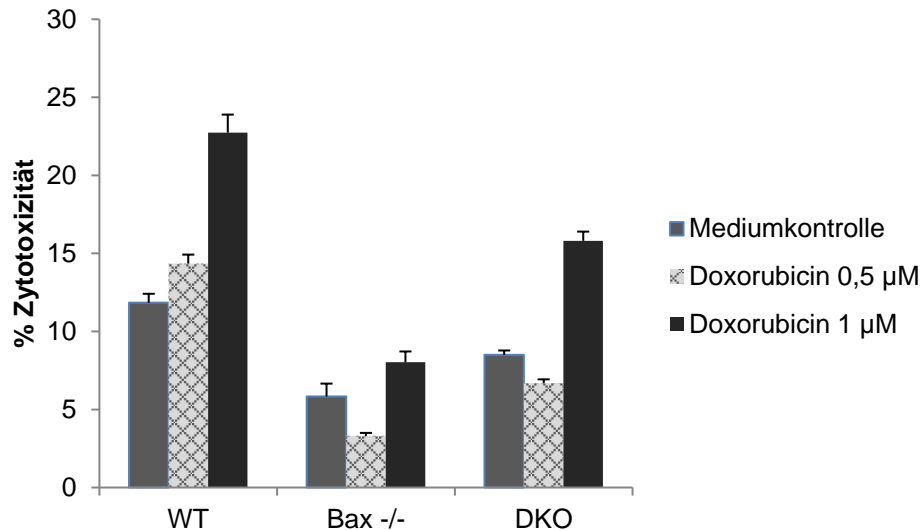


Abbildung 18: Zelltodinduktion durch Doxorubicin in DKO-Zellen im Vergleich zu WT und Bax^{-/-}

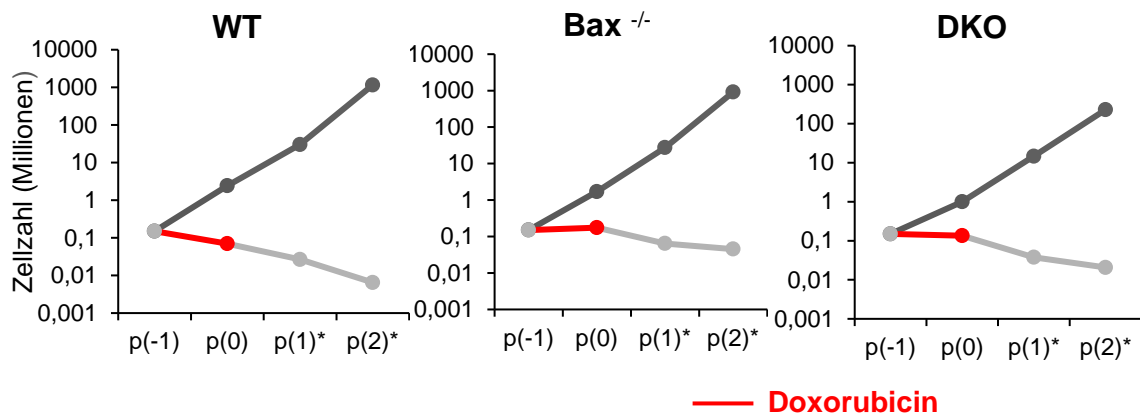
LDH-Test nach 72-stündiger Behandlung mit Doxorubicin in aufsteigenden Konzentrationen. 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen (% Zytotoxizität) wurde für jede Well die LDH im Überstand ins Verhältnis zur Gesamt-LDH nach Lyse der adhärennten Zellen gesetzt. Mittelwert \pm SEM. n = 6 technical replicates pro Bedingung.

Ein SA- β -Galaktosidase-Assay nach 96 Stunden Behandlung mit Doxorubicin (Abb. 19B) zeigte wie in den Versuchen in Abbildung 17 einen starken Anstieg seneszenten Zellen in der Bax^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zu den WT-Zellen. Die DKO-Zellen gehen zwar stärker in Seneszenz als die WT-Zellen, aber weniger als die Bax^{-/-}-Zellen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Experimente mit den HCT116-DKO-Zellen keinen zusätzlichen Effekt des weiteren Knockouts von Bak auf den Anteil seneszenten Zellen oder auf die Induktion eines Wachstumsarrests. Selbst bei Betrachtung der Induktion von Zelltod durch Doxorubicin kommt es durch das Doppel-Knockout nicht zu einem größeren Anteil überlebender Zellen.

Ergebnisse

A



B

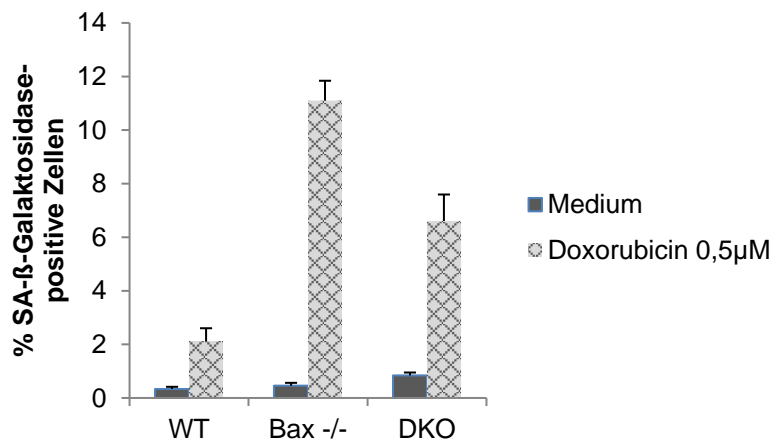


Abbildung 19: Effekte von Doxorubicin auf Seneszenzinduktion in DKO-Zellen im Vergleich zu WT und Bax^{-/-}

A Repräsentativer Growth Arrest Assay nach 48-stündiger Behandlung mit 0,5 µM Doxorubicin bzw. Zellkulturmedium mit DMSO. Wegnahme der Behandlung, Waschung und Neuaussaat mit Zellkulturmedium für Passage (p) 1 und 2. Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. * Werte für p(1) und p(2) sind extrapoliert. Experiment wurde unter ähnlichen Bedingungen und mit ähnlichen Ergebnissen zwei weitere Male wiederholt.

B SA-β-Galactosidase-Assay nach 96-stündiger Behandlung mit 0,5 µM Doxorubicin bzw. Mediumkontrolle + DMSO. Bestimmung der Gesamt-Zellzahl mittels DAPI-Färbung. Mittelwert ± SEM. n = 6 technical replicates pro Bedingung.

4. Diskussion

Seneszenz und Apoptose sind zwei alternative Wege, mit denen veränderte Zellen an der Proliferation gehindert werden können, zum Beispiel nach DNA-Schädigung. Somit dienen sie beide u.a. der Verhinderung von Krebsentstehung und der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts in diversen Geweben. Dass Seneszenz und Apoptose parallel existieren, wirft die Frage auf, inwieweit sie miteinander konkurrieren und wie determiniert wird, welchen der beiden Wege die Zelle einschlägt, insbesondere da sie größtenteils durch die gleichen Stressoren induziert werden können (Ou et al., 2021). Wie in der Einleitung dargelegt, sind einige Einflussfaktoren auf diese „Entscheidung“ bereits beschrieben worden, beispielsweise die Art der Zelle, die Dosis des Stressors und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege (Song et al., 2005; Childs et al., 2014; Li et al., 2012). Da Seneszenz und Apoptose ähnliche Funktionen im Körper erfüllen und durch ähnliche Reize ausgelöst werden können, liegt zudem die Vermutung nahe, dass bei Behinderung des einen Weges der andere vermehrt in Anspruch genommen wird. Passend zu dieser Hypothese zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Einschränkung der Apoptosefähigkeit aufgrund einer Bax-Mutation dazu führt, dass Darmkrebszellen als Antwort auf DNA-Schädigung, in diesem Fall durch Doxorubicin, weniger in Apoptose und stattdessen vermehrt in Seneszenz gehen.

Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits einige andere Studien, bei denen beispielsweise durch Einsatz eines Caspasen-Inhibitors oder Überexpression von BCL-2 die Apoptose erschwert wurde und die entsprechenden Zellen als Reaktion auf Stress vermehrt in Seneszenz gingen (Rebbaa et al., 2003; Nelyudova et al., 2007). Umgekehrt führt eine Behinderung der Seneszenz durch ein Knock-out von p21 in HCT-116-Zellen zu weniger langfristigem Wachstumsarrest als Reaktion auf Behandlung mit Adriamycin bzw. Doxorubicin, stattdessen konnte eine vermehrte Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Waldman et al., 1996; Chang et al., 1999). Zur Hypothese, dass Seneszenz und

Apoptose konkurrieren, passt auch, dass nach Festlegung auf einen der beiden Wege der jeweils alternative Weg in der Zelle gehemmt wird. So zeigen seneszente Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz, wenn sie beispielsweise UV-Strahlung oder Zytostatika ausgesetzt werden (Marcotte et al., 2004; Sasaki et al., 2001), möglicherweise aufgrund hoher p21-Expression, die trotz anhaltender DDR zu einem Überleben der Zelle führt, während ein p21-Knockdown die Zellen wieder apoptotisch werden lässt (Yosef et al., 2017). Zudem weisen seneszente Zellen erhöhte Level anti-apoptotischer Proteine aus der BCL-2-Familie auf, deren Inhibition die Zellen ebenfalls wieder vermehrt in Apoptose gehen lässt (Yosef et al., 2016). In apoptotischen Zellen wird umgekehrt das Seneszenz-Programm gehemmt, vermittelt beispielsweise über die DNTM3a (Zhang et al., 2011).

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Zellkultur

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit humanen Darmkrebszellen der Linie HCT-116 in Kultur durchgeführt. Die Zellen sind gut charakterisiert und relevante Mutationen, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, bereits bekannt, beispielsweise eine gestörte DNA-Reparatur aufgrund eines MLH-1-Defekts (Bronner et al., 1994) oder die Mutation bzw. Promotorhypermethylierung von p16 (Myöhänen et al., 1998). Da nur eine Zelllinie genutzt wurde, ist die Allgemeingültigkeit der Ergebnisse allerdings limitiert. So wurden für HCT-116-Zellen bereits in verschiedenen Arbeiten relevante Unterschiede im Apoptose- und Seneszenzverhalten zu anderen humanen Zelllinien beschrieben, beispielsweise in Bezug auf einen stärkeren Effekt einer alleinigen Bax-Defizienz als in anderen Zellen (Wang und Youle, 2012) oder auch auf erschwerte Seneszenzinduktion durch Zytokine (Tyciakova et al., 2021).

Die Beschränkung auf die Methode Zellkultur mit einer Zelllinie macht die Ergebnisse zudem anfälliger für innersystemische Fehler. Zwar sind die Versuche leichter wiederholbar und die Reproduzierbarkeit kann gut überprüft werden; allerdings könnte beispielsweise eine unentdeckte Neumutation der

Zellen, eine Kontamination oder eine versehentliche Fehleinstellung der Rahmenbedingungen auch zu reproduzierbar veränderten Ergebnissen führen. Außerdem limitiert das in-vitro-Setting die biologische Aussagekraft der Ergebnisse: Im Organismus liegen Tumorzellen nicht isoliert vor, sondern interagieren mit ihrer Umgebung und werden durch diverse Zytokine, Wachstumsfaktoren etc. beeinflusst. So werden bei der Apoptose in vivo die Apoptosekörperchen von Makrophagen phagozytiert und das Zellinnere gelangt normalerweise nicht nach außen. Ein Fehlen dieser Clearance, wie es in der Zellkultur der Fall ist, führt allerdings nach einiger Zeit zur sekundären Nekrose mit Platzen der Zelle, was eine Inflammation der Umgebung zur Folge haben kann und somit ggf. auch die anderen Zellen in den Versuchen beeinflusst (Silva, 2010). Auch seneszente Zellen haben in vitro teils andere Eigenschaften, beispielsweise zeigen sie die bereits oben beschriebene, flache Zellmorphologie zwar in Kultur, in vivo ist diese jedoch kaum anzutreffen (González-Gualda et al., 2021).

Insbesondere bei der Untersuchung von Zellproliferation, Zelltod und Seneszenz spielt zudem die Dichte der Zellen auf dem Nährboden eine erhebliche Rolle, da subkonfluente Zellen aufgrund von Nährstoff- und Platzmangel nicht mehr so stark proliferieren können wie spärlich ausgesäte Zellen und es zu vermehrtem Auftreten von Zelltod kommen kann, auch ohne Einsatz von zytotoxischen Agenzien (Song et al., 2009). Allerdings ergibt sich bei einem Vergleich von mit Zytokinen bzw. Doxorubicin behandelten Zellen mit einer unbehandelten Mediumkontrolle in Kultur zwangsläufig nach einiger Zeit ein Unterschied in der Zellzahl und -dichte, da die Behandlung ja die Proliferation behindert. Diesem Problem wurde in der vorliegenden Arbeit beispielsweise in den in-vitro Growth-Arrest-Assays derart begegnet, dass in jeder neuen Passage nur eine definierte Zahl an Zellen der Mediumkontrolle neu ausgesät und die Gesamtzellzahl mittels Extrapolation berechnet wurde (s. 2.2.3).

In den meisten anderen Fällen war allerdings aufgrund des Versuchssettings keine Reduktion der Zelldichte in der Mediumkontrolle während des Versuchs möglich. Insbesondere für die Untersuchung von Seneszenz im SA- β -Gal-Assay

sind mehrtägige Behandlungsdauern vonnöten, sodass hier ein besonders eklatanter Unterschied in der Zelldichte nicht zu vermeiden ist. Die höhere Zelldichte könnte in der Mediumkontrolle zu vermehrtem Auftreten von Seneszenz oder Apoptose aufgrund der Konfluenz führen, was eine Unterschätzung des Behandlungseffekts zur Folge haben würde.

Unterschiede in der Zelldichte hatten auch einen starken Einfluss auf die Ergebnisse des LDH-Zytotoxizitätsassays. So zeigte sich nach 72 h ein Anteil toter Zellen von ca. 5% in der Mediumkontrolle, wenn 10.000 Zellen pro Well ausgesät wurden (s. Abb. 11), während der Anteil ca. 10% bei einer Aussaat von 40.000 Zellen pro Well betrug (s. Abb. 7), was für eine zusätzliche Zelltodinduktion durch die Konfluenz spricht. Dies dürfte den Unterschied zwischen Mediumkontrolle und behandelten Proben allerdings eher verkleinert haben, sodass hier nicht von einer Überschätzung der Behandlungseffekte auszugehen ist.

4.1.2 Charakterisierung von Zellviabilität und Zelltod

Zur Untersuchung der Zellviabilität nach Behandlung wurde in dieser Arbeit der XTT-Test verwendet. Dieser Test macht indirekt Angaben über die Zellzahl, indem er die Verstoffwechslung des Tetrazoliumsalzes XTT misst, die normalerweise vor allem in den Mitochondrien stattfindet (Roehm et al., 1991). Vorteil der Viabilitätsmessung über die Mitochondrienaktivität ist, dass frühapoptotische Zellen, in denen die Integrität der Mitochondrien bereits zerstört wurde, die gemessene Zellviabilität nicht erhöhen, was bei anderen Methoden zur Viabilitätsbestimmung, beispielsweise mit Trypanblau, nicht der Fall wäre. Allerdings ist diese Methode auch sehr störungsanfällig, da XTT z.B. bei Vorliegen von reaktiven Sauerstoffspezies vermehrt verstoffwechselt wird (Wang et al., 2011) und ein niedriger extrazellulärer pH-Wert, z.B. bei Verbrauch des Zellkulturmediums, die Extinktion des Formazans verringern kann (Johno et al., 2010). Zudem werden lebendige, aber stoffwechsellinaktive Zellen, beispielsweise im Stadium der Quieszenz, von dem Assay kaum erfasst. Die Ergebnisse des XTT-Tests dienen also allenfalls als erste Orientierung, zumal

durch den Test keine Aussage darüber getroffen werden kann, welcher Anteil der Viabilitätsunterschiede auf unterschiedliche Proliferationsraten und welcher auf die Induktion von Zelltod zurückzuführen ist.

Der durch die Behandlungen mit Zytokinen oder Doxorubicin ausgelöste Zelltod wurde in dieser Arbeit mit diversen Methoden charakterisiert. Der LDH-Test diente in diesem Zusammenhang zunächst einem Überblick über die Zelltodinduktion im Allgemeinen, da er keine Aussage über die jeweiligen Anteile von Apoptose und Nekrose treffen kann. Die Menge an LDH im Überstand korreliert mit der Zahl toter Zellen in der Probe, allerdings ist diese Methode wie der XTT-Test sehr störungsanfällig, da beispielsweise unterschiedliche pH-Werte und Zelldichten (s.o.) die Ergebnisse verfälschen können, ebenso wie im fetalen Kälberserum enthaltene LDH-Mengen (Thomas et al., 2015). Zudem besteht die Gefahr, durch bloßen Vergleich der absoluten extrazellulären LDH-Aktivität den Behandlungseffekt zu unterschätzen, da nach mehrtägiger Behandlung mit Zytokinen oder Doxorubicin die Gesamtzellzahl in den behandelten Proben aufgrund der Proliferationshemmung deutlich niedriger ist, sodass die absolute Anzahl toter Zellen trotz Behandlung gleich oder niedriger als in der Mediumkontrolle sein kann. Daher wurden in dieser Arbeit im Anschluss an die LDH-Messung im Überstand die restlichen Zellen der jeweiligen Probe lysiert und eine erneute LDH-Messung durchgeführt, sodass der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt werden konnte.

Zur weiteren Charakterisierung der Art des Zelltods wurden durchflusszytometrisch zum einen Annexin-V, zum anderen TMRE in den behandelten Zellen bestimmt. Da Annexin-V an Phosphatidylserin bindet, das bei der Apoptose von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran gekehrt wird (Verhoven et al., 1995; van Engeland et al., 1998), ist diese Methode theoretisch spezifischer für Apoptose als der LDH-Test und kann Apoptose bereits in früheren Stadien detektieren. Allerdings wird bei Zerstörung der Integrität der Zellmembran, wie z.B. bei Nekrose, auch Phosphatidylserin freigelegt und Annexin-V kann binden, sodass nekrotische Zellen ebenfalls mitgezählt werden können (Crowley et al., 2016). Zusätzlich zur Annexin-V-Bindung wurde TMRE

bestimmt, das sich in Zellen mit funktionalen Mitochondrien ansammelt, während es in Zellen, bei denen das Membranpotential der Mitochondrien bereits kollabiert ist, wie z.B. frühapoptotischen Zellen, nicht mehr akkumuliert (Perry et al., 2011). Allerdings ist auch hier keine komplette Spezifität für Apoptose gegeben, da in nekrotischen Zellen ebenfalls die Mitochondrienfunktion versagt (Watanabe et al., 2002). Als weitere, Apoptose-spezifischere Methode wurde daher ein Caspase-3-Aktivitätsassay angeschlossen. Da die Caspase-3 nur in apoptotischen Zellen in der aktiven Form vorliegt, findet hier durch nekrotische oder in anderen Formen des Zelltods befindliche Zellen kaum eine Verfälschung der Messergebnisse statt. Eine mögliche Fehlerquelle bei diesem Assay sowie bei den beiden durchflusszytometrischen Untersuchungen ist jedoch die Zellgewinnung von den Platten mittels Trypsinierung, da beim Ernten der Zellen, bei der Zentrifugation und diversen Waschprozessen apoptotische Zellen in größerem Ausmaß als andere Zellen verloren gehen können (Wlodkowich et al., 2009), was zu einer Unterschätzung des Behandlungseffekts führen könnte.

4.1.3 Bestimmung von Seneszenz

Der sichere Nachweis von Seneszenz ist schwierig, da es keinen universellen Seneszenz-spezifischen Marker gibt, der in nicht-seneszenten Zellen nicht vorkommt. Zudem herrscht unter seneszenten Zellen eine große Heterogenität vor, sodass einzelne typische Merkmale nicht bei allen seneszenten Zellen ausgeprägt sind. Die aktuelle Empfehlung in der Seneszenzforschung ist daher, mehrere Seneszenzcharakteristika parallel nachzuweisen, um die diagnostische Sicherheit zu erhöhen (Gal et al., 2019; González-Gualda et al., 2021). In dieser Arbeit wurden die Seneszenz-typische Morphologie, der Wachstumsarrest und die erhöhte Expression von SA- β -Gal als verschiedene Seneszenzmarker verwendet. Zur Untersuchung des Seneszenz-assoziierten Wachstumsarrests wurden in-vitro Growth-Arrest-Assays durchgeführt, deren wesentlicher Bestandteil die wiederholte Bestimmung der Zellzahl ist (Braumüller et al., 2013). Die Zellen wurden mithilfe von Neubauer-Zählkammern quantifiziert (s. 2.2.3), was über das Auszählen von Zellen in vier Quadraten und die anschließende

Bestimmung des Mittelwerts eine relativ verlässliche Aussage über die Gesamtzellzahl erlaubt. Insbesondere bei sehr niedrigen Zellzahlen, wie sie beispielsweise nach Behandlung mit Doxorubicin auftreten, ist diese Methode allerdings nicht mehr besonders reliabel, da Fehler aufgrund unterschiedlicher Zelldistribution stärker ins Gewicht fallen. Zudem gab es zwar klar definierte Kriterien, welche Zellen gezählt und welche aufgrund einer Trypanblau-Anfärbung als tot erachtet werden; nichtsdestotrotz kann hier eine gewisse Subjektivität bzw. Untersucherabhängigkeit nicht ausgeschlossen werden, insbesondere da keine Verblindung stattgefunden hat. Ähnliches gilt für den SA- β -Gal-Assay, da auch hier der Anteil seneszenten bzw. blau gefärbter Zellen mittels Auszählung der Zellen durchgeführt wurde (s. 2.2.6). Zum einen kann hier schon die Bestimmung der Gesamtzellzahl über DAPI-gefärbte Zellkerne problematisch sein, da seneszente Zellen häufig multiple Zellkerne aufweisen (Herranz und Gil, 2018). Zum anderen lässt sich beim Auszählen der blaugefärbten seneszenten Zellen ebenfalls ein Maß an Subjektivität nicht vermeiden, da es immer wieder grenzwertig blau gefärbte Zellen gab. Diesem Problem sollte begegnet werden, indem eine hohe Anzahl von Zellen ausgezählt wurde, um die Auswirkungen einzelner Fehlentscheidungen zu minimieren.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Seneszenzfähigkeit der HCT-116-Zellen

Während aufgrund vielversprechender Ergebnisse von Immuntherapien in der Behandlung von Tumoren großes Potential für eine therapeutische Nutzung der Zytokin-induzierten Seneszenz gesehen wird (Wieder et al., 2017; Brenner et al., 2020), konnte in dieser Arbeit durch Behandlung der HCT-116-Zellen mit IFN- γ und TNF- α kein stabiler Wachstumsarrest und somit auch keine Zytokin-induzierte Seneszenz hervorgerufen werden (s. Abb. 8). Eine Seneszenzinduktion mithilfe des DNA-schädigenden Zytostatikums Doxorubicin war allerdings möglich (s. Abb. 15-17), was als Positivkontrolle beweist, dass die verwendeten HCT-116-Zellen grundsätzlich zur Seneszenz fähig sind und dass

die angewandten Methoden diese auch detektieren können. In zahlreichen anderen Arbeiten wurde ebenfalls gezeigt, dass HCT-116-Zellen seneszent werden können – ausgelöst beispielsweise durch Zytostatika wie den Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin (Han et al., 2002; Zhang et al., 2014), das alkylierend wirkende Cisplatin (Berndtsson et al., 2007) oder andere in der Tumorthherapie verwendete Medikamente wie Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Xu et al., 2005) oder Curcumin, das im häufig komplementärmedizinisch verwendeten Kurkuma enthalten ist (Mosieniak et al., 2012).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde auch bereits mehrfach für das hier verwendete Doxorubicin eine Seneszenz-Induktion in HCT-116-Zellen mit Wachstumsarrest, Ausbildung der klassischen vergrößerten, flachen und polyploiden Zellmorphologie und vermehrter Expression von SA- β -Gal beschrieben (Chang et al., 1999; Sliwinska et al., 2009). Dafür sind bereits Dosierungen von 0,1 μ M Doxorubicin ausreichend (Sliwinska et al., 2009), während bei einer höheren Dosierung von 1 μ M Doxorubicin die meisten HCT-116-Zellen apoptotisch werden (Yokochi und Robertson, 2004). Allerdings können HCT-116-Zellen, die mit dem Zytostatikum Etoposid in Seneszenz gebracht wurden, nach ca. 7 Tagen spontan den Wachstumsarrest verlassen und in ein proliferatives Stadium zurückkehren (Saleh et al., 2019). Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei Doxorubicin-induzierter Seneszenz in HCT-116 beschrieben (Mosieniak et al., 2015), sodass weiterhin strittig ist, ob es sich bei der Therapie-induzierten Seneszenz z.B. in HCT-116-Zellen eher um einen „Seneszenz-ähnlichen Zustand“ als eine echte Seneszenz handelt (Saleh et al., 2019).

Dass eine Behandlung mit den TH1-Zytokinen IFN- γ und TNF- α generell ebenfalls zur Seneszenz führen kann, wurde für diverse unterschiedliche Zelllinien gezeigt, sowohl im Mausmodell als auch in humanen Zellen (Sasaki et al., 2008; Braumüller et al., 2013; Wang et al., 2014). In murinen Inselzelltumoren war dabei die in dieser Arbeit verwendete Dosierung von 100 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml TNF- α effektiv zur Seneszenzinduktion, auch geringere Dosen waren teilweise schon ausreichend (Braumüller et al., 2013).

Dass es in den HCT-116-Zellen durch IFN- γ und TNF- α , wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht zur Einleitung einer Seneszenz kommt, kann zum einen in der Art bzw. Herkunft der Zellen begründet liegen. In HCT-116-Zellen, deren Expression von TNF- α -mRNA über retrovirale Transduktion künstlich erhöht wurde, konnte durch die TNF- α -Überexpression keine Seneszenz hervorgerufen werden, während bei Melanomzellen mit der gleichen Transduktion ein erheblicher Anteil der Zellen seneszent wurde (Tyciakova et al., 2021). Zudem ist bisher als wichtigster Signalweg zur Einleitung der CIS der p16^{INK4A}-RB-Weg beschrieben (Braumüller et al., 2013), dieser Weg ist in HCT-116-Zellen jedoch durch Hypermethylierung des p16^{INK4A}-Promotors deutlich eingeschränkt (Myöhänen et al., 1998). Allerdings wurde auch eine durch p21 mediierte Proliferationshemmung durch IFN- γ beschrieben (Hobeika et al., 1999), und dieser Signalweg ist in den HCT-116-Zellen intakt. Sowohl in murinen B-Zell-Lymphomen als auch in humanen Melanomzellen wurde zudem als Reaktion auf Immuntherapie eine IFN- γ -abhängige Aktivierung des p53-p21-Signalwegs in seneszenten Zellen beobachtet, während ein p21-Knock-out die Seneszenz verhinderte (Brenner et al., 2020). Allerdings ist – im Gegensatz zur Therapie-induzierten Seneszenz durch Doxorubicin – bisher nicht vollständig geklärt, ob bzw. inwieweit auch bei Zytokin-Behandlung der p53-p21-Signalweg allein, auch unabhängig vom p16^{INK4A}-RB-Weg, zur Seneszenz führen kann.

Als weitere mögliche Erklärung für die fehlende Seneszenzinduktion in den HCT-116-Zellen durch die Zytokine wurde ein Defekt im IFN- γ -Signalweg in dieser Arbeit über den Nachweis einer Steigerung der CXCL-10-Expression weitestgehend ausgeschlossen (s. Abb. 9), jedoch sind andere, bisher nicht beschriebene Defekte des TNF- α -Signalwegs ebenfalls möglich. Dazu würde auch passen, dass es in dieser Arbeit selbst während der Behandlung mit IFN- γ und TNF- α zu einer weiteren, allenfalls leicht gebremsten, Proliferation der Zellen kam (s. Abb. 8), während in der Literatur für die beiden Zytokine in Kombination eine deutliche Proliferationshemmung, zumeist mit Apoptoseinduktion, beschrieben ist (Wu et al., 1994; Konur et al., 2005). Allerdings existieren in Bezug auf Zelltodinduktion durch IFN- γ und TNF- α

Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien, beispielsweise war in einer Studie mit zwei verschiedenen Retinoblastom-Zelllinien für die eine Zelllinie eine Behandlung mit IFN- γ allein zur Apoptoseinduktion ausreichend, während für die andere Zelllinie die Kombination mit TNF- α nötig war (Cullinan und Brandt, 2004). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass TNF- α generell durchaus einen Effekt auf HCT-116-Zellen hat, da nach TNF- α -Behandlung eine Änderung der Morphologie, des Zytoskeletts und der Zellsteifigkeit im Sinne einer Epithel-Mesenchym-Transformation beschrieben wurde (Liu et al., 2017). Weiterhin kann TNF- α die Produktion der Chemokine CXCL-1 und -2 in HCT-116 auslösen (Zhou et al., 2018), sodass generell davon auszugehen ist, dass in den Zellen auch die für TNF- α benötigten Signalwege ausgeprägt sind. Warum sich die Wirkung von IFN- γ und TNF- α auf HCT-116-Zellen so sehr von deren Wirkung auf andere Tumorzellen unterscheidet, bleibt weiterhin offen.

4.2.2 Einfluss einer Bax-Defizienz auf Apoptose- und Seneszenzinduktion

Bax ist neben Bak eines der wichtigsten pro-apoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie und führt über eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zum Austritt von Cytochrom C und zur konsekutiven Apoptoseeinleitung (s. 1.3.2). Bax-defiziente HCT-116-Zellen gingen in den oben gezeigten Versuchen unter Behandlung mit Doxorubicin signifikant weniger in Zelltod bzw. Apoptose als WT-Zellen (s. Abb. 11-14). Das passt dazu, dass Bax wesentlicher Bestandteil des intrinsischen Apoptosewegs ist, der durch DNA-Schädigung, z.B. durch Doxorubicin, und anschließende p53-Aktivierung initiiert wird (Yamaguchi et al., 2004), sodass bei Bax-Defizienz eine Störung der Apoptoseinduktion zu erwarten ist. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass das Fehlen von Bax die Apoptose erschwert: Beispielsweise können murine Fibroblasten mit Bax-Knockout als Reaktion auf eine Infektion mit Influenza-A nicht wie die Wildtyp-Zellen apoptotisch werden, sondern sterben stattdessen auf anderen Wegen, die Merkmale von Autophagie zeigen (McLean et al., 2009). Auch für Bax-defiziente HCT-116-Zellen konnte im Vergleich zu entsprechenden WT-Zellen eine deutlich eingeschränkte Apoptosefähigkeit

gezeigt werden, z.B. unter Behandlung mit 5-Fluoruracil oder nichtsteroidalen Antirheumatika (Zhang et al., 2000), mit dem Flavonoid Pinocembrin (Kumar et al., 2007), dem Spindelgift Nocodazol (Castedo et al., 2006), mit Adriamycin (Ming et al., 2006) oder Camptothecin (Wang und Youle, 2012).

In dieser Arbeit konnte das Fehlen von Bax eine Apoptoseinduktion allerdings nicht komplett verhindern. Während die zwar niedrige, aber dennoch signifikante Erhöhung der extrazellulären LDH (s. Abb. 11) und der Annexin-V-Bindung (s. Abb. 13) auch noch durch alternative Formen von Zelltod erklärt werden könnten, ist die Erhöhung der Caspase-3-Aktivität unter Doxorubicin-Behandlung (s. Abb. 14) ein relativ sicheres Zeichen für eine zumindest leichte Apoptoseinduktion. In den meisten der o.g. Studien, z.B. mit 5-Fluoruracil oder Camptothecin, gab es ebenfalls eine residuale Apoptoseinduktion in Bax^{-/-}-Zellen. Als mögliche Erklärungen hierfür wurden in der Literatur zum einen die teils redundanten Rollen von Bax und Bak beschrieben, sodass Bak möglicherweise zum Teil die pro-apoptotischen Aufgaben von Bax übernommen hat (Wei et al., 2001), zudem ist in einigen Fällen eine direkte Transkriptions-unabhängige Apoptoseinduktion durch p53 über die Caspase-8 möglich, für die Bax primär nicht essenziell ist (Ding et al., 2000).

Die Abbildungen 15 bis 17 zeigen weiterhin, dass Bax^{-/-}-Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin eine Seneszenz-typische Morphologie sowie einen stabilen Wachstumsarrest aufweisen und vermehrt SA-β-Gal exprimieren, was allesamt charakteristische Merkmale der Seneszenz sind, während dies bei den WT-Zellen weniger oder teils gar nicht ausgeprägt ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die Apoptosehemmung durch Fehlen von Bax bei DNA-Schädigung eine vermehrte Seneszenzinduktion bewirkt. Während der Einfluss einer Bax-Defizienz auf die Therapie-induzierte Seneszenz bisher zur Kenntnis der Autorin noch nicht anderswo in ähnlicher Form untersucht wurde, kann eine anderweitige Inhibition der Apoptose, wie bereits oben beschrieben, ebenfalls zu vermehrter Seneszenz führen. So bewirkt die Inhibition von Caspasen in HCT-116-Zellen einen Switch von Apoptose zu Seneszenz nach Doxorubicin-Behandlung (Rebbaa et al., 2003). Eine Überexpression des anti-apoptotischen BCL-2 führt

in Endometrium- und Lungenkrebszellen zu vermehrter Seneszenz als Reaktion auf Doxorubicin (Crescenzi et al., 2003) und in Fibroblasten auf Adriamycin (Nelyudova et al., 2007). Die Inhibition des pro-apoptotischen Proteins Bim kann ebenfalls eine vermehrte Seneszenz bewirken (Drullion et al., 2012). Umgekehrt führte in HCT-116-Zellen die Behandlung mit einem Irinotecan-Metaboliten zu einer BCL-X_L- und p53/p21-abhängigen Seneszenz, während eine Inhibition des anti-apoptotischen BCL-X_L einen Shift von Seneszenz zu Apoptose zur Folge hatte (Hayward et al., 2003). Es gibt also mittlerweile zahlreiche Hinweise darauf, dass eine Beeinflussung des Gleichgewichts pro- und anti-apoptotischer Proteine in der Zelle Einfluss auf die Entscheidung zwischen Seneszenz und Apoptose nach DNA-Schädigung nehmen kann. Allerdings bleibt weiterhin offen, wie genau bzw. über welche Signalwege eine erschwerte Apoptose mechanistisch zur Seneszenz führt, inwieweit dieses Prinzip auf alle humanen Zellen und Tumorentitäten übertragbar ist und ob sich die aufgrund von Apoptoseresistenz seneszent gewordenen Zellen in ihren Eigenschaften von anderen seneszenten Zellen unterscheiden.

4.2.3 Zusätzliche Effekte eines Bax-und Bak-Doppel-Knockouts

Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit bei der Verwendung von HCT-116-Zellen mit einem Doppel-Knockout für Bax und Bak kein zusätzlicher Effekt auf die Inhibition von Apoptose und die Induktion von Seneszenz; die Zellen nahmen in dieser Hinsicht sogar eher eine mittlere Position zwischen WT- und Bax^{-/-}-Zellen ein (s. Abb. 18 und 19). In der Literatur sind größtenteils konträre Ergebnisse beschrieben: So führte ein Doppel-Knockout von Bax und Bak in murinen embryonalen Fibroblasten zu einer nahezu kompletten Apoptoseresistenz bei Behandlung mit Staurosporin, Etoposid oder UVC-Strahlung, während Einzel-Knockouts von Bax und Bak deutlich schwächere Effekte hatten (Wei et al., 2001). Auch für Ovarialzellen von Hamstern ist eine durch Staurosporin auslösbare Apoptose mit nachweisbarer Caspasen-Aktivierung beschrieben, die durch ein Doppel-Knockout von Bax und Bak komplett verhindert wird (Cost et al., 2010). Mäuse mit einem alleinigen Bax-

Knockout sind zudem nahezu normal lebensfähig mit kleineren Defekten beispielsweise der Spermatogenese (Knudson et al., 1995), $Bak^{-/-}$ -Mäuse zeigen praktisch gar keine Auffälligkeiten, aber nur 10% von $Bax^{-/-}Bak^{-/-}$ -Mäusen überleben die ersten Stunden nach der Geburt und zeigen dann klare Hinweise auf Störungen der Apoptose, beispielsweise persistierende Interdigitalhäute und einen verschlossenen Vaginalkanal (Lindsten et al., 2000). In humanen Glioblastomen mit Bax-Defizienz wurde eine erhöhte in-vitro-Resistenz für einige Zytostatika wie Doxorubicin beschrieben; ein zusätzliches Knockout von Bak führte hier ebenfalls zu noch stärkerer Apoptoseresistenz gegen weitere Agenzien (Cartron et al., 2003).

In HCT-116-Zellen wurde ebenfalls ein starker anti-apoptotischer Effekt eines Bax-Bak-Doppel-Knockouts beschrieben: Unter Behandlung mit 1 μ M Staurosporin sterben nahezu alle HCT-116-WT-Zellen nach 12 Stunden, während bei den DKO-Zellen auch nach 24 Stunden keine Zunahme an toten Zellen detektierbar war (Pedro et al., 2015). Die Effektstärke des Bax-Bak-Doppel-Knockouts im Vergleich zur alleinigen Bax-Defizienz scheint unter anderem vom Apoptosestimulus abzuhängen: So wurde z.B. bei Behandlung mit nichtsteroidalen Antirheumatika wie Indometacin eine nahezu komplette Apoptoseresistenz sowohl bei $Bax^{-/-}$ - als auch bei DKO-Zellen ohne signifikante Unterschiede beobachtet (Wang und Youle, 2012). Die gleiche Studie zeigte aber auch, dass bei Behandlung mit Camptothecin oder 5-Fluoruracil die DKO-Zellen Apoptose-resistenter waren als die $Bax^{-/-}$ -Zellen.

4.3 Ausblick: Nutzung des Einflusses der BCL-2-Familie auf Seneszenz und Apoptose in der Tumorthherapie

Seneszenz spielt in der Krebsforschung eine wachsende Rolle – zum einen als unerwünschter Mechanismus, der den Erfolg diverser Therapien kompromittiert, indem er die Apoptose von Tumorzellen verhindert und über den SASP pro-inflammatorische und tumorfördernde Effekte auf die Umgebung ausübt (Demaria et al., 2017), zum anderen als Schutzmechanismus vor Krebsentstehung sowie als neuartiger Ansatz zur Tumorkontrolle in

fortgeschrittenen Stadien (Wieder et al., 2017). Insbesondere bei chronisch persistierenden seneszenten Zellen scheinen jedoch die negativen Effekte zu überwiegen. Sie werden mit diverse degenerativen bzw. altersbedingten Erkrankungen wie Sarkopenie, Osteoporose oder Arthrose (Baker et al., 2011; Farr et al., 2017) sowie mit dem Versagen diverser Tumorthérapien (Ou et al., 2021) in Verbindung gebracht, sodass die Elimination dieser Zellen bzw. ihrer Effekte aktuell in den Fokus der Forschung rückt.

Ein potenzieller therapeutischer Ansatz ist in diesem Zusammenhang die Inhibition pro-inflammatorischer Bestandteile des SASP. So konnte für bestimmte bereits zugelassene Medikamentengruppen wie JAK-1/2-Inhibitoren gezeigt werden, dass diese u.a. zu einer reduzierten Sekretion von IL-6 und somit zu einer reduzierten systemischen Inflammation in älteren Mäusen führen (Xu et al., 2015). Eine ähnliche Wirkung über Reduktion der IL-6-Sekretion seneszenten Zellen wurde auch für Simvastatin in Brustkrebszellen beschrieben (Liu et al., 2015).

Zur Eliminierung seneszenten Zellen wird aktuell auch an der Wirkstoffgruppe der sogenannten Senolytika gearbeitet. Diese Therapeutika sollen senescente Zellen trotz ihrer hohen inhärenten Apoptoseresistenz in den Zelltod treiben. Die Stoffe Dasatinib und Quercetin bewirken beispielsweise über die Inhibition Seneszenzfördernder Signalwege und Tyrosinkinase eine vermehrte Apoptose der entsprechenden Zellen, was einen positiven Effekt u.a. auf Atherosklerose, Lungenfibrose oder Alzheimer-Demenz haben kann (Roos et al., 2016; Schafer et al., 2017; Zhang et al., 2019); zudem überlebten gealterte Mäuse, die mit den beiden Medikamenten behandelt wurden, länger (Xu et al., 2018).

Auch Proteine der BCL-2-Familie haben sich in diesem Zusammenhang als relevant hervorgetan, da sie eine wichtige Stellschraube in der Entscheidung zwischen Apoptose und Seneszenz darstellen. Navitoclax inhibiert die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-X_L und BCL-W, was in einigen Arten seneszenten Zellen zur Apoptose führt, aber keine vermehrte Apoptose in nicht-seneszenten Zellen zur Folge hat (Zhu et al., 2016). In zahlreichen Tumoren konnte eine bemerkenswerte Reduktion seneszenten Zellen durch Navitoclax

beobachtet werden, beispielsweise in Bronchialkarzinomzellen, die zuvor bestrahlt oder mit Etoposid behandelt wurden (Saleh et al., 2020) oder in Brustkrebszellen nach Chemotherapie mit Doxorubicin (Shahbandi et al., 2020). Dieser Effekt scheint insbesondere auf der BCL-X_L-Inhibition zu beruhen, zudem wird Bax für die Wirkung von Navitoclax benötigt (Saleh et al., 2020). Allerdings kann Navitoclax, womöglich durch die BCL-X_L-Inhibition, zu schweren Thrombopenien führen, was den klinischen Einsatz deutlich erschwert (Suvarna et al., 2019). Zudem hängt seine Wirksamkeit von der Expression verschiedener Proteine der BCL-2-Familie in den seneszenten Zellen ab, sodass es sogar innerhalb des gleichen Tumors zu deutlich unterschiedlichen Reaktionen auf Navitoclax kommen kann (Shahbandi et al., 2020). Außerdem fehlen Langzeitstudien, damit mögliche weitere Effekte durch die Elimination seneszenten Zellen mit ausreichender Sicherheit beurteilt werden können (Carpenter et al., 2021). Mittlerweile wurde auch der selektive BCL-2-Inhibitor Venetoclax entwickelt, der über Disinhibition von Bax seneszenten Zellen in den Zelltod treiben soll.

Trotz der o.g. Limitationen von Senolytika wird bereits in einigen Veröffentlichungen eine zweistufige adjuvante Tumorthherapie mit einer weniger toxischen, Seneszenz-induzierenden Chemotherapie als ersten Schritt und anschließender Gabe von Senolytika postuliert (Short et al., 2019). Ein detaillierteres Verständnis der Interaktion zwischen Apoptose und Seneszenz und der Regulation verschiedener Proteine der BCL-2-Familie als Reaktion auf diverse Tumortherapien könnte dabei helfen, gezieltere und weniger toxische Wirkstoffe zu entwickeln und womöglich einem klinischen Einsatz der Senolytika den Weg zu ebnet.

5. Zusammenfassung

Seneszenz und Apoptose sind zwei parallel im menschlichen Körper existierende Zellschicksale, mit denen dieser unter anderem auf Stress reagieren und sich vor in ihrem Wachstumsverhalten veränderten Zellen und damit vor der Entstehung eines Tumors schützen kann. Während die Apoptose als Form des programmierten Zelltods zur Elimination der veränderten Zelle führt, ist Seneszenz jedoch lediglich ein Wachstumsstillstand, in dem die Zelle weiterhin die Umgebung beeinflussen und potenziell negative Effekte ausüben kann. Apoptose und Seneszenz scheinen zwei konkurrierende Alternativen zu sein, da sie durch die gleichen Stressoren ausgelöst werden können und beide dem Ziel der Proliferationshemmung von geschädigten Zellen dienen. Wie in der Zelle eine „Entscheidung“ zwischen den beiden Wegen gefällt wird und wie diese möglicherweise auch medikamentös beeinflusst werden kann, ist in den vergangenen Jahren vermehrt Gegenstand der Forschung gewesen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Behinderung der Apoptose durch das Fehlen der pro-apoptischen Proteine Bax bzw. Bak zu einer alternativen Seneszenzinduktion als Reaktion auf apoptogene Stimuli führt. Dazu wurden humane Darmkrebszellen der Linie HCT-116 verwendet, die entweder kein Bax ($Bax^{-/-}$), kein Bax und kein Bak (DKO) oder beide Proteine normal exprimieren (WT). Die Zellen wurden zum einen mit den Zytokinen $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ behandelt, um eventuelle Unterschiede in der Zytokin-induzierten Seneszenz zu untersuchen; zum anderen mit dem in der Tumorthherapie bewährten, DNA-schädigenden Chemotherapeutikum Doxorubicin.

Durch $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ konnte in den HCT-116-Zellen kein für die Seneszenz charakteristischer Wachstumsstillstand hervorgerufen werden, möglicherweise aufgrund eines funktionellen Defizits des CDK-Inhibitors $p16^{INK4A}$ in HCT-116-Zellen, der für die Einleitung der Zytokin-induzierten Seneszenz eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Eine Behandlung mit Doxorubicin konnte in den HCT-116-Zellen allerdings eine Seneszenz induzieren, wahrscheinlich wie in der Literatur beschrieben über DNA-Schädigung und den p53-p21-Signalweg. Unter

Behandlung mit Doxorubicin zeigte sich in Bax^{-/-}-Zellen weniger Apoptose als in WT-Zellen, dafür gingen signifikant mehr Bax^{-/-}- als WT-Zellen in Seneszenz. Ein zusätzliches Fehlen von Bak in den DKO-Zellen zeigte weder auf die Apoptosehemmung noch auf die Seneszenzinduktion additive Effekte im Vergleich zu den einfach Bax-defizienten Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie bereits einzelne andere Studien, dass eine Manipulation der Apoptose-regulierenden Proteine der BCL-2-Familie neben der Apoptose auch die Seneszenz in Zellen beeinflussen kann. Zwar sind die Mechanismen der Interaktion dieser beiden Wege noch nicht bis ins Detail verstanden, jedoch werden sogar bereits die ersten Medikamente entwickelt, die durch Verschiebung des Gleichgewichts der pro- und anti-apoptischen Proteine der BCL-2-Familie seneszente Zellen eliminieren können und die ein breites Anwendungspotenzial von altersbedingten, degenerativen Erkrankungen bis hin zur Krebstherapie versprechen.

6. Literatur

Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*;133(6):1006-18.

Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, Salmena L, Sampieri K, Haveman WJ, Brogi E, Richardson AL, Zhang J, Pandolfi PP (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet*;42(5):454-8.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*;87(2):171.

American Type Culture Collection (2021). HCT116 Detailed Product Information. <https://www.atcc.org/products/ccl-247#product-references> [Zugriff am 26.11.2021]

Bachmann PS, Gorman R, Mackenzie KL, Lutze-Mann L, Lock RB (2005). Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. *Blood*;105(6):2519-26.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*;479(7372):232-6.

Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*;22(16):4212-22.

Berndtsson M, Hägg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC, Linder S (2007). Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer*;120(1):175-80.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*;279(5349):349-52.

Boross P, Leusen JH (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*;2(6):676-90.

Bos JL (1988). The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res*;195(3):255-71.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer research*, 41(5), 1751–1756.

Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Aßmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, Essmann F, Kneilling M, Griessinger C, Ranta F, Ullrich S, Mocikat R, Braungart K,

Mehra T, Fehrenbacher B, Berdel J, Niessner H, Meier F, van den Broek M, Häring HU, Handgretinger R, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Pesic M, Bauer J, Zender L, Schaller M, Schulze-Osthoff K, Röcken M (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*; 494(7437):361-5.

Brenner E, Schörg BF, Ahmetlić F, Wieder T, Hilke FJ, Simon N, Schroeder C, Demidov G, Riedel T, Fehrenbacher B, Schaller M, Forscher A, Eigentler T, Niessner H, Sinnberg T, Böhm KS, Hömberg N, Braumüller H, Dauch D, Zwirner S, Zender L, Sonanini D, Geishauser A, Bauer J, Eichner M, Jarick KJ, Beilhack A, Biskup S, Döcker D, Schadendorf D, Quintanilla-Martinez L, Pichler BJ, Kneilling M, Mocikat R, Röcken M (2020). Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours. *Nat Commun*;11(1):1335.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*;368(6468):258-61.

Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 112(2):195-203.

Calcinotto A, Alimonti A (2017). Aging tumour cells to cure cancer: "pro-senescence" therapy for cancer. *Swiss Med Wkly*;147:w14367.

Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*;99(2):1047-1078.

Campisi J (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*;120(4):513-22.

Campisi J (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*;75:685-705.

Carpenter VJ, Saleh T, Gewirtz DA (2021). Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers (Basel)*;13(4):723.

Carreau NA, Pavlick AC (2019). Nivolumab and ipilimumab: immunotherapy for treatment of malignant melanoma. *Future Oncol*;15(4):349-358.

Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*;32(3):634-43.

Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*;23(13):4701-12.

Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, Pequignot MO, Casares N, Valent A, Mouhamad S, Schmitt E, Modjtahedi N, Vainchenker W, Zitvogel L, Lazar V, Garrido C, Kroemer G (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J*;25(11):2584-95.

Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, Roninson IB (1999). Role of p53 and p21/waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*;18(34):4808-18.

Chen L, Zeng Y, Zhou SF (2018). Role of Apoptosis in Cancer Resistance to Chemotherapy, Current Understanding of Apoptosis. *Programmed Cell Death*, Yusuf Tutar, IntechOpen.

Chen Q, Ames BN (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;91(10):4130-4.

Chen QM, Liu J, Merrett JB (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J*. 347(Pt 2), 543-551.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*;436(7051):725-30.

Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*;15(11):1139-53.

Colombo V, Lupi M, Falcetta F, Forestieri D, D'Incalci M, Ubezio P (2011). Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*;67(2):369-79.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*;6(12):2853-68.

Cost GJ, Freyvert Y, Vafiadis A, Santiago Y, Miller JC, Rebar E, Collingwood TN, Snowden A, Gregory PD (2010). BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*;105(2):330-40.

Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J*;375(Pt 2):263-74.

Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor protocols* (11).

Cullinan AE, Brandt CR (2004). Cytokine induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Mol Vis*;10:315-22.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*;15(1):49-63.

D'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*;426(6963):194-8.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*;116(2):205-19.

Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J, Toussaint O (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*;118(Pt 4):743-58.

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

Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*;115(1):61-9.

Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoesjmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*;31(6):722-33.

Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, Koenig K, Le C, Mitin N, Deal AM, Alston S, Academia EC, Kilmarx S, Valdovinos A, Wang B, de Bruin A, Kennedy BK, Melov S, Zhou D, Sharpless NE, Muss H, Campisi J (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*;7(2):165-176.

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*;8(21):2540-51.

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*;444(7119):638-42.

Dimri GP, Campisi J (1994). Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*;59:67-73.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;92(20):9363-9367.

Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher DE (2000). Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem*;275(49):38905-11.

Dirac AM, Bernards R (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem*;278(14):11731-4.

Drullion C, Trégoat C, Lagarde V, Tan S, Gioia R, Priault M, Djavaheri-Mergny M, Brisson A, Auberger P, Mahon FX, Pasquet JM (2012). Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. *Cell Death Dis*;3(8):e373.

Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*;35(4):495-516.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Natur*;e391(6662):43-50.

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

Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, Negley BA, Sfeir JG, Ogrodnik MB, Hachfeld CM, LeBrasseur NK, Drake MT, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Tchonia T, Oursler MJ, Kirkland JL, Khosla S (2017). Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med*;23(9):1072-1079.

Fernández-Marrero Y, Spinner S, Kaufmann T, Jost PJ (2016). Survival control of malignant lymphocytes by anti-apoptotic MCL-1. *Leukemia*;30(11):2152-2159.

Fitzgerald, KA, O'Neill LA, Gearing AJ, Callard RE (2001). *The cytokine factsbook and webfacts*. Elsevier: 322-481

Fulda S. Exploiting mitochondrial apoptosis for the treatment of cancer (2010). *Mitochondrion*;10(6):598-603.

Gal H, Porat Z, Krizhanovsky V (2019). A Multiparametric Assay to Evaluate Senescent Cells. *Methods Mol Biol*;1896:107-117.

Gartel AL, Tyner AL (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*;1(8):639-49.

Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, Barretina J, Lin WM, Rameh L, Salmena L, Pandolfi PP, Cantley LC (2009). Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*;16(2):115-25.

Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*;16(6):2129-44.

González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*, 288: 56-80.

Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*;305(5684):626-9.

Guicciardi ME, Gores GJ (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J*;23(6):1625-37.

Häcker G (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*;301(1):5-17.

Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, Hendrickson EA, Balan KV, Pantazis P, Wyche JH (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem*;277(19):17154-60.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*;100(1):57-70.

Happo L, Cragg MS, Phipson B, Haga JM, Jansen ES, Herold MJ, Dewson G, Michalak EM, Vandenberg CJ, Smyth GK, Strasser A, Cory S, Scott CL (2010). Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also Bim. *Blood*;116(24):5256-67.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*;345(6274):458-60.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.*;2014:150845.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*;25:585-621.

Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI (2003). Antisense Bcl-xl down-regulation switches the response to topoisomerase I inhibition from senescence to apoptosis in colorectal cancer cells, enhancing global cytotoxicity. *Clin Cancer Res*;9(7):2856-65.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10):986-94.

Hengartner MO (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*;104(3):325-8.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*;14(4):501-13.

Herranz N, Gil J (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*;128(4):1238-1246.

Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, Fisher TC (1994). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*;345(1313):319-25.

Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, Johnson HM, Subramaniam PS (1999). IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*;19(12):1351-61.

Howell, D (2002). *Statistical Methods for Psychology*. Duxbury. pp. 324–325.

Hubackova S, Kucerova A, Michlits G, Kyjacova L, Reinis M, Korolov O, Bartek J, Hodny Z (2016). IFN γ induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGF β /SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. *Oncogene*;35(10):1236-49.

Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969). Pillars article: cell sorting: automated separation of Mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. 166: 747-749. *J Immunol*;193(5):2045-7.

Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjjatic S, Thompson JA, Yee C (2008). Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*;358(25):2698-703.

Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, Lindsay R, Drebot M, Coombs KM, Ghavami S (2016). Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*; 18:e1.

Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol.*;371:21-31.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273(16):9357-60.

Jayaraman S. (2005). Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). *Journal of immunological methods*, 306(1-2), 68–79.

Jin Z, El-Deiry WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*;4(2):139-63.

Johno H, Takahashi S, Kitamura M (2010). Influences of acidic conditions on formazan assay: a cautionary note. *Appl Biochem Biotechnol*;162(6):1529-35.

Joza N, Galindo K, Pospisilik JA, Benit P, Rangachari M, Kanitz EE, Nakashima Y, Neely GG, Rustin P, Abrams JM, Kroemer G, Penninger JM (2008). The molecular archaeology of a mitochondrial death effector: AIF in *Drosophila*. *Cell Death Differ*;15(6):1009-18.

Jun JI, Lau LF (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol*;12(7):676-85.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*;26(4):239-57.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*;270(5233):96-9.

Konur A, Schulz U, Eissner G, Andreesen R, Holler E (2005). Interferon (IFN)-gamma is a main mediator of keratinocyte (HaCaT) apoptosis and contributes to autocrine IFN-gamma and tumour necrosis factor-alpha production. *Br J Dermatol*;152(6):1134-42.

Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, Chanrion M, Kelly GL, Gong JN, Moujalled DM, Bruno A, Csekei M, Paczal A, Szabo ZB, Sipos S, Radics G, Proszenyak A, Balint B, Ondi L, Blasko G, Robertson A, Surgenor A, Dokurno P, Chen I, Matassova N, Smith J, Pedder C, Graham C, Studeny A, Lysiak-Auvity G, Girard AM, Gravé F, Segal D, Riffkin CD, Pomilio G, Galbraith LC, Aubrey BJ, Brennan MS, Herold MJ, Chang C, Guasconi G, Cauquil N, Melchiorre F, Guigal-Stephan N, Lockhart B, Colland F, Hickman JA, Roberts AW, Huang DC, Wei AH, Strasser A, Lessene G, Geneste O (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*;538(7626):477-482.

Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S (2019). Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*;1871(2):313-322.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*;134(4):657-67.

Kroemer G, Martin SJ (2005). Caspase-independent cell death. *Nat Med*;11(7):725-30.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*;87(1):99-163.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 12072– 7.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*;133(6):1019-31.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*;24(22):2463-79.

Kumar MA, Nair M, Hema PS, Mohan J, Santhoshkumar TR (2007). Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Mol Carcinog*;46(3):231-41.

Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, Kimura S, Ottmann OG, Druker BJ, Villunger A, Roberts AW, Strasser A (2006). Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A*;103(40):14907-12.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.*;113 (Pt 20):3613-22.

Kvansakul M, Hinds MG (2014). The structural biology of BH3-only proteins. *Methods Enzymol*;544:49-74.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*;5(2):187-95.

Leist M, Jäätelä M (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*;2(8):589-98.

Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem*. 272(48):30299-305.

Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*, 149(6), 1269–1283.

Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*;6(6):1389-99.

Liu H, Wang N, Zhang Z, Wang H, Du J, Tang J (2017). Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Morphology and Mechanical Properties of HCT116 Human Colon Cancer Cells Investigated by Atomic Force Microscopy. *Scanning*;2017:2027079.

Liu M, Pelling JC, Ju J, Chu E, Brash DE (1998). Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer Res*;58(8):1723-9.

Liu S, Uppal H, Demaria M, Desprez PY, Campisi J, Kapahi P (2015). Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Sci Rep*;5:17895.

Marcotte R, Lacelle C, Wang E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3 (2004). *Mech Ageing Dev.*;125(10-11):777-83.

McLean JE, Datan E, Matassov D, Zakeri ZF (2009). Lack of Bax prevents influenza A virus-induced apoptosis and causes diminished viral replication. *J Virol*;83(16):8233-46.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS (2005). BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*;436(7051):720-4.

Ming L, Wang P, Bank A, Yu J, Zhang L (2006). PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem*;281(23):16034-42.

Mohr B, Illmer T (2005). Structural chromosomal aberrations in the colon cancer cell line HCT 116--results of investigations based on spectral karyotyping. *Cytogenet Genome Res*;108(4):359-61.

Mosieniak G, Adamowicz M, Alster O, Jaskowiak H, Szczepankiewicz AA, Wilczynski GM, Ciechomska IA, Sikora E (2012). Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mech Ageing Dev*;133(6):444-55.

Mosieniak G, Sliwiska MA, Alster O, Strzeszewska A, Sunderland P, Piechota M, Was H, Sikora E (2015). Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence. *Neoplasia*;17(12):882-893.

Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T (1994). Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum*;37(10):1415-20.

Müller-Hermelink N, Braumüller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, Ghoreschi K, Yazdi A, Haubner R, Sander CA, Mocikat R, Schwaiger M, Förster I, Huss R, Weber WA, Kneilling M, Röcken M (2008). TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*;13(6):507-18.

Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*;155(5):1104-18.

Myöhänen SK, Baylin SB, Herman JG (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res*;58(4):591-3.

Nacher V, Carretero A, Navarro M, Armengol C, Llombart C, Rodríguez A, Herrero-Fresneda I, Ayuso E, Ruberte J (2006). The quail mesonephros: a new model for renal senescence? *J Vasc Res*;43(6):581-6.

Nachlas MM, Margulies SI, Goldberg JD, Seligman AM (1960). The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal Biochem.*;1:317-26.

Nardella C, Clohessy J, Alimonti A, Pandolfi PP (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 11, 503–511.

Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113, pp. 703-716

National Cancer Institute, USA (2021). Lung Cancer Survival Rates. <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> [Zugriff 12.10.2021]

National Cancer Institute, USA (2021). Survival Rates for Colorectal Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> [Zugriff 12.10.2021]

Nedeljković M, Damjanović A (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*;8(9):957.

Nelyudova A, Aksenov N, Pospelov V, Pospelova T (2007). By blocking apoptosis, Bcl-2 in p38-dependent manner promotes cell cycle arrest and accelerated senescence after DNA damage and serum withdrawal. *Cell Cycle*;6(17):2171-7.

O'Brien MA, Daily WJ, Hesselberth PE, Moravec RA, Scurria MA, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV (2005). Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model. *J Biomol Screen*. 10(2):137-48.

Ou HL, Hoffmann R, González-López C, Doherty GJ, Korkola JE, Muñoz-Espín D (2021). Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. *Mol Oncol*;15(10):2634-2671.

Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*;118(Pt 3):485-96.

Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera WA, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scudiero DA, Monks A, Alley MC, Grote M (1988). The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 25: 911-914.

Pedro JM, Wei Y, Sica V, Maiuri MC, Zou Z, Kroemer G, Levine B (2015). BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy. *Autophagy*;11(3):452-9.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50(2):98-115.

Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*;8(4):603-19.

Probin V, Wang Y, Bai A, Zhou D (2006). Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*.;319(2):551-60.

Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*;22(18):2805-11.

Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR; KEYNOTE-024 Investigators (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*;375(19):1823-1833.

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;76(7):3116-20.

Rentschler M, Chen Y, Pahl J, Soria-Martinez L, Braumüller H, Brenner E, Bischof O, Röcken M, Wieder T (2018). Nuclear Translocation of Argonaute 2 in Cytokine-Induced Senescence. *Cell Physiol Biochem*;51(3):1103-1118.

Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*;5(5):379-89.

Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, Larkin J, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Hamid O, Mateus C, Shapira-Frommer R, Kosh M, Zhou H, Ibrahim N, Ebbinghaus S, Ribas A; KEYNOTE-006 investigators (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*;372(26):2521-32.

Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*;11(8):973-9.

Rodriguez R, Meuth M (2006). Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell*;17(1):402-12.

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*;142(2):257-65.

Rohner L, Reinhart R, Iype J, Bachmann S, Kaufmann T, Fux M (2020). Impact of BH3-mimetics on Human and Mouse Blood Leukocytes: A Comparative Study. *Sci Rep*;10(1):222.

Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalava T, Thalji NM, Hagler M, Jurk D, Smith LA, Casaclang-Verzosa G, Zhu Y, Schafer MJ, Tchkonja T, Kirkland JL, Miller JD (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*;15(5):973-7.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-91.

Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Murray GF, Alotaibi MR, Kawale AS, Elsayed Z, Henderson SC, Yakovlev V, Elmore LW, Toor A, Harada H, Reed J, Landry JW, Gewirtz DA (2019). Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochem Pharmacol*;162:202-212.

Saleh T, Carpenter VJ, Tyutyunyk-Massey L, Murray G, Levenson JD, Souers AJ, Alotaibi MR, Faber AC, Reed J, Harada H, Gewirtz DA (2020). Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-XL - BAX interaction. *Mol Oncol.*;14(10):2504-2519.

Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG (2017). Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther*;34(10):2232-2273.

Saraste A, Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*;45(3):528-37.

Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y (2001). Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev.*;122(15):1695-706.

Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y (2008). Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radic Res*;42(7):625-32.

Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, Mazula DL, Brooks RW, Fuhrmann-Stroissnigg H, Pirtskhalava T, Prakash YS, Tchkonja T, Robbins PD, Aubry MC, Passos JF, Kirkland JL, Tschumperlin DJ, Kita H, LeBrasseur NK (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*;8:14532.

Schieber M, Ma S (2019). The expanding role of venetoclax in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Blood Lymphat Cancer*;9:9-17.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*;331(6024):1565-70.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*;75(2):163-89.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*;88(5):593-602.

Shahbandi A, Rao SG, Anderson AY, Frey WD, Olayiwola JO, Ungerleider NA, Jackson JG (2020). BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer. *Cell Death Differ*;27(11):3097-3116.

Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;5(4):a008714.

Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, Okamoto T, Takahashi C (2009). Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell*;15(4):255-69.

Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*;413(6851):86-91.

Shay JW, Bacchetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*;33(5):787-91.

Shi Y (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*;9(3):459-70.

Short S, Fielder E, Miwa S, von Zglinicki T (2019). Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine*;41:683-692.

Silva MT (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*;584(22):4491-9.

Sliwinska MA, Mosieniak G, Wolanin K, Babik A, Piwocka K, Magalska A, Szczepanowska J, Fronk J, Sikora E (2009). Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev*;130(1-2):24-32.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*;150(1):76-85.

Song IH, Caplan AI, Dennis JE (2009). Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*;27(2):216-21.

Song YS, Lee BY, Hwang ES (2005). Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev*;126(5):580-90.

Sorenson CM, Barry MA, Eastman A (1990). Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst*;82(9):749-55.

Spallarossa P, Altieri P, Aloï C, Garibaldi S, Barisione C, Ghigliotti G, Fugazza G, Barsotti A, Brunelli C (2009). Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;297(6):H2169-81.

Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971). Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(11):2843-5.

Sporn MB (1996). The war on cancer. *Lancet*;347(9012):1377-81.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2021). Todesursachenstatistik 2019. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg475708 [Zugriff: 12.10.2021]

Stein GH, Drullinger LF, Souldard A, Dulić V (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*;19(3):2109-17.

Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*;155(5):1119-30.

Suvarna V, Singh V, Murahari M (2019). Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*;862:172655.

Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, Seto M (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*;24:1348–1358.

Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med*. 177(6):1809-14.

te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*;62(6):1876-83.

Thomas MG, Marwood RM, Parsons AE, Parsons RB (2015). The effect of foetal bovine serum supplementation upon the lactate dehydrogenase cytotoxicity assay: Important considerations for in vitro toxicity analysis. *Toxicol In Vitro*;30(1 Pt B):300-8.

Timofeev O, Schlereth K, Wanzel M, Braun A, Nieswandt B, Pagenstecher A, Rosenwald A, Elsässer HP, Stiewe T (2013). p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell Rep*;3(5):1512-25.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*;366(26):2443-54.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*;226(4678):1097-9.

Tyciakova S, Valova V, Svitkova B, Matuskova M (2021). Overexpression of TNF α induces senescence, autophagy and mitochondrial dysfunctions in melanoma cells. *BMC Cancer*;21(1):507.

van Cruchten S, van den Broeck W (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*;31(4):214-23.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31(1):1-9.

- Vařecha M, Potěšilová M, Matula P, Kozubek M (2012). Endonuclease G interacts with histone H2B and DNA topoisomerase II alpha during apoptosis. *Mol Cell Biochem*;363(1-2):301-7.
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P (1995). Mechanisms of Phosphatidylserine Exposure, A Phagocyte Recognition Signal, on Apoptotic T Lymphocytes. *J. Exp. Med*, 182, 1597-1601.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45–65.
- Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*;381(6584):713-6.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*;1(5):405-13.
- Wang C, Youle RJ (2012). Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene*;31(26):3177-89.
- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*. 279(24):25535-43.
- Wang S, Yu H, Wickliffe JK (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro*;25(8):2147-51.
- Wang S, Zhou M, Lin F, Liu D, Hong W, Lu L, Zhu Y, Xu A (2014). Interferon-γ induces senescence in normal human melanocytes. *PLoS One*;9(3):e93232.
- Wang X, Tsao SW, Wong YC, Cheung AL (2003). Induction of senescent-like growth arrest as a new target in anticancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*;3(2):153-9.
- Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen AL (2002). The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal*;8(5):375-91.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*;292(5517):727-30.
- Wieder T, Brenner E, Braumüller H, Bischof O, Röcken M (2017). Cytokine-induced senescence for cancer surveillance. *Cancer Metastasis Rev*;36(2):357-365.
- Włodkowiec D, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol*;559:19-32.

Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*;18(2):173-9.

Wu AJ, Kurrasch RH, Katz J, Fox PC, Baum BJ, Atkinson JC (1994). Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the growth of a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol*;161(2):217-26.

Xu M, Tchkonja T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, White TA, Johnson KO, Stout MB, Mezera V, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Kirkland JL (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A*;112(46):E6301-10.

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, Tchkonja T, Kirkland JL (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*;24(8):1246-1256.

Xu WS, Perez G, Ngo L, Gui CY, Marks PA (2005). Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. *Cancer Res* 65(17):7832-9.

Yamaguchi H, Chen J, Bhalla K, Wang HG (2004). Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*;279(38):39431-7.

Yokochi T, Robertson KD (2004). Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis. *Mol Pharmacol* 66(6): 1415-20.

Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, Vadai E, Dassa L, Shahar E, Condiotti R, Ben-Porath I, Krizhanovsky V (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*;7:11190.

Yosef R, Pilpel N, Papismadov N, Gal H, Ovadya Y, Vadai E, Miller S, Porat Z, Ben-Dor S, Krizhanovsky V (2017). p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J*.;36(15):2280-2295.

Zantl N, Weirich G, Zall H, Seiffert BM, Fischer SF, Kirschnek S, Hartmann C, Fritsch RM, Gillissen B, Daniel PT, Häcker G (2007). Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* 26(49): 7038-48.

Zender L, Rudolph KL (2009). Keeping your senescent cells under control. *Aging (Albany NY)*;1(5):438-41.

Zhang JW, Zhang SS, Song JR, Sun K, Zong C, Zhao QD, Liu WT, Li R, Wu MC, Wei LX (2014). Autophagy inhibition switches low-dose camptothecin-induced premature senescence to apoptosis in human colorectal cancer cells. *Biochem Pharmacol* 90(3): 265-75.

Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*;290(5493):989-92.

Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, Gottimukkala K, Cutler RG, Zhang S, Abdelmohsen K, Bohr VA, Misra Sen J, Gorospe M, Mattson MP (2019). Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*;22(5):719-728.

Zhang Y, Gao Y, Zhang G, Huang S, Dong Z, Kong C, Su D, Du J, Zhu S, Liang Q, Zhang J, Lu J, Huang B (2011). DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *Int J Cancer*;128(3):551-61.

Zhou X, An D, Liu X, Jiang M, Yuan C, Hu J (2018). TNF α induces tolerant production of CXC chemokines in colorectal cancer HCT116 cells via A20 inhibition of ERK signaling. *Int Immunopharmacol*;54:296-302.

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 (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*;15(3):428-35.

Zou H, Niswander L (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 272: 738 – 741

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Experimente für diese Arbeit wurden im Labor für Tumorummunologie der Universitätshautklinik in Tübingen unter Schirmherrschaft des Ärztlichen Direktors Prof. Dr. Martin Röcken durchgeführt. Die Gesamtkonzeption der Arbeit sowie die Planung der Experimente erfolgte mit Hilfe meines Betreuers Prof. Dr. Thomas Wieder.

Die verwendeten HCT-116-Zellen (WT, Bax^{-/-}, DKO) wurden von Privatdozent Dr. Frank Essmann zur Verfügung gestellt. Die Versuche zur Apoptosedetektion mittels Durchflusszytometrie und Caspase-3-Aktivitätsassay wurden am Interfakultären Institut für Biochemie (IFIB) der Universität Tübingen in den Laboren der Arbeitsgruppe Schulze-Osthoff unter Anleitung von PD Dr. Frank Essmann und Melanie Grimm (MTA) durch mich selbst durchgeführt, die Auswertung der FACS-Plots erfolgte größtenteils durch PD Dr. Essmann.

Die Durchführung der qPCR zur relativen Quantifizierung von CXCL-10 nach IFN- γ -Behandlung (Abb. 9) erfolgte mit Unterstützung von Susanne Weidemann (MTA). Beim Western Blot für Bax und Bak (Abb. 4) wurde von Viola Galinat (MTA) die Antikörper-Inkubation und anschließende graphische Bearbeitung übernommen.

Alle weiteren Versuche wie die Behandlung der Zellen mit Zytokinen bzw. Doxorubicin, Growth-Arrest-Assays, XTT- und LDH-Assays, SA- β -Gal-Assays sowie Western Blots erfolgten nach Einarbeitung durch Prof. Dr. Thomas Wieder und Susanne Weidemann eigenständig durch mich selbst, ebenso die statistische Auswertung.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Thomas Wieder verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 03.01.2022

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die durch ihre vielseitige Unterstützung zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zunächst geht ein großes Dankeschön an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Wieder für die fachkundige Betreuung, die stets schnelle Erreichbarkeit, die gute Einarbeitung und die angenehme Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich dem Ärztlichen Direktor und Leiter der Arbeitsgruppe Tumormunologie, Prof. Dr. Martin Röcken, für die Möglichkeit danken, meine Versuche in den Laboren der Hautklinik durchzuführen. Bei den wöchentlichen Journal- und Data-Club-Treffen haben Sie sehr viel Begeisterung für aktuelle Krebsforschung in mir geweckt. Ein herzlicher Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tumormunologie für ihre tatkräftige Unterstützung, insbesondere Susanne Weidemann für die gute Einarbeitung, Viola Galinat für ihre Hilfe bei einigen Experimenten, Nadine Simon, Britta Bauer und Maximilian Rentschler für die gute Stimmung im Doktorand*innenzimmer und Max Metze für viele aufbauende Worte.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Frank Essmann für die große Hilfe bedanken – von der Bereitstellung der Zellen bis hin zur exzellenten Betreuung bei den FACS-Experimenten – sowie bei Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die Möglichkeit, die Laboratorien seiner Arbeitsgruppe im Interfakultären Institut für Biochemie in Tübingen zu nutzen.

Ein Dank gilt auch der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Förderung meiner Promotion.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich über die gesamte Dauer der Doktorarbeit sowohl finanziell als auch moralisch tatkräftig unterstützt haben.