

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wilfried Budach

Evaluation des senolytischen Potentials einer marinen
Naturstoffbibliothek

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Judith Neuwahl (geb. Synofzik)
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reiner U. Jänicke

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Für meinen Vater

Zusammenfassung

Die zelluläre Seneszenz ist ein irreversibler, permanenter Zellzyklusarrest und stellt neben der Apoptose (programmierter Zelltod) eine Möglichkeit für Zellen dar, auf eine irreparable Schädigung ihrer DNA zu reagieren. Beide Mechanismen können in Tumorzellen durch eine Chemo- oder Radiotherapie induziert werden, dennoch handelt es sich nicht um gleichwertige Therapieziele. Seneszente Zellen sind zwar teilungsunfähig, aber sie bleiben metabolisch aktiv und bilden einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) aus, durch den sie über Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren ein inflammatorisches Mikromilieu generieren und die Proliferation benachbarter Tumorzellen fördern können. Langfristig können seneszente Zellen so Therapienebenwirkungen nach einer Radio- oder Chemotherapie bedingen und sogar die Bildung von Tumorrezidiven und Metastasen fördern. Aus diesem Grund entwickelte sich ein neuer Therapieansatz mit dem Ziel, selektiv seneszente Zellen durch niedermolekulare Substanzen (sogenannte Senolytika) zu eliminieren. Die Mehrzahl aller bisher beschriebenen Senolytika sind ausschließlich in nicht-malignen Zellen in Bezug auf altersassoziierte Erkrankungen getestet worden, da auch hier seneszenten Zellen eine zentrale Rolle zugeschrieben wird. Der Fokus der vorliegenden Forschungsarbeit lag hingegen auf der gezielten Eliminierung seneszenten Tumorzellen im Rahmen von onkologischen Erkrankungen. Insbesondere die Depletion sogenannter Therapie-induzierter seneszenten Zellen birgt das Potential, den gesamten Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit bestand darin, eine marine Naturstoffbibliothek (Prof. P. Proksch, HHU Düsseldorf) auf Substanzen zu untersuchen, die in den Kolon- und Mammakarzinomzelllinien HCT116 bzw. MCF-7 eine senolytische Wirkung zeigen. Die DNA-Schädigungs-induzierte Seneszenz wurde durch Behandlung der Zellen mit 10 Gy einer ionisierenden Röntgenstrahlung erreicht. Eine Substanz wurde dann als senolytisch klassifiziert, wenn sie seneszente Zellen gezielt abtötete, ohne dass gleichzeitig behandelte, proliferierende Kontrollzellen angegriffen wurden. Mittels des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests wurde eine Substanz identifiziert, die in beiden Tumorzelllinien senolytisch wirkte: der Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K-) Inhibitor Wortmannin. Mit mehreren Methoden zur Zelltodquantifizierung, wie die durchflusszytometrische Messung der Propidiumiodid-Aufnahme und die Messung der freigesetzten LDH-Aktivität, konnte die senolytische Wirkung von Wortmannin verifiziert werden. Darüber hinaus zeigte auch das deutlich stabilere und bereits in klinischen Studien eingesetzte Wortmannin-Derivat PX-866 selbst in geringeren Konzentrationen als Wortmannin einen senolytischen Effekt in beiden Tumorzelllinien. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass Wortmannin und PX-866 in HCT116 und MCF-7-Zellen die Expression des für das Seneszenzprogramm essentiellen CDK-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} inhibieren. Zur weiteren Charakterisierung des senolytischen Wirkmechanismus wurden andere, Isoform-spezifische PI3K-Inhibitoren auf ihren zytotoxischen Effekt in proliferierenden und seneszenten Zellen hin untersucht. Da PI3K Teil einer proliferations- und überlebensfördernden Signalkaskade ist, in der auch die nachgeschalteten Proteine AKT und mTOR eine zentrale Rolle übernehmen, wurde ebenfalls evaluiert, inwiefern deren spezifische Inhibition senolytisch wirkt. Keiner der getesteten Inhibitoren konnte jedoch den senolytischen Effekt von PX-866 vollständig reproduzieren. Lediglich der α -Isoform-spezifische PI3K-Inhibitor BYL719 zeigte zumindest verzögert einen annähernd ähnlichen senolytischen Effekt.

Obwohl der senolytische Wirkmechanismus von Wortmannin und PX-866 noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, lässt sich zusammenfassend sagen, dass das klinisch einsetzbare Wortmannin-Derivat PX-866 einen vielversprechenden Kandidaten darstellt, der zukünftig als therapeutisch verwendbares Senolytikum einen neuen Weg in der Behandlung onkologischer Erkrankungen ermöglichen könnte.

Abstract

Cellular senescence is an irreversible and permanent cell cycle arrest that together with the process of apoptosis (programmed cell death) determines cellular fate in response to an irreparable DNA damage. Both mechanisms can be induced in tumour cells by radio- or chemotherapy, yet they do not represent equivalent therapeutic aims. Even though senescent cells cease dividing, they remain metabolically active and secrete cytokines, chemokines and growth factors to generate the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP). Thereby, senescent cells create a proinflammatory microenvironment that is able to promote the proliferation of neighbouring tumour cells. Chronically persisting senescent cells can cause adverse effects during cancer treatment and may even lead to the development of metastases and cancer relapse. The endeavour to selectively kill senescent cells has led to the identification of a novel class of small molecules called senolytics. Almost all senolytics that have been described so far were examined in non-malignant cells and their role in age-associated diseases, since it is well known that senescent cells are often the main cause of age-related disorders. The focus of the present research project, however, has been on eliminating senescent tumour cells in the context of oncological diseases. Especially the selective depletion of therapy-induced senescent cells, could contribute to a substantial improvement in the course of malignant disorders.

The aim of this thesis was to screen a marine natural compound library (Prof. P. Proksch, HHU Düsseldorf) for substances showing senolytic activity towards senescent HCT116 (colon carcinoma) and MCF-7 (breast carcinoma) cells. The DNA damage-induced cellular senescence was achieved by using 10 Gy of ionizing X-radiation. A substance was classified as senolytic if it selectively killed senescent cells without harming equally treated proliferating control cells. Employing the crystal violet cytotoxicity assay, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin was identified as a potential senolytic killing both senescent tumour cell lines. Several other methods to quantify cell death such as the determination of propidium iodide uptake by flow cytometry or measurement of released LDH-activity, verified the senolytic potential of wortmannin. In addition, the more stable wortmannin-derivative PX-866, which has already been tested in clinical trials, also turned out to exert a similar senolytic activity towards both cell lines. On the molecular level, wortmannin and PX-866 inhibit the expression of p21^{WAF1/Cip1}, a CDK-inhibitor essential for activating and maintaining the senescence program. For further investigations of the molecular mechanism(s) underlying the senolytic effect, other isoform-specific PI3K-inhibitors were tested regarding their cytotoxicity towards senescent and proliferating HCT116 and MCF-7 cells. Since PI3K and its downstream targets AKT and mTOR are part of a pro-survival and proliferation-enhancing signalling cascade, it was evaluated whether the specific inhibition of these downstream targets also leads to selective elimination of senescent cells. However, neither of the inhibitors tested was able to reproduce the senolytic effect of PX-866. Only the α -isoform-specific PI3K inhibitor BYL719 demonstrated a similar but delayed senolytic activity compared to PX-866.

Even though the molecular mechanisms underlying the senolytic effect of wortmannin and PX-866 have not yet been completely elucidated, the wortmannin-derivative PX-866 constitutes a promising candidate for future clinical applications in the context of senolytic therapies and could thus enable new ways of treating oncological diseases.

Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
ARF	<i>Alternative Reading Frame</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and RAD3-related</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
Chk1, Chk2	<i>Checkpoint-Kinase 1, Checkpoint-Kinase 2</i>
CIP/KIP	<i>CDK Interacting Protein/ Kinase Inhibitory Protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	<i>DNA dependent Protein Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FOXO	<i>Forkhead box protein O4</i>
FOXO4-DRI	FOXO4-D-retro-inverso
Hsp90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
mTORC1, 2	<i>mammalian Target Of Rapamycin Complex 1, 2</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K, PI3Ks	<i>Phosphoinositid-3-Kinase, Phosphoinositid-3-Kinases</i>
PIK3CA	<i>PI3K catalytic subunit alpha</i>
PtdIns	Phosphatidylinositol
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SASP	Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches Phänotyp
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase
SCAPs	<i>Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Formen der zellulären Seneszenz	1
1.2	Merkmale und Nachweis zellulärer Seneszenz.....	4
1.3	Funktion seneszenten Zellen im Organismus - Seneszenz als protektiver und tumorfördernder Mechanismus	5
1.4	Depletion seneszenten Zellen als Therapiemöglichkeit in der Onkologie.....	8
1.5	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Zellen, Antikörper, Chemikalien, Puffer und Lösungen	12
2.1.2	Geräte und Software.....	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Induktion von Seneszenz in HCT116- und MCF-7 Zellen und allgemeine Vorbereitung der Zellen.....	16
2.2.2	Kolorimetrische Färbung der β -Galactosidase-Aktivität	17
2.2.3	Kristallviolett-Zytotoxizitätstest	18
2.2.4	Durchflusszytometrische Analyse zur Zelltodbestimmung mittels Propidiumiodid-Aufnahme	19
2.2.5	LDH-Zytotoxizitätstest.....	20
2.2.6	Zellextrakt-Herstellung und Messung der Proteinmenge.....	21
2.2.7	SDS-Gelelektrophorese	22
2.2.8	Western Blot.....	23
2.2.9	Statistik und Datenaufbereitung	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Screening einer marinen Naturstoffbibliothek auf senolytische Aktivität.....	24
3.2	Verifizierung des senolytischen Potentials von Kahalalide F	30
3.3	Wortmannin und PX-866 zeigen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest einen senolytischen Effekt in HCT116-Zellen	32
3.4	Verifizierung der senolytischen Aktivität von Wortmannin und PX-866.....	33
3.5	Charakterisierung der senolytischen Wirkung von Wortmannin und PX-866.....	37

3.5.1	Wortmannin und PX-866 reduzieren die AKT-Phosphorylierung.....	37
3.5.2	Wortmannin und PX-866 beeinflussen die p53- und p21-Proteinexpression in seneszenten Zellen.....	38
3.5.3	Identifizierung möglicher Angriffspunkte von Wortmannin und PX-866 in seneszenten Zellen	40
4	Diskussion.....	46
4.1	Identifizierung potentieller Senolytika in HCT116- und MCF-7-Zellen	46
4.1.1	Die Wirkung von Senolytika ist abhängig vom Zelltyp	46
4.1.2	Seneszente Zellen zeigten sich im Naturstoff-Screening resistenter als proliferierende Zellen	47
4.1.3	Kahalalide F als potentielles Senolytikum in HCT116-Zellen.....	48
4.2	Wortmannin und PX-866 stellen neu identifizierte Senolytika in HCT116- und MCF-7-Zellen dar.....	50
4.2.1	Wortmannin und PX-866 induzieren selektiv Zelltod in seneszenten HCT116- und MCF-7-Zellen	50
4.2.2	Wortmannin und PX-866 heben den seneszenten Status von HCT116- und MCF-7-Zellen auf	51
4.3	PI3-Kinasen als Angriffspunkt senolytischer Therapeutika.....	54
4.3.1	Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wird für die Seneszenzinduktion und Aufrechterhaltung benötigt	54
4.3.2	Die Inhibition von Klasse I PI3-Kinasen wirkt in HCT116- und MCF-7-Zellen senolytisch	59
4.4	Ausblick und Schlussfolgerung.....	62
5	Literaturverzeichnis.....	65
6	Anhang	73
7	Danksagung	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signalwege der zellulären Stressantwort.....	3
Abb. 2: Vorbereitung seneszenter und proliferierender HCT116 und MCF-7-Zellen.	17
Abb. 3: Schematische Darstellung der LDH-Aktivitätsmessung.....	21
Abb. 4: Seneszenzinduktion durch DNA-Schädigung in HCT116-Zellen	24
Abb. 5: Arbeitsablauf zur Evaluation der senolytischen Aktivität von 180 Naturstoffen in HCT116 und MCF-7-Zellen	25
Abb. 6: Kristallviolett-Zytotoxizitätstest der in anderen Zellsystemen als senolytisch beschriebenen Substanzen Dasatinib, Quercetin und Geldanamycin.....	27
Abb. 7: Zusammenfassung des Screening-Verfahrens der 180 Naturstoffe	29
Abb. 8: Kahalalide F zeigt senolytische Aktivität in HCT116-Zellen in einem sehr schmalen Konzentrationsbereich	31
Abb. 9: Wortmannin und PX-866 zeigen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest in HCT116- Zellen senolytische Aktivität	33
Abb. 10: Seneszente MCF-7 und HCT116-Zellen zeigen eine deutlich verstärkte Ablösung durch Wortmannin und PX-866	34
Abb. 11: Seneszente MCF-7-Zellen zeigen selektiv eine erhöhte PI-Aufnahme nach Behandlung mit Wortmannin und PX-866	35
Abb. 12: Wortmannin- und PX-866 steigern die LDH-Freisetzung seneszenter HCT116 und MCF-7-Zellen	37
Abb. 13: Wortmannin und PX-866 reduzieren die AKT-Phosphorylierung	38
Abb. 14: Wortmannin und PX-866 reduzieren die p53- und p21-Expression in seneszenten Zellen	40
Abb. 15: Evaluation der senolytischen Wirkung verschiedener Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in MCF-7-Zellen	42
Abb. 16: Evaluation der senolytischen Wirkung von Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR- Signalwegs in HCT116-Zellen.....	44
Abb. 17: Arten und Bildung der Phosphatidylinositol-Phosphate	54
Abb. 18: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt Zellüberleben	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorzelllinien.....	12
Tabelle 2: Zellzahlen	12
Tabelle 3: Primäre Antikörper	12
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper	13
Tabelle 5: Chemikalien.....	13
Tabelle 6: Puffer und Lösungen	14
Tabelle 7: Geräte	15
Tabelle 8: Software	15
Tabelle 9: Begriffsdefinitionen behandelter und unbehandelter Zellen.....	16
Tabelle 10: Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs	41
Tabelle 11: Isoformen der PI3-Kinasen	55

1 Einleitung

Zellen haben zahlreiche Möglichkeiten, um auf endogenen und exogenen Stress zu reagieren. In den letzten Jahren ist neben dem programmierten Zelltod (Apoptose) ein weiteres terminales Zellschicksal in den Fokus der Grundlagen- und translationalen Forschung gerückt: die zelluläre Seneszenz, ein permanenter und irreversibler Zellzyklusarrest. Erstmals beschrieben wurde die zelluläre Seneszenz vor über 50 Jahren, als Hayflick und Moorhead beobachteten, dass humane Fibroblasten *in vitro* nur eine begrenzte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen können und schließlich in einen permanenten Zellzyklusarrest eintreten (Hayflick and Moorhead, 1961). In der Folge konnte die bei jeder Zellteilung ablaufende Verkürzung der Telomere als Ursache identifiziert werden, die über Signalwege der DNA-Schadungsantwort den Zellzyklus stoppt und schließlich Seneszenz einleitet (Fagagna et al., 2003). Eine zentrale Funktion von Apoptose und Seneszenz besteht darin, die maligne Transformation einer Zelle zu verhindern, wenn beispielsweise eine irreparable Schädigung der DNA vorliegt und eine kontrollierte Proliferation nicht mehr gewährleistet werden kann. Die Entscheidung, ob eine Zelle in die Apoptose oder in die Seneszenz getrieben wird, ist unter anderem vom Ausmaß des DNA-Schadens abhängig, jedoch spielen auch der Zelltyp und die Aktivität verschiedener intrazellulärer Signalwege wie der p53-p21-Achse eine entscheidende Rolle (Childs et al., 2014). Es handelt sich dennoch nicht um zwei gleichwertige tumorsuppressive Mechanismen, da seneszente Zellen zwar teilungsunfähig, aber im Gegensatz zu apoptotischen Zellen weiterhin metabolisch aktiv sind und auf diese Weise Einfluss auf benachbarte Zellen nehmen können. Die Sezernierung verschiedener Zytokine und Chemokine sowie weiterer Faktoren wird als Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches Phänotyp (SASP) bezeichnet und ermöglicht es seneszenten Zellen, auf benachbarte Zellen parakrin und juxtakrin zu wirken (Tchkonia et al., 2013). Insbesondere aufgrund dieser Eigenschaft sind seneszente Zellen sowohl für die Altersforschung als auch für die onkologische Forschung von besonderem Interesse. Inwiefern spielen seneszente Zellen in diesen Bereichen eine Rolle? Was bedeutet das für unser Verständnis von Tumorentstehung? Und wie kann dieses Wissen klinisch nutzbar gemacht werden und somit Wegbereiter für einen neuen Ansatz in der Tumorthherapie sein?

1.1 Formen der zellulären Seneszenz

Grundsätzlich werden drei Formen zellulärer Seneszenz unterschieden, die jeweils durch unterschiedliche Auslöser induziert werden. Neben der oben beschriebenen replikativen Seneszenz gibt es die DNA-Schadungs-induzierte-Seneszenz und die Onkogen-induzierte Seneszenz (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Viele Substanzen, wie

beispielsweise Chemotherapeutika, induzieren über verschiedene Mechanismen DNA-Veränderungen: Platinverbindungen z.B. führen zur Quervernetzung von DNA-Strängen und Antimetabolite werden als falsche Bausteine in die DNA integriert. Im weiteren Verlauf kommt es hierdurch zu DNA-Schädigungen in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen (Lüllmann et al., 2016). Aber auch ionisierende Strahlung kann zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen: Hochenergetische Photonen setzen über Ionisationsprozesse Elektronen frei, was die DNA einerseits direkt, andererseits über Bildung freier Radikale indirekt schädigt (Nguyen et al., 2018). Liegt ein DNA-Schaden vor, wird er unter anderem durch die Proteinkinasen *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) und *Ataxia Telangiectasia and RAD3-related* (ATR) registriert, die daraufhin die *Checkpoint-Kinasen* 1 und 2 (Chk1 und Chk2) aktivieren, was schließlich zur Stabilisierung und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führt (Abb. 1). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor kann p53 über seine Zielgene, unter anderem die pro-apoptischen Bcl-2 Familienproteine Puma und Noxa, die Einleitung der Apoptose bewirken. Jedoch kann p53 auch Seneszenz induzieren, indem es die Expression von p21^{WAF1/Cip1}, einem für die Seneszenz entscheidenden CDK-Inhibitor der CIP/KIP-Familie, steigert (Jänicke et al., 2007). Diese Zellschicksalentscheidung wird durch viele Faktoren, wie z.B. den Zelltyp und das Ausmaß der DNA-Schädigung, beeinflusst (Childs et al., 2014). Abhängig von unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen an p53, der p53-Expression und der Anwesenheit verschiedener Kofaktoren kann p53 unterschiedliche Zielgene aktivieren und so in der Zelle entweder Apoptose oder Seneszenz einleiten (Jänicke et al., 2007; Murray-Zmijewski et al., 2008). Steigert p53 die p21-Expression, kann p21 das Voranschreiten des Zellzyklus über Inhibition von *Cyclin-Dependent Kinases* (CDKs) verhindern. CDK2 beispielsweise phosphoryliert in seiner aktiven Form den Tumorsuppressor Rb (*retinoblastoma protein*), damit dieser den Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr binden kann, was schließlich den Eintritt in die S-Phase bewirkt. Wird CDK2 durch p21 inhibiert, wird der Zellzyklus gestoppt (Childs et al., 2014). Neben p21 kann auch p16^{INK4a}, als Mitglied der INK4-CDK-Inhibitoren, durch eine DNA-Schädigung aktiviert werden und schließlich durch Inhibition von CDK4 und CDK6 zur Seneszenzinduktion führen (Childs et al., 2015).

Auch durch Entstehung sogenannter Onkogene kann Seneszenz in der Zelle induziert werden (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Onkogene gehen durch aktivierende Mutationen aus Protoonkogenen hervor; diese kodieren häufig für Proteine, die an Signalwegen der Zellproliferation und der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Beispiele für Protoonkogene sind *rat sarcoma* (Ras) oder c-Myc (Lehman et al., 1991). Ein Onkogen kann somit zur unkontrollierten Proliferation führen, die nicht mehr den Kontrollmechanismen der Zelle unterliegt. Eine unkontrollierte Proliferation steigert einerseits die Fehlerquote bei der DNA-Replikation, andererseits können

Reparatursysteme den Schaden nicht mehr beheben. Dies führt schließlich dazu, dass in der Zelle über die oben genannten DNA-Schädigungssignalwege Seneszenz induziert werden kann, um eine neoplastische Transformation durch unkontrollierte Proliferation zu verhindern (Sun et al., 2018). In der Onkogen-induzierten Seneszenz spielt insbesondere der Tumorsuppressor ARF (*Alternative Reading Frame*) eine Rolle, der bei Vorliegen eines Onkogens für die p53-Aktivierung hauptverantwortlich ist (Mellert et al., 2007).

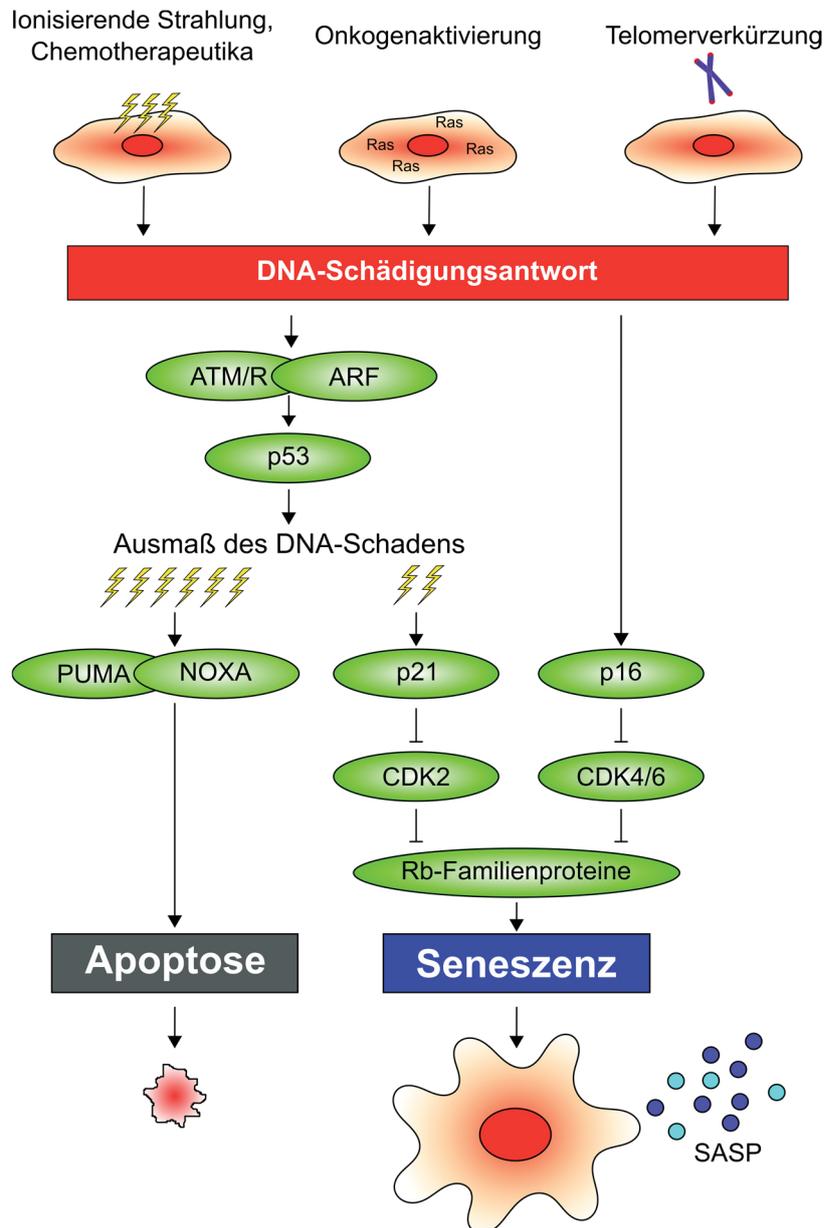


Abb. 1: Signalwege der zellulären Stressantwort (modifiziert nach Childs et al., 2014). ATM = *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), ATR = *Ataxia Telangiectasia and RAD3-related*, ARF = *Alternative Reading Frame*, CDK = *Cyclin-Dependent Kinase*, Rb = *retinoblastoma protein*

Drei weitere Formen des Zellzyklusarrests müssen von dem Begriff der Seneszenz abgegrenzt werden: der akute Wachstumsarrest, ruhende Zellen und terminal differenzierte Zellen. Akuter Wachstumsarrest aufgrund reparabler DNA-Schädigung kann dazu führen,

dass Zellen in der G1 oder G2-Phase arretieren, wobei dieser Zustand nach erfolgter Reparatur reversibel ist und der Zellzyklus fortgeführt werden kann (Chakradeo et al., 2016). Ruhende Zellen befinden sich in der sogenannten G0-Phase des Zellzyklus und durchlaufen keine Zellteilungen. Allerdings ist dieser Zellzyklusarrest grundsätzlich reversibel durch Hinzugabe von Wachstumsfaktoren oder durch andere mitogene Stimulation (Dirac and Bernards, 2003). Terminal differenzierte Zellen hingegen entstehen aus Vorläuferzellen, die ihre Teilungsfähigkeit aufgegeben haben, aber weiterhin ihre ursprüngliche Funktion im Gewebe ausüben und für den jeweiligen Gewebetyp charakteristische Expressionsmuster aufweisen. Terminal differenzierte Zellen können nur bei bestimmten Zelltypen auftreten, wie beispielsweise bei Neuronen oder Kardiomyozyten. Sowohl bei ruhenden Zellen als auch bei terminal differenzierten Zellen fehlen klassische Seneszenzcharakteristika (siehe Kapitel 1.2) (He and Sharpless, 2017).

1.2 Merkmale und Nachweis zellulärer Seneszenz

Senescente Zellen können eine Fülle an morphologischen und molekularen Charakteristika aufweisen, die für sich genommen den seneszenten Status einer Zelle jedoch nicht definitiv belegen können (Myrianthopoulos et al., 2019). Zum einen können manche dieser Charakteristika u.a. auch in ruhenden Zellen gefunden werden, zum anderen ist zelluläre Seneszenz ein dynamischer Prozess und kann sich zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich manifestieren. Nicht zuletzt ist der vorliegende senescente Phänotyp auch stark abhängig vom induzierenden Stimulus und vom Zelltyp (Hernandez-Segura et al., 2017; Salmonowicz and Passos, 2017). Allerdings gibt es einige phänotypische und molekulare Charakteristika, deren gleichzeitiges Vorkommen in einer Zelle das Vorliegen zellulärer Seneszenz sehr wahrscheinlich machen (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

In der Zellkultur zeigen senescente Zellen eine ausgeprägte Größenzunahme mit Abflachung. Auch die Zellkerne stellen sich massiv vergrößert dar und es kann zur Bildung von Mikronuklei kommen. Außerdem nimmt im Verlauf der Seneszenzinduktion die lysosomale Masse zu, was mit vermehrter Aktivität der lysosomalen β -Galactosidase einhergeht, die aus diesem Grund auch als Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase (SA- β -Gal) bezeichnet wird (Carnero, 2013; Pawlikowski et al., 2013). Im Rahmen des Seneszenzprogramms können auch Veränderungen in der Chromatinstruktur als sogenannte Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) beobachtet werden. Durch eine Zunahme der Histonmethylierung kommt es zur Rekrutierung heterochromatinbildender Proteine, was schließlich die Expression von E2F-Zielgenen, die hauptsächlich für die Zellzyklusprogression verantwortlich sind, verhindert (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Die phosphorylierte Form des Histons H2AX (γ H2AX) kann insbesondere in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen detektiert werden und stellt

somit ebenfalls ein Kennzeichen zellulärer Seneszenz dar (Carnero, 2013). Auch eine dauerhaft vermehrte Expression der an der Seneszenzinduktion beteiligten CDK-Inhibitoren p21 und/oder p16 kann typischerweise beobachtet werden. Seneszente Zellen zeichnen sich außerdem durch eine massive Sekretion von Proteinen, u.a. von Zytokinen und Chemokinen, aus. Dieser Vorgang wird in seiner Gesamtheit als Seneszenz-assoziiierter-sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet (zum SASP siehe Kapitel 1.3) (Pawlikowski et al., 2013).

Eine einfache und vielfach angewandte Methode für den Nachweis zellulärer Seneszenz ist die histochemische Färbung von Zellen mit erhöhter SA- β -Gal-Aktivität mittels eines chromogenen Substrates. Dieses Verfahren erlaubt die Identifizierung seneszenter Zellen sowohl in der Zellkultur als auch direkt in Schnitten aus Gewebeproben (Dimri et al., 1995). Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit einer dauerhaften Fixierung der zu untersuchenden Zellen. Allerdings ist es mit einem modifizierten Protokoll auch möglich, die SA- β -Gal-Aktivität lebender Zellen ohne Fixierung zu analysieren. Bei diesem Verfahren wird das Substrat C₁₂-FDG genutzt, das durch die SA- β -Gal zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt wird und der dann mittels eines Durchflusszytometers detektiert werden kann (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Diese Methode erlaubt eine quantitative Bestimmung lebender seneszenter Zellen, jedoch müssen hierfür die Zellen aus dem Zell- oder Gewebeverbund isoliert werden.

Seneszente Zellen im lebenden Organismus zu identifizieren, stellt eine größere Herausforderung dar. Im Mausmodell konnte die Akkumulation seneszenter Zellen beispielsweise nach Gabe von Chemotherapeutika oder Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Es wurden Mäuse generiert, bei denen ein Luciferasekonstrukt unter der Kontrolle des p16-Promotors steht, sodass die Identifizierung seneszenter Zellen über die Messung der Biolumineszenz ermöglicht wurde (Chang et al., 2016; Demaria et al., 2017). Nachteilig ist hier jedoch, dass nur p16-positive seneszente Zellen markiert werden und Zellen, in denen Seneszenz über p21 induziert wurde, nicht gefunden werden. Auch besteht die Möglichkeit falsch positiver Ereignisse, also Zellen, die zwar eine verstärkte p16-Expression aufweisen, aber nicht seneszent sind. Bisher gibt es keine Möglichkeit, über bildgebende Verfahren Ansammlungen seneszenter Zellen im Menschen darzustellen; hier bedarf es weiterer Forschung (Kirkland and Tchkonja, 2017).

1.3 Funktion seneszenter Zellen im Organismus - Seneszenz als protektiver und tumorfördernder Mechanismus

Seneszente Zellen besitzen im Organismus kontextabhängige, teilweise konträre Funktionen; einerseits ist ihr Auftreten physiologisch und für die korrekte Entwicklung erforderlich, andererseits sind sie an pathologischen Vorgängen beteiligt und spielen eine

Rolle in der Entwicklung altersassoziierter und onkologischer Erkrankungen (Childs et al., 2015). Zum besseren Verständnis muss zunächst zwischen den Begriffen der akuten Seneszenz und der chronischen Seneszenz unterschieden werden.

Akut seneszente Zellen sind nur vorübergehend im Körper vorhanden und erfüllen wichtige Funktionen in der Embryogenese, Wundheilung und Tumorsuppression. Sie sind beispielsweise an der Entstehung des Innenohres und der Nieren beteiligt (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Auch Wundheilungsprozesse und die Entwicklung von Leberzirrhose werden durch akut seneszente Zellen positiv beeinflusst, da sie das Ausmaß der Fibrosebildung limitieren können (Jun and Lau, 2010). Darüber hinaus stellt akute Seneszenz, ebenso wie Apoptose, einen entscheidenden tumorsuppressiven Mechanismus dar, da sie die maligne Transformation von Zellen verhindern kann, die durch irreparable DNA-Schädigung oder Aktivierung eines Protoonkogens induziert wird (Sun et al., 2018). Die Anwesenheit akut seneszenten Zellen im Organismus ist zeitlich begrenzt, da sie nach ihrer Entstehung durch ein intaktes Immunsystem eliminiert werden können (Pawlikowski et al., 2013; Sieben et al., 2018).

Demgegenüber stehen chronisch seneszente Zellen, die im Organismus persistieren. Aufgrund einer mit zunehmendem Alter beeinträchtigten Immunantwort oder aufgrund eines anderweitig geschwächten Immunsystems können seneszente Zellen nicht mehr eliminiert werden und es kommt zu deren Akkumulation. Es ist auch möglich, dass beispielsweise im Rahmen einer Chemotherapie vermehrt seneszente Zellen anfallen und so die Kapazität des Immunsystems überschritten wird (Childs et al., 2015; Short et al., 2019). Seneszente Zellen, die der Immunüberwachung entkommen sind und im Körper persistieren, können ein breites Spektrum an pathologischen und tumorigenen Effekten ausüben (Sun et al., 2018). Unter anderem sind sie an der Entstehung altersassoziierter Erkrankungen, wie beispielsweise Arthrose, Katarakt oder Typ-2-Diabetes beteiligt (Baker et al., 2011; Guo et al., 2011; Martin et al., 2004).

Mitverantwortlich für die divergierenden Effekte akuter und chronischer seneszenten Zellen sind ihre unterschiedlichen Expressionsprofile und die daraus resultierende unterschiedliche Proteinsekretion (Gonzalez-Meljem et al., 2018). Der sogenannte Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP) befähigt seneszente Zellen, eine Vielzahl von löslichen und unlöslichen Faktoren (unter anderem Chemokine, Interleukine und Wachstumsfaktoren) zu sezernieren und dadurch autokrine, parakrine und juxtakrine Einflüsse auszuüben (Pawlikowski et al., 2013). Die komplexe Zusammensetzung des SASP ist abhängig vom Zelltyp, der Seneszenzform und von der Seneszenzdauer, jedoch gibt es einige Faktoren, die fast immer Bestandteil des SASP sind, wie z.B. IL-6, IL-8, TNF α und Matrix-Metalloproteasen (Gonzalez-Meljem et al., 2018). Einige Faktoren des SASP von chronisch seneszenten Zellen können Seneszenz in benachbarten Zellen induzieren

sowie autokrin den eigenen seneszenten Status verstärken (Schosserer et al., 2017). Durch den SASP üben chronisch seneszente Zellen auch pro-tumorigene Effekte aus, wie die Förderung von Angiogenese und Tumorzellproliferation (Sieben et al., 2018). Beispielsweise können manche SASP-Faktoren die epithelial-mesenchymale Transition fördern, was einen entscheidenden Schritt in der neoplastischen Transformation und in der Entstehung von Metastasen darstellt (Sun et al., 2018; Tchkonja et al., 2013). Durch den SASP nehmen seneszente Zellen auch Einfluss auf das Immunsystem. Chronisch seneszente Zellen können durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine eine persistierende Inflammationsreaktion und eine damit verbundene Gewebedysfunktion hervorrufen (Sun et al., 2018). Chronische Inflammation ist mit maligner Transformation und Tumorbildung assoziiert (Multhoff et al., 2012), sodass Seneszenz auch auf diesem Wege Tumorbildung fördern kann.

Es ist hervorzuheben, dass die Entstehung seneszenten Zellen auch im Rahmen von tumorsuppressiven Therapien auftreten kann (Therapie-induzierte Seneszenz). Chemotherapeutika und Bestrahlung induzieren nämlich nicht nur die primär gewünschte Apoptose, sondern auch Seneszenz in einigen Zellen des Tumorgewebes. Hierbei kann Seneszenz sowohl in den Tumorzellen selbst, aber auch in den benachbarten, sogenannten Tumor-assoziierten Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, induziert werden (Short et al., 2019; Sieben et al., 2018). In Ko-Kulturen mit Radio- oder Chemotherapie-induzierten seneszenten Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass sie Wachstum und Proliferation sowohl von benignen, als auch von malignen Zellen fördern können. Auch im Mausmodell konnte durch Injektion seneszenten Fibroblasten die Tumorbildung gefördert werden (Gonzalez-Meljem et al., 2018). Seneszente Zellen können durch diese massiven parakrinen Einflüsse auch für viele unerwünschte Nebenwirkungen, die im Rahmen von onkologischen Behandlungen auftreten, verantwortlich gemacht werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die postradiogene Fibrosebildung in der Lunge durch Bestrahlungs-induzierte seneszente Fibroblasten bedingt ist (Nguyen et al., 2018). Auch die Entstehung der oralen Mucositis (eine häufige und äußerst unangenehme Nebenwirkung nach Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren) ist mit Seneszenzinduktion assoziiert (Iglesias-Bartolome et al., 2012). Ebenso können einige unerwünschte Wirkungen von Chemotherapeutika durch Seneszenzinduktion in zuvor gesundem Gewebe bedingt sein (siehe auch Kapitel 1.4) (Demaria et al., 2017).

Während die initiale Seneszenzinduktion durch eine Radio- oder Chemotherapie also zunächst zur Inhibition des Tumorwachstums führt, tragen persistierende seneszente Zellen über Sezernierung von SASP-Faktoren langfristig zur Tumorzellproliferation und Metastasierung bei (Short et al., 2019). Durch die Anwesenheit seneszenten Zellen können außerdem einige Therapienebenwirkungen und sogar die Entstehung von Rezidiven

bedingt sein (Myrianthopoulos et al., 2019). Demnach stellen insbesondere Therapie-induzierte seneszente Zellen durch ihr pro-tumorigenes Mikromilieu einen interessanten Angriffspunkt in der Behandlung onkologischer Erkrankungen dar.

1.4 Depletion seneszenter Zellen als Therapiemöglichkeit in der Onkologie

Durch das gezielte Entfernen seneszenter Zellen können ihre tumorigenen und immunmodulierenden Einflüsse eingedämmt werden und daher sowohl das Tumorwachstum als auch der Therapieverlauf positiv beeinflusst werden. Da Seneszenz einen irreversiblen und permanenten Zellzyklusarrest darstellt und sie, wie Apoptose, ein terminales Zellschicksal ist, bleibt zu klären, inwiefern seneszente Zellen überhaupt in den Zelltod gebracht werden können und ob es Angriffspunkte gibt, die eine selektive Elimination dieser Zellen erlauben, ohne proliferierende Zellen des Organismus anzugreifen.

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass mit einer gezielten Eliminierung p16-positiver Zellen eine deutliche Besserung einiger altersassoziierter Erkrankungen einhergeht. Dies wurde ermöglicht, indem transgene Mäuse entwickelt wurden, bei denen eine aktivierbare Caspase 8 unter der Kontrolle des p16-Promotors ins Genom integriert wurde. Die Caspase-8-Aktivierung erfolgte durch Zugabe der Substanz AP20187, sodass ausschließlich in den Zellen Apoptose induziert werden konnte, die verstärkt p16 exprimierten (Baker et al., 2011). In einem weiteren Mausmodell, das durch genetische Modifikation eine gleichzeitige Lokalisierung und gezielte Eliminierung p16-positiver Zellen erlaubte, wurden die Auswirkungen einer Chemotherapie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Chemotherapie in zuvor gesundem Gewebe seneszente Zellen entstehen. Die resultierenden Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums, wie Myelosuppression oder kardiale Dysfunktion, konnten durch Depletion der seneszenten Zellen deutlich gebessert werden (Demaria et al., 2017, 2014).

Für die Anwendung im Menschen sind jedoch alternative Methoden zur gezielten Eliminierung seneszenter Zellen nötig, die keine genetische Veränderung des Organismus erfordern. Baar et al. entwickelten eine Methode, die es ermöglichte, in genetisch nicht veränderten Mäusen gezielt Chemotherapie-induzierte seneszente Zellen zu eliminieren (Baar et al., 2017). Sie konnten zeigen, dass die Interaktion von *Forkhead box protein O4* (FOXO4) mit p53 benötigt wird, um den seneszenten Status aufrecht zu erhalten und die Viabilität seneszenter Zellen zu sichern. Sie entwickelten ein synthetisches Derivat von FOXO4 (FOXO4-D-retro-inverso/ FOXO4-DRI), das nicht die physiologische Funktion von FOXO4 ausüben, aber p53 weitaus stärker binden und so die Interaktion von p53 und FOXO4 verhindern kann (Serrano, 2017). Durch Injektion von FOXO4-DRI konnten unter anderem der durch Chemotherapeutika bedingte Gewichtsverlust und die beeinträchtigte

Leberfunktion gebessert werden (Baar et al., 2017). Dieser vielversprechende Ansatz zeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, seneszente Zellen auch pharmakologisch zu eliminieren. Nachteilig ist jedoch, dass es sich bei FOXO4-DRI um ein Peptid handelt. Peptide weisen im Körper eine erhöhte proteolytische Instabilität auf, können aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften biologische Barrieren schlecht passieren und werden renal sehr schnell ausgeschieden. Außerdem besitzen sie eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, da sie im Verdauungstrakt schnell abgebaut werden und deshalb eine parenterale Verabreichungsform erfordern (Otvos and Wade, 2014).

Es stellt sich nun die Frage, ob es andere geeignete niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) gibt, die eine bessere klinische Anwendbarkeit besitzen und gezielt die pharmakologische Eliminierung seneszenten Zellen ermöglichen. Vor diesem Hintergrund führten Zhu et al. die Definition einer neuen Substanzklasse, der sogenannten Senolytika, ein (Zhu et al., 2015). Hierbei handelt es sich um Substanzen, die gezielt Zelltod in seneszenten Zellen induzieren können, während proliferierende Zellen weitestgehend unberührt bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass in seneszenten Zellen bestimmte Signalwege verstärkt aktiviert sind, die für ihre Apoptoseresistenz verantwortlich sind. Im Gegensatz zu proliferierenden Zellen benötigen seneszente Zellen diese Signalwege, um ihr Überleben zu sichern (Wang, 1995; Zhu et al., 2015). Über die Analyse von Protein- und RNA-Expressionsprofilen seneszenten Zellen konnten manche dieser anti-apoptischen Signalwege identifiziert werden und wurden als *Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways* (SCAPS) bezeichnet. Unter anderem zählen hierzu *B-cell lymphoma-2-* (Bcl-2-) Familienproteine, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), AKT, p53, p21 und *Heat Shock Protein 90* (Hsp90). Interessanterweise führte das gezielte Ausschalten ihrer Expression mittels siRNAs zum selektiven Tod seneszenten Zellen (Kirkland et al., 2017).

Proteine dieser anti-apoptischen Signalwege stellen also einen möglichen Angriffspunkt potentieller Senolytika dar. Die ersten als Vertreter der Senolytika identifizierten Substanzen waren der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib und das natürlich vorkommende Flavonol Quercetin. Beide Substanzen verursachten *in vitro* sowohl in Präadipozyten als auch in *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) selektiven Zelltod seneszenten Zellen, während die Zahl entsprechender proliferierender Zellen nicht reduziert wurde (Zhu et al., 2015). Generell ist es demnach möglich, *in vitro* gezielt seneszente Zellen pharmakologisch zu eliminieren. Aber auch *in vivo* konnte das senolytische Potential beider Substanzen bestätigt werden: beide Stoffe führten zu einer Reduzierung der p16-Expression und einer Abnahme der SA- β -Gal-positiven Zellen in Gewebeschnitten von Mäusen nachdem diese drei Monate zuvor mit 10 Gy einer ionisierenden Strahlung behandelt wurden. Als Langzeitfolge stellten sich unter anderem eine Verbesserung der kardialen Ejektionsfraktion und der postradiogenen Muskelfunktion ein (Zhu et al., 2015).

Als Inhibitor der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine erwies sich später auch ABT-263 (Navitoclax) als senolytisch und fügte sich somit als Kandidat in die Theorie der SCAPs ein (Zhu et al., 2016). Allerdings konnte der selektivere Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) den starken senolytischen Effekt von Navitoclax nicht nachbilden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in den unterschiedlich breiten Wirkspektren von Navitoclax und Venetoclax liegen. Denkbar wäre, dass Senolytika ein breiteres Spektrum anti-apoptotischer Effektoren inhibieren müssen, um in seneszenten Zellen Zelltod induzieren zu können (He and Sharpless, 2017).

Die senolytische Aktivität der meisten bisher identifizierten Senolytika wurde allerdings nur in nicht-malignen Zellen (insbesondere mit Fokus auf altersassoziierte Erkrankungen) evaluiert (Niedernhofer and Robbins, 2018). Da Seneszenz jedoch auch in den Tumorzellen selbst, als Folge einer Radio- oder Chemotherapie, induziert werden kann und dies unter anderem als Ursache für ein schlechtes Therapieansprechen und für Rezidive identifiziert werden konnte (Sieben et al., 2018), ist die Suche nach Substanzen sinnvoll, die insbesondere in malignen Zelllinien senolytisch wirken. Die bisher einzige beschriebene Substanz, die in Tumorzellen getestet wurde und sich als senolytisch erwies, ist der Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat (Kim and Kim, 2019; Niedernhofer and Robbins, 2018; Samaraweera et al., 2017). In verschiedenen Kopf-Hals-Tumor- und Lungen-Karzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Panobinostat im Anschluss an eine Behandlung mit Cisplatin oder einem Taxan effektiv die Therapie-induzierten seneszenten Tumorzellen abtöten konnte. Insgesamt zeigte dieser Ansatz sogar eine bessere Eliminierung der verbliebenen Tumorzellen als eine zweite Chemotherapeutika-Gabe (Samaraweera et al., 2017).

Die gezielte Elimination seneszenten Zellen birgt somit ein vielversprechendes Potential sowohl in der Therapie altersassoziiertes als auch onkologischer Erkrankungen. Insbesondere im Hinblick auf die Onkologie kann die Anwesenheit seneszenten Zellen unter anderem die Tumorpheriferation und Metastasierung fördern (Schosserer et al., 2017). Im Rahmen der onkologischen Behandlung bedingen seneszenten Zellen ein schlechtes Therapieansprechen, Nebenwirkungen und die Entstehung von Rezidiven (Demaria et al., 2017; Myrianthopoulos et al., 2019). Zurzeit gibt es aber nur sehr wenige Substanzen, die im Menschen einsetzbar sind und das Potential besitzen, gezielt seneszenten (Tumor-) Zellen abzutöten.

1.5 Ziel der Arbeit

Schon oft dienten Stoffe, die aus Pflanzen, Pilzen oder anderen natürlich vorkommenden Quellen isoliert werden konnten, als Vorbild bei der Suche nach neuen pharmakologisch einsetzbaren Substanzen. So zeigte z.B. die aus einem marinen Schwamm isolierte Vorläufersubstanz Halichondrin B eine starke zytotoxische Aktivität gegen maligne entartete Zellen. Das synthetische Derivat Eribulin erwies sich später in zahlreichen klinischen Studien als sehr wirksam. 2011 erhielt es schließlich die Zulassung in Europa für das metastasierte Mammakarzinom (Shetty and Gupta, 2014) und stellt somit eins von vielen erfolgreichen Beispielen einer Chemotherapeutika-Entwicklung aus einem Naturstoff dar.

Vor diesem Hintergrund entstand die Idee, eine Auswahl von Naturstoffen dahingehend zu untersuchen, ob sie potentielle neue Vertreter der Substanzklasse der Senolytika darstellen könnten. Das Ziel dieser Arbeit war es, Stoffe zu identifizieren, die sich in der Zellkultur durch senolytische Aktivität in Tumorzelllinien auszeichnen und ihre Wirkweise genauer zu charakterisieren. Als Testsubstanzen dienten insgesamt 180 marine Naturstoffe (unter anderem aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba*), die freundlicherweise durch Herrn Professor Proksch (Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden. Um das senolytische Potential der Naturstoffe zu evaluieren, wurden zwei gut charakterisierte humane Tumorzelllinien verwendet: HCT116 (Kolonkarzinomzellen) und MCF-7 (Mammakarzinomzellen). Beide Zelllinien zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Wildtyp-Form von p53 besitzen und nach einem DNA-Schädigungs-induzierenden Stimulus Seneszenz einleiten können (Chakradeo et al., 2016; Jones et al., 2005; Sohn et al., 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den beiden verwendeten Zelllinien die Seneszenz durch hochenergetische ionisierende Röntgenstrahlung induziert, welche die DNA insbesondere durch das Erzeugen von Doppelstrangbrüchen schädigt. Die senolytische Wirkung von potentiellen Kandidaten, die im Screening der Naturstoffbibliothek identifiziert wurden, sollte mittels weiterer Methoden verifiziert und gegebenenfalls eine molekulare Analyse der beteiligten Proteine angestrebt werden.

Die Rolle seneszenten Tumorzellen und Tumor-assoziiertes Zellen für die Entstehung und Aufrechterhaltung onkologischer Erkrankungen hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Ziel dieses Forschungsprojektes, also die Identifizierung neuer Substanzen zur gezielten Depletion seneszenten Zellen im Rahmen von Tumorerkrankungen, ist ein vergleichsweise neuer, aber vielversprechender therapeutischer Ansatz. Langfristig gesehen könnte der breite Einsatz von Senolytika eine weitere Säule in der Anti-Tumor-Therapie bilden, wozu auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ihren Beitrag leisten sollen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen, Antikörper, Chemikalien, Puffer und Lösungen

Name	Zellart	Bezugsquelle	Medium
HCT116	humane Kolonkarzinomzellen	B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA	McCoy's 5a (siehe Tabelle 6)
MCF-7	humane Mammakarzinomzellen	ATCC (Jänicke et al., 1998)	RPMI (siehe Tabelle 6)

Tabelle 1: Tumorzelllinien

Methode	Zelllinie	Art der Stimulation und Messezeitpunkt	Format	Zellzahl pro Well
Färbung der β - Galactosidase- Aktivität	HCT116	Tag 2, 6, 9 nach Bestrahlung	6-Well	$1,5 \cdot 10^5$
		Tag 2, 6 proliferierend		$1 \cdot 10^4$
		Tag 1 proliferierend		$2 \cdot 10^5$
Kristallviolett- Zytotoxizitätstest	HCT116	Tag 8 nach Bestrahlung	96-Well	$1 \cdot 10^4$
	MCF-7	Tag 2 proliferierend		$3 \cdot 10^4$
	MCF-7	Tag 8 nach Bestrahlung	96-Well	$1 \cdot 10^4$
		Tag 2 proliferierend		$2,5 \cdot 10^4$
Messung der PI- Aufnahme	HCT116	Tag 8 nach Bestrahlung	12-Well	$5 \cdot 10^4$
	MCF-7	Tag 2 proliferierend		$5 \cdot 10^4$
	MCF-7	Tag 8 nach Bestrahlung	12-Well	$5 \cdot 10^4$
		Tag 2 proliferierend		$5 \cdot 10^4$
LDH- Zytotoxizitätstest	HCT116	Tag 8 nach Bestrahlung	96-Well	$8 \cdot 10^3$
	MCF-7	Tag 2 proliferierend		$2,5 \cdot 10^4$
	MCF-7	Tag 8 nach Bestrahlung	96-Well	$8 \cdot 10^3$
		Tag 2 proliferierend		$2,5 \cdot 10^4$
Western Blot	HCT116	Tag 8 nach Bestrahlung	6cm Schale	$6 \cdot 10^5$
	MCF-7	Tag 2 proliferierend		$1 \cdot 10^6$
	MCF-7	Tag 8 nach Bestrahlung	6cm Schale	$6 \cdot 10^5$
		Tag 2 proliferierend		$1 \cdot 10^6$

Tabelle 2: Zellzahlen

Antigen	Klon	Spezies, Subtyp	Bezugsquelle	Konzentration
p21 ^{WAF1/CIP1}	SX118	Maus, IgG1 kappa	BD Pharmingen	1:1.000
p53 (Ab-6)	DO-1	Maus, IgG2a	Calbiochem	1:1.000
Akt	-	Kaninchen, polyklonal	Cell signalling	1:1.000
Phospho-Akt (Ser 473)	D9E	Kaninchen, IgG	Cell signalling	1:2.000
β -Actin	AC-74	Maus, IgG2a	Sigma-Aldrich /Merck	1:10.000

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Bezugsquelle	Konzentration
IRDye 680 RD	Ziege	Maus IgG (H+L)	Li-Cor	1:30.000
IRDye 800 CW	Ziege	Maus IgG (H+L)	Li-Cor	1:15.000
IRDye 800 CW	Ziege	Kaninchen IgG (H+L)	Li-Cor	1:15.000

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Verwendung	Bezeichnung	Bezugsquelle
Färbungen	Kristallviolett	Merck
	Propidiumiodid	Sigma-Aldrich/ Merck
Inhibitoren	X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	AppliChem
	Wortmannin	LC Laboratories
	PX-866	LC Laboratories
	NVP-BEZ235	LC Laboratories
	Alpelisib	LC Laboratories
	Quercetin	AdooQ Bioscience
	Dasatinib	LC Laboratories
	MK2206	Selleckchem
	Sar405	Selleckchem
	Torin2	Sigma-Aldrich /Merck
	3-MA (3-Methyladenin)	Sigma-Aldrich /Merck
	Rapamycin	LC Laboratories
Naturstoffe	180 marine Naturstoffe, u.a. aus <i>Aeropylsina aerophoba</i> (s. Anhang)	Prof. Dr. P. Proksch, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Universität Düsseldorf
Bradford Reagenz	Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio Rad
Proteingrößenstandard	PageRuler Prestained Proteinladder	ThermoFisher
LDH-Zytotoxizitäts-test	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche

Tabelle 5: Chemikalien

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
McCoy's 5a (ThermoFisher, Gibco) mit GlutaMAX	10% <i>fetal calf serum</i> / FCS, hitzeinaktiviert (Biochrom/ Merck) 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (Millipore/ Merck)
RPMI (ThermoFisher, Gibco) mit L-Glutamin	10% FCS, hitzeinaktiviert (Biochrom / Merck) 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin (Millipore/ Merck)
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> / DPBS (Thermo Fisher)	2,67 mM Kaliumchlorid 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat 137,93 mM Natriumchlorid 8,06 mM Dinatriumhydrogenphosphat
Fixier-Puffer	0,2% Glutaraldehyd 2% Formaldehyd PBS
X-Gal-Färbelösung	40 mM Zitronensäure/ Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 6,0) 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II) (Kaliumferrocyanid) 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III) (Kaliumferricyanid) 150 mM Natriumchlorid 2 mM Magnesiumchlorid 1 mg/ml X-Gal
Kristallviolett- Fixierlösung	0,5% Kristallviolett 20% Methanol
NP40-Lysepuffer	50mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 7,4) 150 mM Natriumchlorid 1% Octylphenoxy-poly(ethylenoxy)ethanol (IGEPAL CA 630) / NP40 1mM Natriumpyrophosphat 1mM Natriumorthovanadat 0,146mM Pepstatin 0,015 mM Aprotinin 0,234 mM Leupeptin 1mM PMSF 1mM DTT
SDS-Probenpuffer	0,0625 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 2% Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> / SDS) 3% β-Mercaptoethanol 10% Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau
SDS-Gelelektrophorese- Puffer	25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 192 mM Glycin 3,5 mM SDS
Polyacrylamidgel (Trenngel)	12,5% Acrylamid-Bisacrylamid 0,1% SDS 375 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ HCl pH 6,8 0,075% Ammoniumperoxodisulfat 0,05% Tetramethylethylenediamin

Polyacrylamidgel (Sammelgel)	3,75% Acrylamid-Bisacrylamid 0,1% SDS 125 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ HCl pH 6,8 0,075% Ammoniumperoxodisulfat 0,075% Tetramethylethylendiamin
Blockierungslösung	0,2% Polysorbat 20 (Tween 20) in PBS 4% entfettetes Milchpulver
Erstantikörperlösung	0,2% Polysorbat 20 (Tween 20) in PBS 5% Bovines-Serum-Albumin 0,1% Natriumazid Erstantikörper (siehe Tabelle 3 Primäre Antikörper)
Zweitantikörperlösung	0,02% SDS 0,2% Polysorbat 20 (Tween 20) PBS Zweitantikörper (siehe Tabelle 4 Sekundäre Antikörper)

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

2.1.2 Geräte und Software

Gerät	Modell/Bezeichnung	Hersteller
Bestrahlungsgerät	Gulmay Medical RS225	XStrahl
Durchflusszytometer	BD LSR Fortessa	BD Biosciences
Zentrifugen	HERAEUS Multifuge 3SR plus Rotor 75006445 (r=19,2 cm)	Thermo Scientific
	Centrifuge 5417 R Rotor F-45-30-11 (r=9,5 cm)	Eppendorf
Mikroskope	Axio Observer A1, AxioCam	Zeiss
	Axiovert 25	Zeiss
Inkubationsschrank	Hera Cell 240	Thermo Scientific
Mikroplattenleser	Infinite M200	Tecan
Floureszenz-Scanner	Odyssey Classic	Li-Cor

Tabelle 7: Geräte

Verwendung	Software	Version
Mikroskopische Bilder	AxioVision	4.9.1
Mikroplattenleser	i-control	1.5
Western Blot-Scans	Li-Cor Odyssey Application Software	3.0
FACS Messung	BD FACSDiva Software	6.2
FACS Auswertung	Flowing Software	2.5.1
Versuchsauswertungen	Microsoft Excel	2016
Erstellung von Grafiken	Inkscape	0.92.2
Bildbearbeitung	GNU Image Manipulation Program	2.10.8

Tabelle 8: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion von Seneszenz in HCT116- und MCF-7 Zellen und allgemeine Vorbereitung der Zellen

Die Zellen (Tabelle 1) wurden für die nachfolgenden Methoden überwiegend nach dem gleichen Schema vorbereitet (siehe Abb. 2). Grundsätzlich sollten jeweils proliferierende mit seneszenten Zellen verglichen werden, da nach Naturstoffen bzw. Substanzen gesucht wurde, die spezifisch nur seneszente Zellen abtöten. Adhärent wachsende HCT116 oder MCF-7-Zellen wurden ausgesät und am darauffolgenden Tag zur Seneszenzinduktion mit hochenergetischer ionisierender Röntgenstrahlung bestrahlt (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Verwendet wurde eine Dosis von 10 Gy (Gulmay Medical RS225; 150 kV; 15 mA; 0,2 mm Kupfer-Filter). Um eine gleichmäßige Dosisverteilung im Bestrahlungsfeld zu erhalten, wurden maximal zwei Zellkulturplatten gleichzeitig bestrahlt. Unmittelbar vor jeder Bestrahlung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für eine Woche im Zellinkubator (bei 37°C, 5% CO₂) gelagert, um den seneszenten Status auszubilden. An Tag 6 nach Bestrahlung wurden proliferierende HCT116- bzw. MCF-7-Zellen ausgesät. Eine gleichzeitige Aussaat mit den seneszenten Zellen war aufgrund der hierfür erforderlichen niedrigen Zellzahlen nicht möglich. Am darauffolgenden Tag (also Tag 7 nach Bestrahlung) wurden die seneszenten und proliferierenden Zellen mit den zu testenden Substanzen für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Um die zytotoxische Wirkung der Substanzen ermitteln zu können, wurden Kontrollzellen benötigt, die keine Behandlung mit den Substanzen erfahren haben. Deshalb werden diese Kontrollzellen im Folgenden als „**unbehandelt**“ bezeichnet (siehe Tabelle 9). Seneszente Kontrollzellen wurden zur Seneszenzinduktion bestrahlt, darüber hinaus haben sie jedoch keine Behandlung erfahren (=seneszent **unbehandelt**). Proliferierende Kontrollzellen wurden nur ausgesät und nicht weiter behandelt (=proliferierend **unbehandelt**).

	seneszent	proliferierend
Keine Behandlung mit Naturstoffen	seneszent unbehandelt	proliferierend unbehandelt
Behandlung mit Naturstoffen	seneszent behandelt	proliferierend behandelt

Tabelle 9: Begriffsdefinitionen behandelter und unbehandelter Zellen

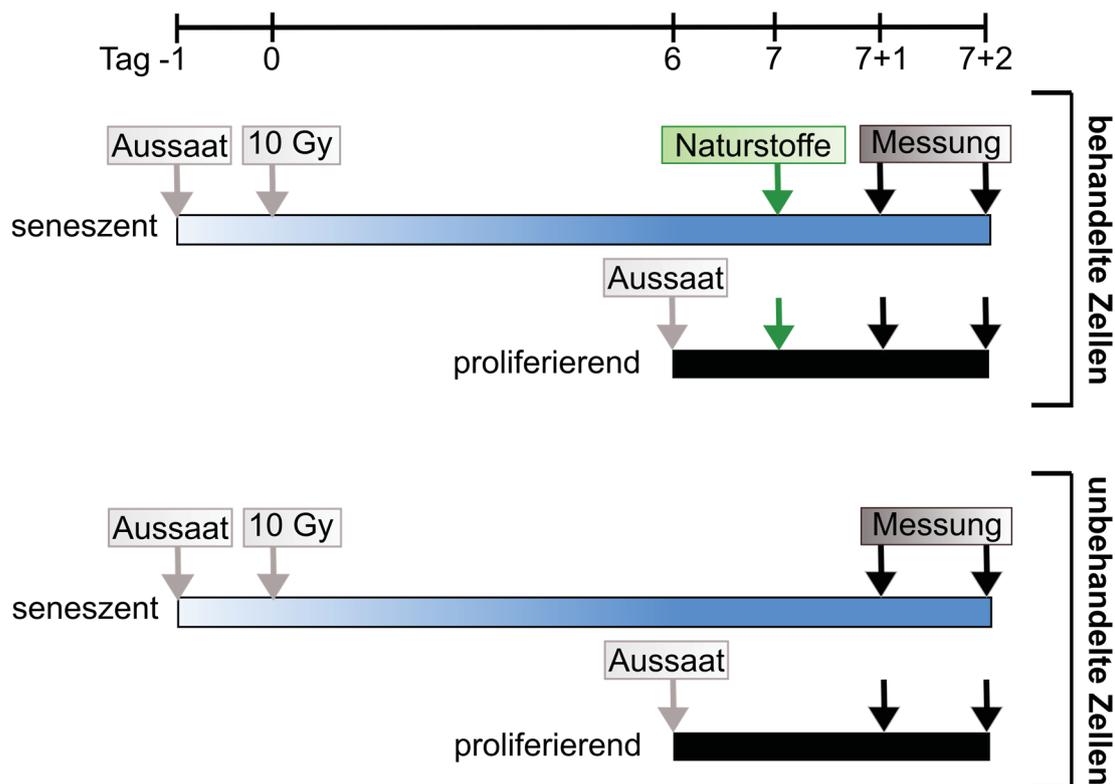


Abb. 2: Vorbereitung seneszenten und proliferierender HCT116- und MCF-7-Zellen. Zur Seneszenzinduktion wurden die Zellen (blauer Balken) ausgesät, am darauffolgenden Tag mit 10 Gy ionisierender Röntgenstrahlung bestrahlt und dann eine Woche im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Proliferierende Zellen (schwarzer Balken) wurden erst an Tag 6 nach Bestrahlung ausgesät. An Tag 7 nach Bestrahlung wurden seneszenzente und proliferierende Zellen mit den Naturstoffen behandelt (=behandelte Zellen) oder bekamen nur einen Mediumwechsel (=unbehandelte Zellen).

2.2.2 Kolorimetrische Färbung der β -Galactosidase-Aktivität

Überprüft und visualisiert wurde die Seneszenzinduktion mittels Anfärbung der SA- β -Gal-Aktivität. Bei der Etablierung des seneszenten Status durchlaufen die Zellen eine Reihe an Veränderungen, unter anderem die Zunahme ihrer lysosomalen Masse mit darin enthaltenen lysosomalen Enzymen und dementsprechend auch der SA- β -Gal. Ihre Aktivität kann stellvertretend durch die Verwendung eines chromogenen Substrates sichtbar gemacht werden und erlaubt so eine Differenzierung von seneszenten und nicht-seneszenten Zellen (Dimri et al., 1995).

Die Zellen wurden im 6-Well-Format ausgesät und am nächsten Tag nach dem Anwachsen mit ionisierender Strahlung oder Camptothecin behandelt (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Die Kontrollzellen wurden nicht behandelt. Am gewünschten Messzeitpunkt wurden die Überstände verworfen, die adhärenz Zellen mit PBS gewaschen und dann mit je 750 μ l des Fixier-Puffers (siehe Tabelle 6) für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS und anschließend die Zugabe von 750 μ l der X-Gal-Färbelösung (siehe Tabelle 5 und 6). X-Gal stellt ein künstliches Substrat der β -

Galactosidase dar und wird durch Spaltung zu Galactose und einem unlöslichen blauen Farbstoff umgesetzt. Auch nicht-seneszente Zellen besitzen eine endogene β -Galactosidase-Aktivität mit einem pH-Optimum von 4,0. Für die Färbung wurde jedoch ein suboptimaler pH-Wert von 6,0 gewählt, da die Reaktionsgeschwindigkeit dadurch deutlich herabgesetzt wird. So zeigen seneszente Zellen aufgrund der höheren Aktivität ihrer SA- β -Gal auch bei diesem suboptimalen pH-Wert eine frühere Blaufärbung als nicht-seneszente Zellen. Die Färbung erfolgte über Nacht abgedunkelt bei 37°C und wurde am nächsten Tag durch Waschen mit PBS gestoppt (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Zur Auswertung erfolgte eine mikroskopische Fotodokumentation.

2.2.3 Kristallviolett-Zytotoxizitätstest

Zur gleichzeitigen Messung der Zytotoxizität einer größeren Anzahl von Stoffen in verschiedenen Dosisverdünnungsreihen wurde der Kristallviolett-Zytotoxizitätstest im 96-Well-Format verwendet. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass sich die Zellen im Rahmen des Zelltodes ablösen und durch Entfernen des Überstandes nur lebende, adhärenente Zellen verbleiben, die anschließend mit einer Färbelösung fixiert und gefärbt werden können. Kristallviolett färbt sowohl Proteine als auch DNA an und kann deshalb (über Messung der Lichtextinktion) einen Rückschluss auf die Menge der überlebenden Zellen geben (Feoktistova et al., 2016). Die Zellen wurden ausgesät und über den gewünschten Zeitraum mit Konzentrationsreihen der zu testenden Substanzen inkubiert (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände inklusive der abgelösten, toten Zellen entfernt und die verbliebenen, noch lebenden Zellen für 30 Minuten mit je 50 μ l (pro Vertiefung) der Kristallviolett-Methanol-Lösung (siehe Tabelle 6) bei Raumtemperatur fixiert und gefärbt. Nach 30 Minuten wurde die Färbung gestoppt, indem die Zellkulturplatte gründlich mit demineralisiertem Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet wurden. Um die Lichtextinktion der einzelnen Vertiefungen messen zu können, wurden die fixierten und gefärbten Zellen mit je 200 μ l (pro Vertiefung) 33-prozentiger Essigsäure gelöst (Jänicke et al., 1994). Der Lösevorgang fand bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (150/min) statt. Nach Abschluss des Lösevorgangs (nach circa 90 Minuten) wurde die Lichtextinktion in jeder Vertiefung bei einer eigentlich suboptimalen Wellenlänge von 515 nm mit dem Mikroplattenleser (siehe Tabelle 7) bestimmt. Bei dieser Wellenlänge ergaben Messungen in mehreren Testexperimenten mit verschiedenen Zellzahlen und Zelltypen verlässlich gute Extinktionswerte ohne Überschreitungen des Messbereiches (Daten nicht gezeigt). Für jede Bedingung wurden jeweils Doppelwerte angelegt und Mittelwerte gebildet. 100% Zellüberleben wurden definiert als die Absorptionswerte von **unbehandelten proliferierenden** bzw. **unbehandelten seneszenten** Zellen, die keine Naturstoffe erhalten haben. Als Maß für die

Zytotoxizität eines Stoffes diene der Quotient aus den Absorptionswerten behandelter und unbehandelter Zellen. Der auf diese Weise ermittelte Zahlenwert in Prozent steht näherungsweise für den Anteil überlebender Zellen und kann somit Aufschluss über die Zytotoxizität eines Stoffes geben.

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Extinktionswert proliferierende behandelte Zellen}}{\text{Extinktionswert proliferierende unbehandelte Zellen}} \times 100$$

bzw.

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Extinktionswert seneszente behandelte Zellen}}{\text{Extinktionswert seneszente unbehandelte Zellen}} \times 100$$

(Extinktionswert = Mittelwert aus doppelt angelegten Bedingungen)

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse zur Zelltodbestimmung mittels Propidiumiodid-Aufnahme

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluorochrom, welches sequenzunspezifisch, aber stöchiometrisch zwischen den Basen der DNA interkaliert. Im an DNA-gebundenen Zustand besitzt PI ein Anregungsmaximum bei 535 nm mit einer maximalen Fluoreszenzemission von 617 nm, sowie ein 20- bis 30-fach stärkeres Fluoreszenzsignal als im freien Zustand (Crowley et al., 2016). Darüber hinaus besitzt der Farbstoff die Eigenschaft, intakte Zellmembranen nicht passieren zu können, sodass PI nur dann in die DNA interkalieren kann, wenn die Integrität der Zellmembran (z.B. aufgrund von Zelltod) nicht mehr gegeben ist und diese permeabel wird. Dabei ist die Aufnahme von PI unabhängig vom zugrundeliegenden Zelltodmechanismus (Essmann et al., 2003). Durch Interkalation von PI kann demnach zwischen noch lebenden PI-negativen und toten PI-positiven Zellen differenziert werden. Mittels eines Durchflusszytometers (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, kurz: FACS) können sowohl die PI-Aufnahme als auch die Zellgröße und Granularität einzelner Zellen bestimmt werden. Der Anteil PI-positiver Zellen an der Gesamtheit der gemessenen Zellen ergibt ein quantitatives Maß für den Zelltod.

Die Zellen wurden im 12-Well Format ausgesät und wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben vorbereitet (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Die Messung der PI-Aufnahme erfolgte 24 oder 48 Stunden nach Zugabe der zu testenden Substanzen. Um den Zellstoffwechsel während des Messvorgangs möglichst gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte inklusive Zentrifugationen bei +4°C durchgeführt. Die Zellüberstände wurden zunächst in vorgekühlte FACS-Röhrchen überführt. Zur Ablösung der verbliebenen adhären Zellen dienten je

400 µl einer Trypsin-EDTA-Lösung (Inkubation bei 37 °C). Die Ablösung wurde nach 20 Minuten mit je 500 µl des zuvor abgenommen Überstandes gestoppt und die Zellen in das entsprechend zugehörige FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 483 x g für 5 Minuten (siehe Tabelle 7) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellpellets mit je 1ml PBS gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 483 x g (HERAEUS Multifuge 3SR plus, 1500 rpm) zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen wurden die Zellpellets in je 150 µl PI-Puffer (2,5 µg/ml PI in PBS) resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend am LSR Fortessa Durchflusszytometer (siehe Tabelle 7) analysiert. Pro Bedingung wurden 10.000 Zellen (*events*) mit einer Rate von 200-300 *events*/Sekunde gemessen. Es erfolgte die gleichzeitige Messung der PI-Emission (Anregung mittels eines 488-nm-Lasers) und der Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FSC) der einzelnen Zellen. Für FSC und das PI-Signal wurden Bereiche definiert, in denen eine gemessene Zelle als PI-positiv (und damit als tot) oder als PI-negativ (und damit als lebend) gilt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils PI-positiver Zellen liefert somit ein quantitatives Maß für den vorliegenden Zelltod (Crowley et al., 2016; Riccardi and Nicoletti, 2006). Die Bereiche für lebende und tote Zellen wurden mittels *Flowing Software* (siehe Tabelle 8) festgelegt und die prozentualen Anteile berechnet.

2.2.5 LDH-Zytotoxizitätstest

Diese Methode dient (wie die Messung der PI-Aufnahme) der Zelltodbestimmung und kann zur Evaluation der Zytotoxizität von Substanzen herangezogen werden. Die Methode basiert darauf, dass jede humane Zelle das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) exprimiert, wobei die Expression innerhalb einer Zelllinie typischerweise konstant ist. Beim Zelltod wird die intrazelluläre LDH freigesetzt und kann mittels Aktivitätsmessungen im Zellüberstand quantifiziert werden. Da zellfreies Nährmedium aufgrund des FCS-Anteils ebenfalls eine LDH-Aktivität aufweist, wurde diese Hintergrund-LDH-Aktivität ebenfalls gemessen und später von allen Extinktionswerten subtrahiert. Die Behandlung der Zellen mit einprozentiger Triton X-100 Lösung führt zu einer kompletten Lyse der Zellen und erfolgte zur Bestimmung der maximal in den Überstand freisetzbaren LDH-Aktivität.

Die Zellen wurden im 96-Well-Format ausgesät und wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben vorbereitet, wobei für jede Bedingung Doppelwerte angelegt wurden (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl des Überstandes in eine neue 96-Well-Platte überführt und bei +4°C gelagert, bis alle zu untersuchenden Proben gemeinsam gemessen werden konnten. LDH kann unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH+H⁺ Lactat zu Pyruvat oxidieren. Durch Zugabe von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und dem Enzym Diaphorase kann (unter Oxidation von NADH+H⁺ zu NAD⁺) das rote 1,3,5-Triphenylformazan gebildet werden. 1,3,5-

Triphenylformazan zeigt ein Absorptionsmaximum bei 495 nm, während 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in diesem Bereich keine Absorption aufweist (Abb. 3). Die mithilfe eines Mikroplattenlesers gemessene Lichtextinktion bei 490 nm ist somit direkt proportional zur LDH-Aktivität im jeweiligen Überstand (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

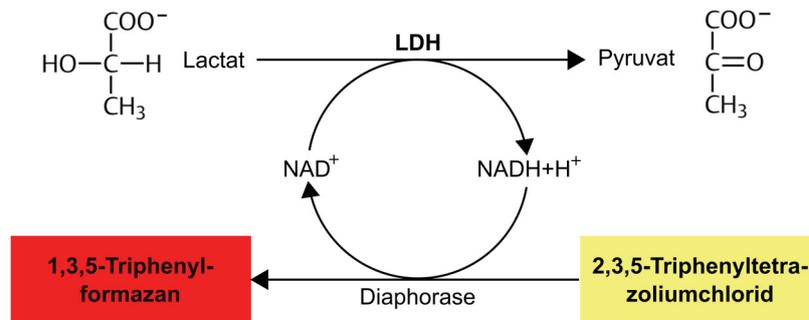


Abb. 3: Schematische Darstellung der LDH-Aktivitätsmessung (Erstellt nach Decker and Lohmann-Matthes, 1988) LDH=Lactatdehydrogenase

Für die Messung der LDH-Aktivität wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben verwendet (siehe Tabelle 5). Zur Ermittlung der LDH-Aktivität wurden die Extinktionswerte bei Raumtemperatur im Abstand von 3 Minuten über einen Zeitraum von bis zu 30 Minuten gemessen. Zur Berechnung eines Wertes für die Zytotoxizität eines Stoffes wurden zunächst die Doppelwerte gemittelt und die LDH-Aktivität im Nährmedium von diesen subtrahiert. Anschließend wurden die Extinktionswerte ins Verhältnis gesetzt zur maximal freisetzbaren LDH-Aktivität (ermittelt durch Triton X-100). Die so errechneten Werte in Prozent stellen näherungsweise ein Maß für den Zelltod und damit für die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen dar.

$$\% \text{ Zelltod} = \frac{\text{Extinktionswert der Bedingung} - \text{Extinktionswert Medium}}{\text{Extinktionswert Triton} - \text{Extinktionswert Medium}} \times 100$$

(Extinktionswert = Mittelwert aus doppelt angelegten Bedingungen)

2.2.6 Zellextrakt-Herstellung und Messung der Proteinmenge

Die Zellen wurden in 6 cm Zellkultur-Schalen ausgesät und wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben vorbereitet (für Zellzahlen siehe Tabelle 2). Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber geerntet und bei 5.000 x g (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, 7.000 rpm) für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Überstände verworfen, die Zellen mit je 1ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Absaugen wurden die Zellen (bei 4°C) weiterverarbeitet oder mit Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Zellyse wurden die Zellen in jeweils 120 µl NP40-Lysepuffer (siehe Tabelle 6) resuspendiert und

bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte bei 4°C die Zentrifugation für 30 Minuten bei 17.000 x g (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, 13.000 rpm), um unlösliche Zellbestandteile wie Membranen zu entfernen, die in weiteren Reaktionen oder Proteinkonzentrationsbestimmungen stören würden. Die Zellextrakte wurden bei -80°C eingefroren oder weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der in den Überständen enthaltenen Proteinmenge wurde die Methode nach Bradford verwendet. Das Bradford-Reagenz (20% *Bio Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* in destilliertem Wasser) enthält den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau, der die Eigenschaft besitzt, unspezifisch Komplexe an den unpolaren Seitenketten von Proteinen zu bilden. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum in den blauen Wellenlängenbereich (595 nm), sodass die gemessenen Extinktionswerte ein Maß für die enthaltene Proteinmenge darstellen (Bradford, 1976). In lichtdurchlässigen Küvetten mit jeweils 1 ml des Bradford-Reagenzes (siehe Tabelle 5) wurden 2 µl des zu messenden Zellextraktes (für den Leerwert 2 µl des NP40-Lysepuffers) hinzugegeben. Am Photometer wurde die Extinktion des Leerwertes als 0 definiert und dann die Extinktionswerte jeder Probe bestimmt. Mithilfe einer Eichgerade wurden von jeder Probe 30 µg Protein in einem Volumen von 25 µl SDS-Probenpuffer für je eine Spur der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben vor der Beladung des Gels für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend schockgekühlt.

2.2.7 SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die Technik der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Das im SDS-Probenpuffer und SDS-Gelelektrophorese-Puffer (siehe Tabelle 6) enthaltene SDS ist ein anionisches Detergens, das Tertiär- und Sekundärstrukturen von Proteinen denaturiert und diese mit einer gleichmäßigen negativen Ladungsverteilung umhüllt. So ist es möglich, alle Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode hin aufzutrennen. Der Acrylamidanteil und das Verhältnis zu Bisacrylamid bestimmen die Porengröße der Polyacrylamidgele. Auf ihrem Weg zur Anode passieren kleinere Proteine diese Poren schneller als größere Proteine, was zu einer Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht führt (Brunelle and Green, 2014).

Die Polyacrylamidgele (siehe Tabelle 6) wurden in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt (mit SDS-Gelelektrophorese-Puffer) und mit den Zellextrakten beladen (30 µg Protein pro 25 µl pro Probe). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA pro Gel. Um den Proteinen nach der Auftrennung ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde ein vorgefärbter Proteinlängenstandard (*PageRuler Prestained Proteinladder*, Thermofisher) verwendet.

2.2.8 Western Blot

Im Western Blot-Verfahren werden die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen, um dort mittels spezifischer Antikörper gezielt bestimmte Proteine zu detektieren.

Vor dem Transfer wurden die trockenen Transfer-Membranen (Immobilon-FL PVDF-Membranen von Merck, optimiert für Fluoreszenzanwendungen) in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit den Polyacrylamidgelen für 10-15 Minuten in Western Blot-Puffer äquilibriert. Dann erfolgte mittels des Tank-Blot-Systems die Übertragung der Proteine auf die Membran für 2 Stunden bei konstanter Stromstärke. Nach der Überprüfung des erfolgreichen Transfers anhand des vorgefärbten Proteinlängenstandards, wurden die Membranen für 2 Stunden in Blockierungslösung (siehe Tabelle 6) inkubiert, um später eine unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper zu verhindern. Anschließend erfolgte über Nacht bei +4°C die Inkubation in den Erstantikörperlösungen (siehe Tabelle 3 und 6) der zu detektierenden Proteine auf einem Rolltisch. Die Erstantikörper wurden den Herstellerangaben entsprechend oder nach Erfahrungswerten in spezifischen Verdünnungen eingesetzt. Am darauffolgenden Tag erfolgten mehrere Waschschriffe mit PBS - 0,2% Tween 20 sowie die erneute Inkubation in Blockierungslösung. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 4), die speziesspezifisch gegen den F_c-Teil der jeweiligen Erstantikörper gerichtet sind, erfolgte abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem mehrmaligen Waschen mit PBS - 0,2% Tween 20 wurden die Membranen getrocknet und dunkel bei +4°C aufbewahrt. Die Detektion und Analyse der Fluoreszenzsignale erfolgte mittels eines Western Blot-Scanners (Odyssey Classic, Li-Cor) und anschließender Software-basierter Verarbeitung und Auswertung (Odyssey Application Software Version 3.0).

2.2.9 Statistik und Datenaufbereitung

Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte mittels *Microsoft Excel* (siehe Tabelle 8). In den Ergebnisdarstellungen quantitativer Methoden sind grundsätzlich die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens n=3 Versuchen dargestellt (für das Screening der Naturstoffbibliothek wurden bei manchen Substanzen nur n=2 Versuche durchgeführt, siehe Anhang). Als Signifikanztest wurde ein zweiseitiger gepaarter Student's t-Test verwendet. Unterschiede wurden gewertet als signifikant (* p<0,05), sehr signifikant (** p<0,01) oder hoch signifikant (***) p<0,001).

Bei mikroskopischen Aufnahmen und Western Blots wurden n=3 Versuche angefertigt und aus diesen wurde jeweils ein repräsentatives Bild für die Abbildung ausgewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Screening einer marinen Naturstoffbibliothek auf senolytische Aktivität

Nach einem Seneszenz-induzierenden Stimulus kann es je nach Zelllinie mehrere Tage dauern, bis der seneszente Phänotyp ausgebildet ist (de Magalhães and Passos, 2018). Es ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass die verwendeten Tumorzelllinien HCT116 und MCF-7 nach ionisierender Bestrahlung Seneszenz einleiten können (Essmann et al., 2004; Jones et al., 2005; Noren Hooten and Evans, 2017; Sohn et al., 2006). Zur Validierung dieser Eigenschaft wurden HCT116-Zellen hochenergetischer Röntgenstrahlung (10 Gy) ausgesetzt oder mit Camptothecin (20 nM) behandelt und die Seneszenzinduktion zu verschiedenen Zeitpunkten über die Zunahme der SA- β -Gal-Aktivität beobachtet (Abb. 4). Während an Tag 2 nach beiden Stimulationen nur eine gering ausgeprägte phänotypische Veränderung zu beobachten war, kam es an den Tagen 6 und 9 zu einer starken Größenzunahme und Abflachung der Zellen sowie zu einer deutlichen Blaufärbung als Zeichen einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität.

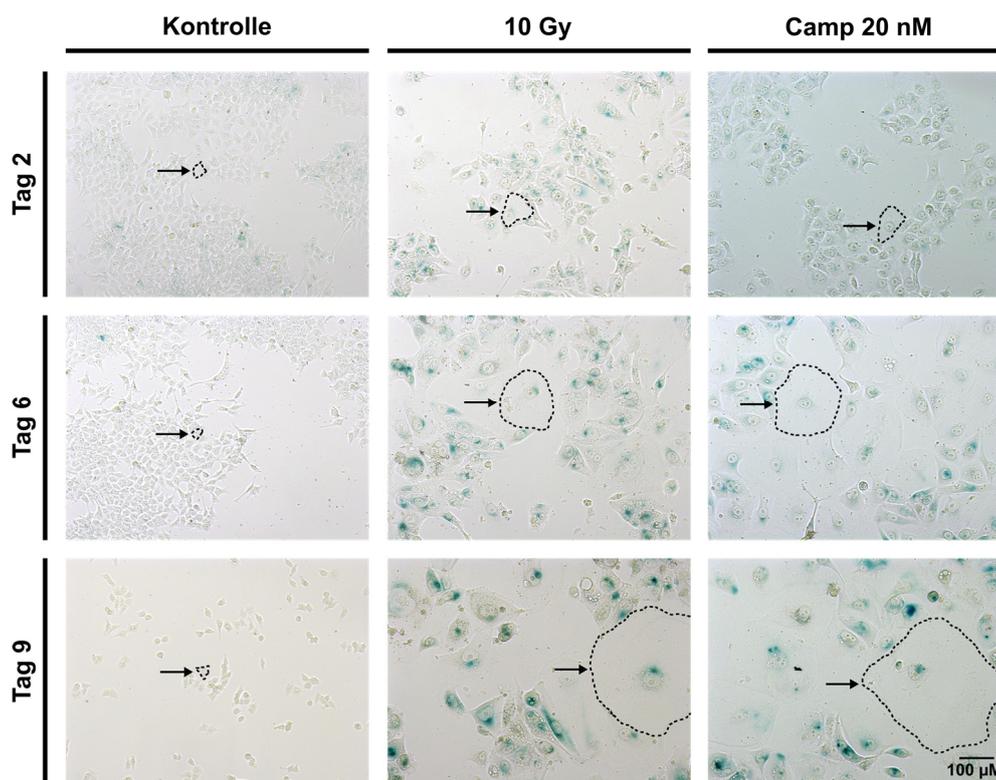


Abb. 4: Seneszenzinduktion durch DNA-Schädigung in HCT116-Zellen. Die Zellen wurden ausgesät und mit Röntgenstrahlung (10 Gy, 150 kV) bestrahlt oder mit Camptothecin (20 nM) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation wurden die Zellen fixiert und die SA- β -Gal-Aktivität durch kolorimetrische Färbung mittels X-Gal visualisiert. In jedem Bild wurde repräsentativ der Umriss jeweils einer Zelle mit schwarz-gestrichelter Umrandung hervorgehoben, um die massive Größenzunahme seneszenten Zellen zu verdeutlichen. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (Camp = Camptothecin)

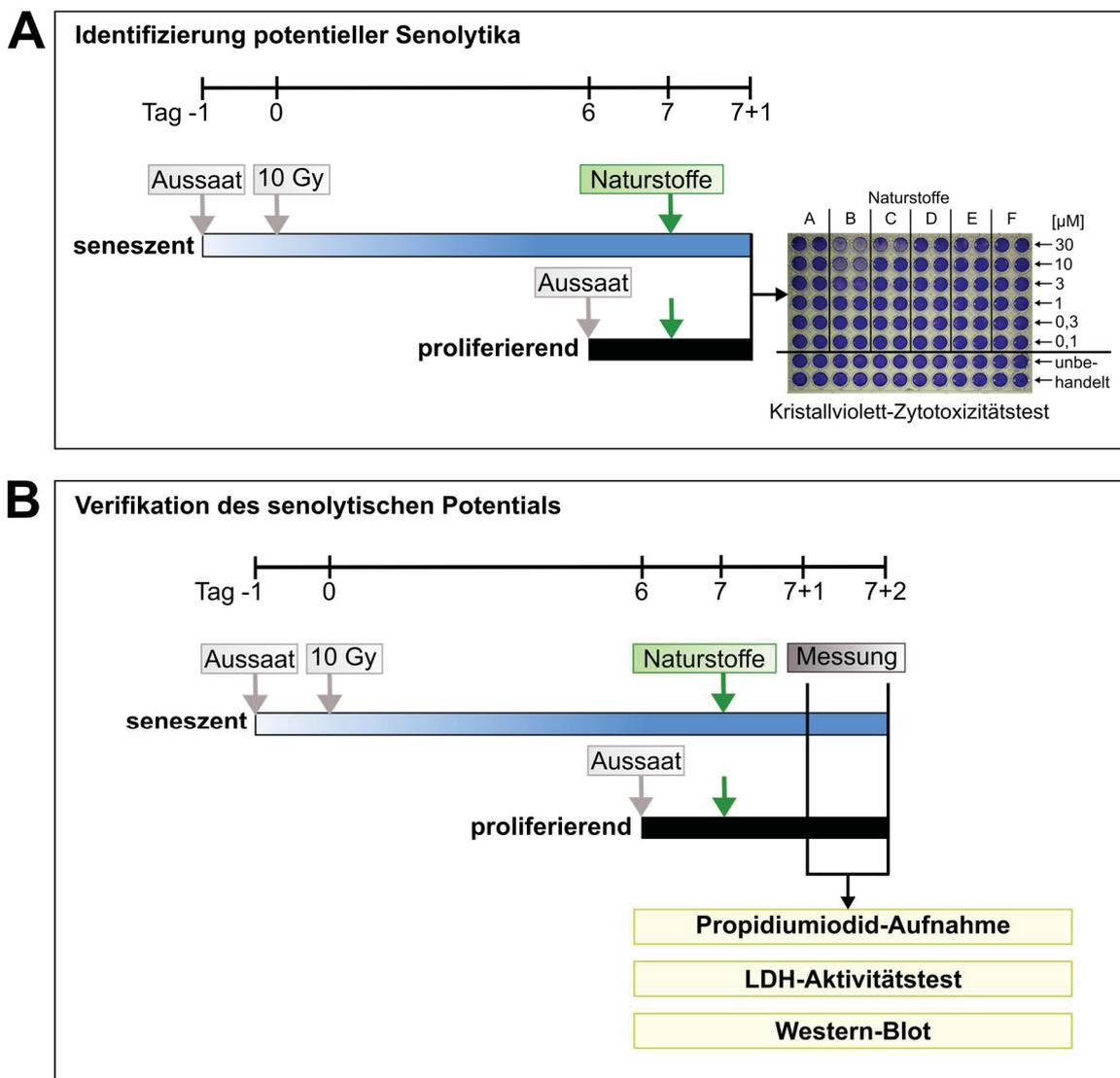


Abb. 5: Arbeitsablauf zur Evaluation der senolytischen Aktivität von 180 Naturstoffen in HCT116- und MCF-7-Zellen. (A) Zur Generierung seneszenten Zellen wurden die verwendeten Tumorzellen (HCT116 und MCF-7) im 96-Well-Format ausgesät und mit 10 Gy bestrahlt. An Tag 6 nach Bestrahlung wurden proliferierende HCT116 bzw. MCF-7-Zellen ausgesät, die als Kontrollen dienten. An Tag 7 nach Bestrahlung wurden die Zellen für 24 Stunden mit Verdünnungsreihen der jeweiligen Naturstoffe inkubiert. Anschließend erfolgte die Evaluation der Zytotoxizität mittels des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests. **(B)** Naturstoffe, die im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest einen senolytischen Effekt zeigten, wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, seneszenten Zellen spezifisch abzutöten, genauer untersucht. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog zu **(A)**. Zur Zelltodbestimmung dienten die Messung der Propidiumiodid-Aufnahme, sowie die Messung der LDH-Aktivität im Zellüberstand 24 Stunden und 48 Stunden nach Zugabe des Naturstoffes. Veränderungen auf Proteinebene wurden mittels Western Blot-Analyse bestimmt.

Für das Screening der Naturstoffbibliothek wurden die Tumorzellen zur Seneszenzinduktion mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt und als Zeitpunkt, an dem der seneszenz Phänotyp ausreichend ausgebildet ist, wurde Tag 7 nach Bestrahlung ausgewählt. 10 Gy entsprechen einer Dosis, die sich auch aus klinischer Sicht in einer sinnvollen Größenordnung befindet. Denn viele Patienten erhalten im Rahmen einer Anti-

Tumor-Therapie innerhalb einer Woche ebenfalls eine lokal auf den Tumor applizierte Dosis von 10 Gy. Hierbei ist die Dosis als kumulative Dosis zu verstehen. Das bedeutet, an 5 Tagen der Woche wird der Tumor mit jeweils 2 Gy bestrahlt, was einer wöchentlichen Gesamtdosis von 10 Gy entspricht.

Die Wirkung der 180 Naturstoffe wurde jeweils auf seneszente und proliferierende Tumorzellen getestet (siehe Abb. 5 A). Seneszente Zellen wurden eine Woche zuvor ausgesät und bestrahlt, während die proliferierenden Zellen erst am Tag vor der Gabe der Naturstoffe ausgesät wurden (siehe auch Kapitel 2.2.1). Zur Quantifizierung des Zelltodes diente ein Kristallviolett-Zytotoxizitätstest. Eine Substanz wurde als senolytisch definiert, wenn es ein Wirkfenster gab, in dem seneszente Zellen gegenüber der getesteten Substanz deutlich empfindlicher waren als proliferierende Zellen. In einem zweiten Schritt sollten so identifizierte potentielle Senolytika hinsichtlich ihrer Wirkweise genauer charakterisiert werden (Abb. 5 B). Zur Verifikation des senolytischen Potentials dienten weitere Methoden zur Zelltodquantifizierung sowie Analysen auf Proteinebene.

Der Kristallviolett-Zytotoxizitätstest wurde (entsprechend dem Schema aus Abb. 5 A) zunächst mit Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt, da die Substanzen der Naturstoffbibliothek in DMSO gelöst vorlagen (Abb. 6 A, B). In den verwendeten Mengen zeigte DMSO weder Auswirkungen auf die proliferierenden noch auf die seneszenten Zellen. Als Positivkontrolle für stark zytotoxische Substanzen diente der unspezifische Kinaseinhibitor Staurosporin (Abb. 6 C, D), der sowohl in proliferierenden als auch in seneszenten Zellen Zelltod induzierte. Um eine mögliche Positivkontrolle für einen senolytischen Effekt zu erhalten, wurden vor Beginn des Naturstoffscreenings außerdem der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib und das Flavonol Quercetin im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest auf beide Tumorzelllinien getestet, da diese Substanzen bereits in anderen Zellsystemen (HUVECs und Präadipozyten) als senolytisch beschrieben wurden und daher als erste Vertreter der Klasse der Senolytika gelten (Zhu et al., 2015). Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest zeigten jedoch beide Substanzen keine senolytische Aktivität gegenüber diesen Zelllinien (Abb. 6 E-H). So reduzierte Quercetin insbesondere in höheren Dosen die Anzahl proliferierender HCT116- und MCF-7-Zellen, ließ aber seneszente Zellen unbeeinflusst (Abb. 6 E, F). Dasatinib dagegen reduzierte auch schon bei geringeren Konzentrationen die Anzahl proliferierender HCT116-Zellen, während seneszente Zellen sich zunächst resistenter zeigten und erst bei einer höheren Konzentration mit Zelltodinduktion reagierten (Abb. 6 G).

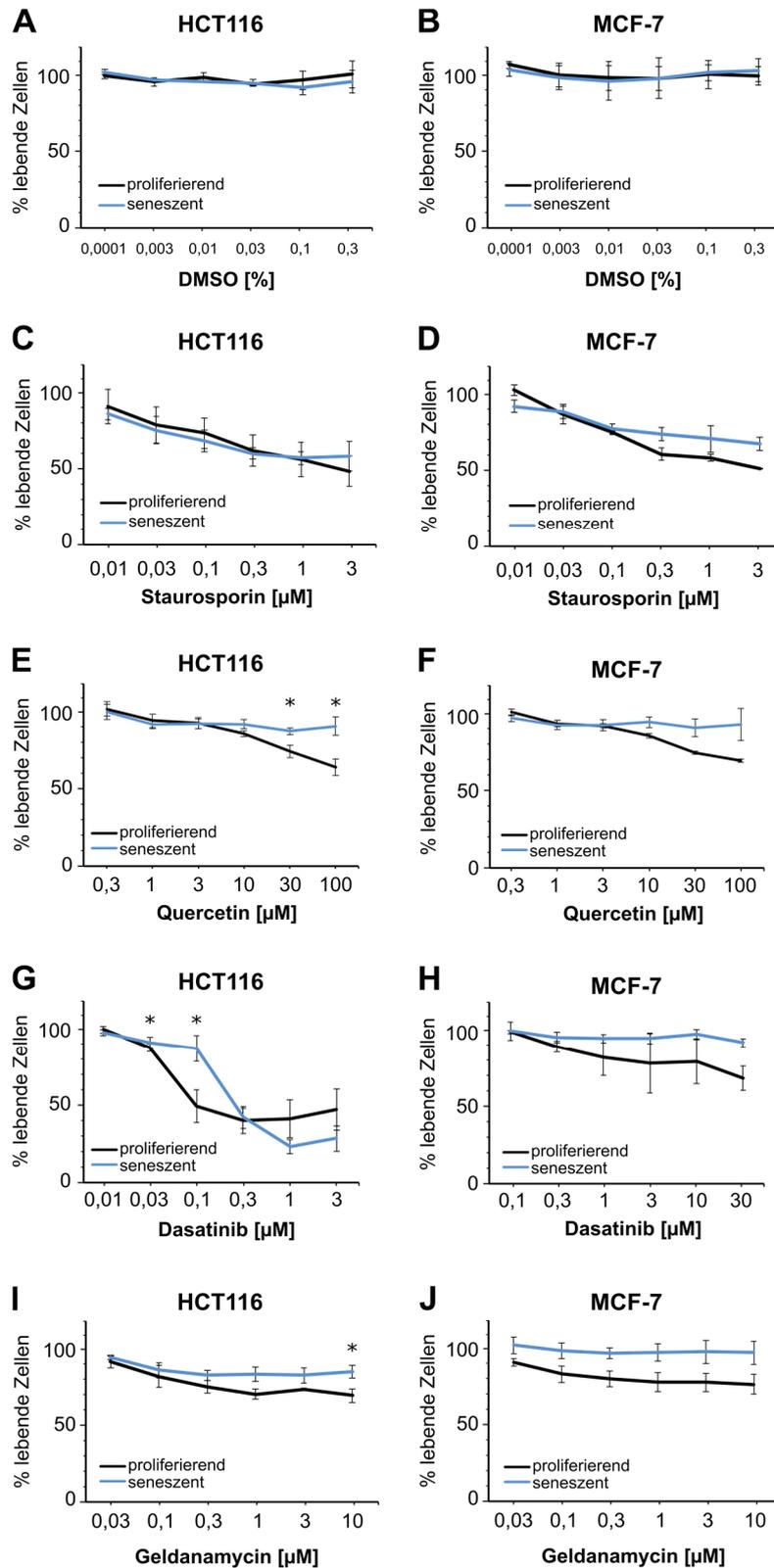


Abb. 6: Kristallviolett-Zytotoxizitätstest der in anderen Zellsystemen als senolytisch beschriebenen Substanzen Dasatinib, Quercetin und Geldanamycin. Seneszenz (Tag 7 nach Bestrahlung mit 10 Gy) und proliferierende HCT116- und MCF-7-Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO (A, B), Staurosporin (C, D), Quercetin (E, F), Dasatinib (G, H) oder Geldanamycin (I, J) inkubiert. Die Absorptionswerte von jeweils unbehandelten proliferierenden und seneszenten Zellen wurden als 100% definiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier (C,G), drei (A, B, E, F, H, I, J) oder zwei (D) unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

Interessanterweise wiesen MCF-7-Zellen eine deutlich größere Unempfindlichkeit gegenüber Dasatinib auf und erst in höheren Konzentrationen wurde die Anzahl proliferierender MCF-7-Zellen leicht reduziert (Abb. 6 H). Es konnte demnach kein Konzentrationsbereich identifiziert werden, in dem seneszente HCT116- oder MCF-7-Zellen empfindlicher gegenüber den beiden bisher als senolytisch eingestuften Substanzen waren als proliferierende Zellen.

Auch der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin zeigte bereits senolytische Aktivität, allerdings ebenso wie Dasatinib und Quercetin nur in einem anderen Zellsystem (*Mouse Embryonic Fibroblast/* MEF-Zellen) (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017). Auch diese bisher als senolytisch eingestufte Substanz wurde auf HCT116- und MCF-7-Zellen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest getestet (Abb. 6 I, J). Durch Geldanamycin wurden jedoch seneszente HCT116- und MCF-7-Zellen kaum beeinflusst. Die proliferierenden Zellen zeigten sich etwas empfindlicher und wurden in beiden Zelllinien leicht reduziert (Abb. 6 I, J). Somit zeigten weder Dasatinib und Quercetin, noch der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin eine senolytische Aktivität in HCT116- und MCF-7-Zellen.

In ähnlicher Weise wurden sämtliche 180 Substanzen der Naturstoffbibliothek zur Evaluation des senolytischen Potentials jeweils in proliferierenden und seneszenten HCT116- bzw. MCF-7-Zellen getestet. Es wurden Verdünnungsreihen der Naturstoffe mit dem Faktor 3 (von 0,1 μM bis 30 μM) verwendet, um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich abdecken zu können. Die Effekte der Naturstoffe auf die beiden Tumorzelllinien konnten in vier Gruppen unterteilt werden (I kein Effekt; II senolytisch; III zytotoxisch für proliferierende Zellen; IV zytotoxisch für proliferierende und seneszente Zellen). Für die Ergebnisdarstellung wurden allerdings jeweils nur die Daten eines Naturstoffes stellvertretend für die jeweilige Gruppe ausgewählt (Abb. 7 A). Die ausführliche Darstellung der einzelnen Ergebnisse des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests aller 180 Naturstoffe in HCT116- und MCF-7-Zellen findet sich im Anhang.

Mehr als drei Viertel der getesteten Naturstoffe zeigten in den verwendeten Konzentrationen weder einen Effekt auf proliferierende, noch auf seneszente Zellen (Abb. 7 A, I und 7 B). Ein weitaus geringerer Anteil der Naturstoffe reduzierte effektiv die Anzahl proliferierender Zellen, während seneszente Zellen in den verwendeten Konzentrationen keinen oder nur wenig Zelltod zeigten (Abb. 7 A, III). Ein in etwa gleich großer Anteil der Naturstoffe konnte die Anzahl seneszenten und proliferierender Zellen gleichermaßen reduzieren, also bei gleichen Konzentrationen ergaben sich identische Werte für das prozentuale Zellüberleben (Abb. 7 A, IV). Obwohl diese Substanzen also effektiv seneszente Zellen eliminieren konnten, stellten sie keine potentiellen Senolytika dar, da es keinen Konzentrationsbereich gab, in dem seneszente Zellen effektiver reduziert wurden als proliferierende Zellen.

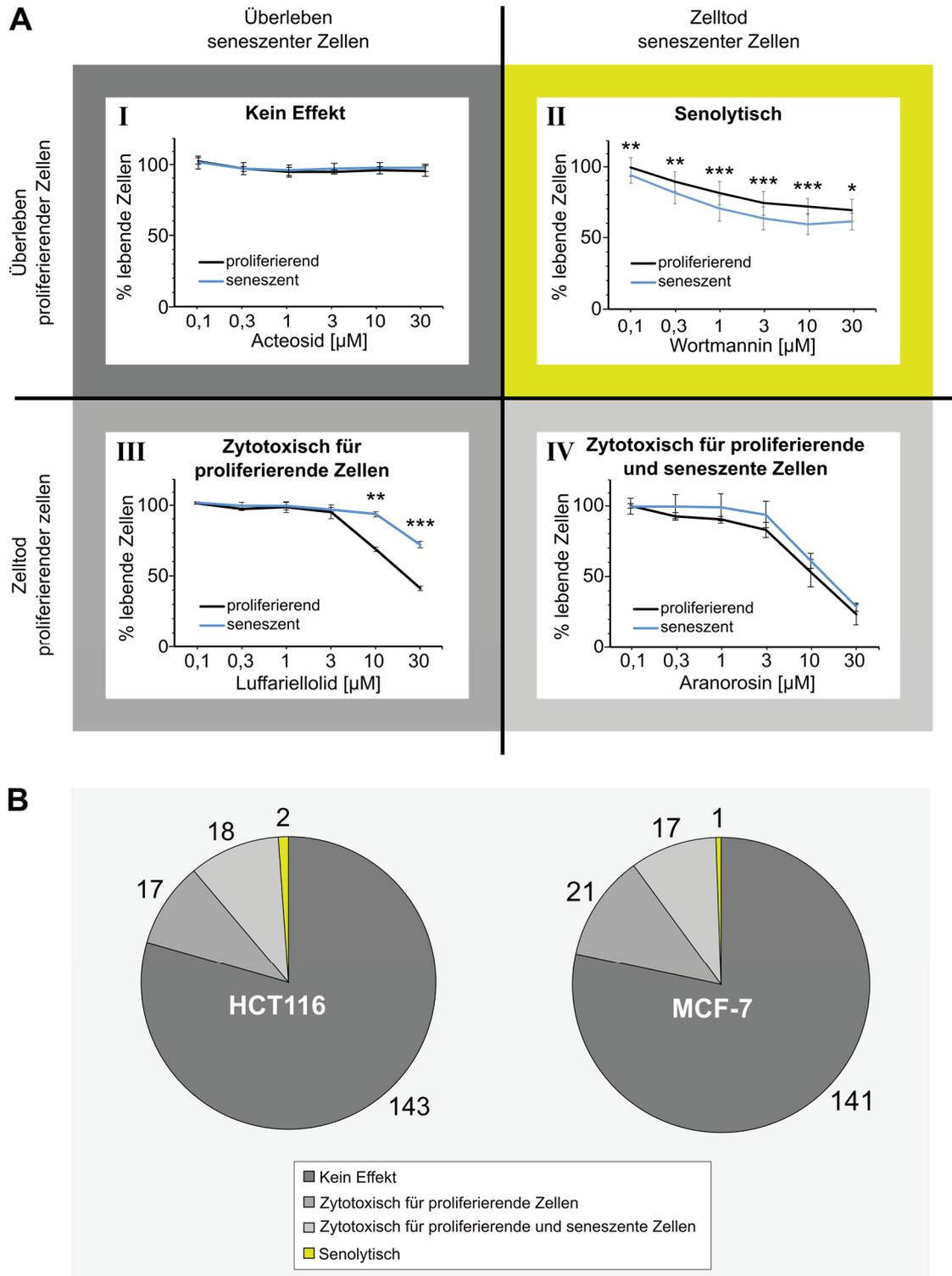


Abb. 7: Zusammenfassung des Screening-Verfahrens der 180 Naturstoffe. HCT116- und MCF-7-Zellen wurden entsprechend dem Schema aus **Abb. 5 (A)** vorbereitet. Die Zelltodmessung erfolgte mittels des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests. Die Absorptionen von jeweils unbehandelten proliferierenden und seneszenten Zellen wurden als 100% definiert. **(A)** Verschiedene Wirkungen der Naturstoffe auf proliferierende und senescente HCT116- und MCF-7-Zellen. Exemplarisch für jede Gruppe wurde jeweils ein Naturstoff in einer Zelllinie ausgewählt (I, II, III: HCT116 und IV: MCF-7). Die gezeigten Daten stellen jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei (I, III, IV) und zehn (II) unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **(B)** Prozentuale Verteilung der Klassifikation aus **(A)**. Insgesamt wurden mithilfe des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests 180 Naturstoffe in HCT116-Zellen und MCF-7 Zellen getestet. Ein senolytischer Effekt konnte für HCT116-Zellen nur bei zwei Substanzen nachgewiesen werden, bei MCF-7-Zellen bei nur einer Substanz.

Lediglich zwei Substanzen zeigten in den Tumorzelllinien den gewünschten senolytischen Effekt, also eine stärkere Reduktion der seneszenten als der proliferierenden Zellen bei gleichen Konzentrationen: der PI3K-Inhibitor **Wortmannin** (Abb. 7 A, II) und das Depsipeptid **Kahalalide F** (Abb. 8 A). Für Wortmannin konnte in beiden Tumorzelllinien eine senolytische Aktivität nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4), während Kahalalide F nur in HCT116-Zellen in einem sehr engen Konzentrationsbereich senolytisch wirkte (siehe Kapitel 3.2). Obwohl die Überlebenskurven seneszenter und proliferierender Zellen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest mit Wortmannin (Abb. 7 A II) nur einen vergleichsweise geringen Unterschied aufwiesen, war der senolytische Effekt tatsächlich stärker ausgeprägt. In weiteren Versuchen stellte sich nämlich heraus, dass die Reduktion der proliferierenden Zellen durch Wortmannin nicht primär durch die Induktion von Zelltod, sondern lediglich durch eine Proliferationshemmung bedingt war, da im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest nicht zwischen der Hemmung der Proliferation und Zelltod differenziert werden kann (siehe hierzu Kapitel 3.4 und 4.2.1).

3.2 Verifizierung des senolytischen Potentials von Kahalalide F

Kahalalide F ist ein aus der Meeresschnecke *Elysia rufescens* isoliertes Depsipeptid, das *in vitro* gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien Zytotoxizität gezeigt hat und bereits in Phase-I und -II Studien eingesetzt wurde (Suárez et al., 2003). Eine senolytische Aktivität wurde bislang allerdings weder beschrieben noch untersucht. Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest wurde die Anzahl seneszenter HCT116-Zellen bei einer Konzentration von 10 µM effektiver reduziert als die Anzahl proliferierender Zellen (Abb. 8 A). In höheren Konzentrationen von Kahalalide F wurde allerdings die Anzahl sowohl proliferierender als auch seneszenter HCT116-Zellen gleichermaßen reduziert während in kleineren Konzentrationen die Substanz keinen Einfluss auf die Vitalität zeigte. Der therapeutische Bereich, in dem Kahalalide F also in HCT116-Zellen senolytisch wirkte, war nur sehr schmal.

Mit dem LDH-Aktivitätstest des Zellkulturüberstandes konnte zwar bestätigt werden, dass Kahalalide F in seneszenten Zellen mehr Zelltod induzierte als in proliferierenden Zellen, allerdings wurde ein großer Anteil der proliferierenden Zellen ebenfalls abgetötet (Abb. 8 B). Bei einer Konzentration von 10 µM zeigten seneszente HCT116-Zellen noch keine Zunahme des Zelltodes im Vergleich zu unbehandelten seneszenten Zellen. Bei einer Konzentration von 30 µM stieg die freigesetzte LDH-Aktivität zwar bei seneszenten Zellen deutlich an, aber auch in proliferierenden HCT116-Zellen induzierte Kahalalide F in einem großen Anteil der Zellen Zelltod. Da sich Kahalalide F auch in MCF-7-Zellen als stark zytotoxisch für proliferierende Zellen erwies (Abb. 8 C, D), konnte auch hier kein Konzentrationsbereich identifiziert werden, in dem Kahalalide F eine senolytische Aktivität

zeigte. Aufgrund dieser starken Zytotoxizität auch gegenüber proliferierenden Zellen und des schmalen Konzentrationsbereiches, in dem seneszente HCT116-Zellen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest empfindlicher waren als proliferierende Zellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das senolytische Potential von Kahalalide F nicht weiter analysiert.

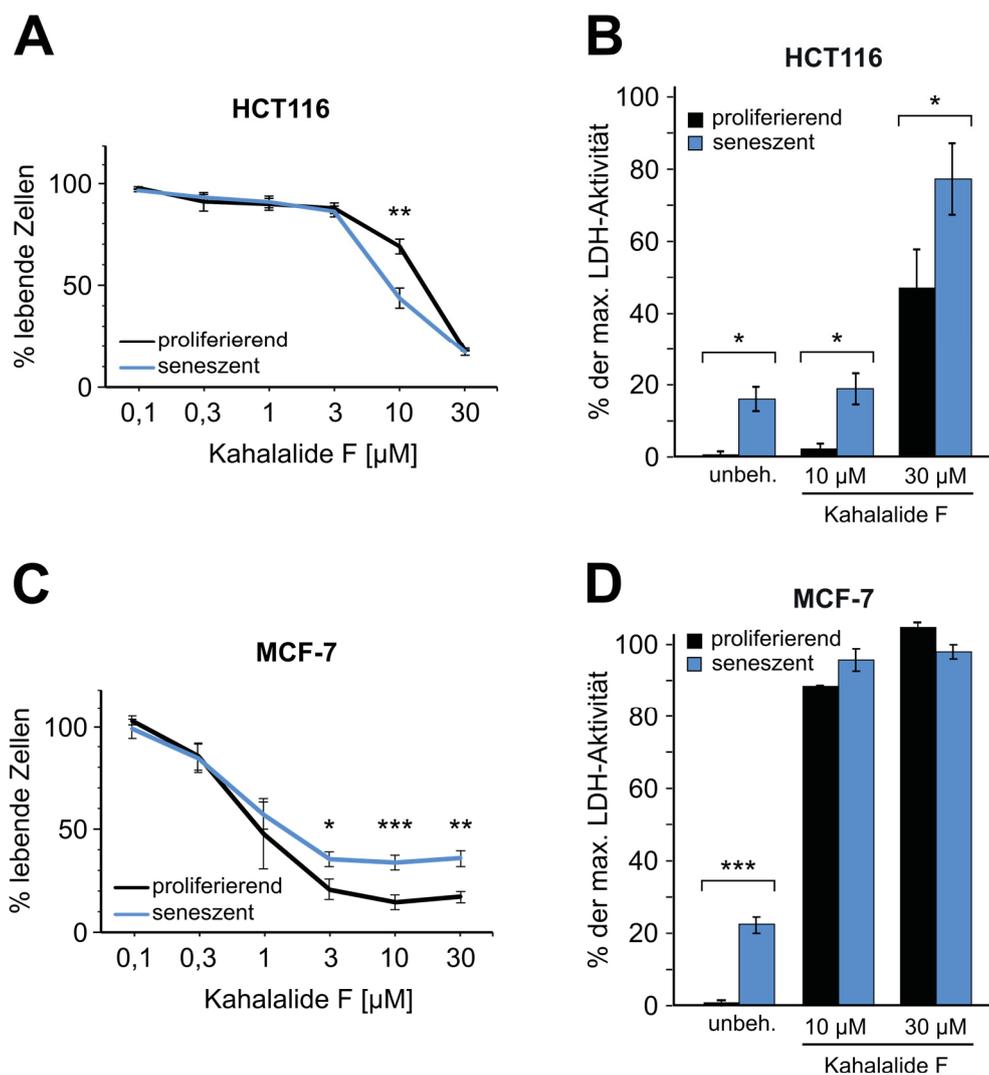


Abb. 8: Kahalalide F zeigt senolytische Aktivität in HCT116-Zellen in einem sehr schmalen Konzentrationsbereich. Seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung) und proliferierende HCT116- und MCF-7-Zellen wurden mit Kahalalide F (0,1-30 μM) für 24 Stunden inkubiert. **(A, C)** Die Zellvitalität wurde quantifiziert mittels des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests. Die Absorptionen von jeweils unbehandelten proliferierenden und seneszenten Zellen wurden als 100% definiert. Nur in HCT116-Zellen konnte für Kahalalide F im Bereich zwischen 3 μM und 30 μM eine senolytische Aktivität nachgewiesen werden. **(B, D)** Zur weiteren Evaluation des senolytischen Potentials wurde die LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen von HCT116- und MCF-7-Zellen bestimmt. Die maximale LDH-Aktivität wurde mittels Zelllyse durch 1%-Triton X-100-Lösung ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei **(A, B, D)** oder vier **(C)** unabhängigen Experimenten dar. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

3.3 Wortmannin und PX-866 zeigen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest einen senolytischen Effekt in HCT116-Zellen

Der PI3K-Inhibitor Wortmannin ist ein Pilzmetabolit und kann unter anderem aus *Talaromyces wortmanni* isoliert werden (Cardenas et al., 1998). Im Screening zeigten sich seneszente Zellen gegenüber Wortmannin empfindlicher als proliferierende Zellen. Allerdings konnte im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest zunächst nur in HCT116-Zellen eindeutig eine senolytische Aktivität nachgewiesen werden, während seneszente und proliferierende MCF-7-Zellen gleichermaßen reduziert wurden (Abb. 9 A, B). In späteren Versuchen zur Verifikation des senolytischen Potentials von Wortmannin konnte jedoch auch in MCF-7-Zellen die senolytische Aktivität von Wortmannin bestätigt werden. Wie oben bereits erwähnt, konnte nämlich gezeigt werden, dass die Ursache für die Reduktion der proliferierenden Zellen durch eine Proliferationshemmung bedingt war und somit im Kristallviolett-Screening nur scheinbar Zelltod in den proliferierenden Zellen induziert wurde (siehe Kapitel 3.4 und 4.2.1).

Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung als Senolytikum erweist sich Wortmannin aus mehreren Gründen jedoch als nachteilig. Zum einen besitzt die Substanz eine geringe Stabilität in wässrigen Lösungen, zum anderen zeigte sich im Mausmodell eine ausgeprägte Hepatotoxizität (Howes et al., 2007). Demgegenüber weist der PI3K-Inhibitor PX-866, ein synthetisches Derivat von Wortmannin, eine weitaus größere Stabilität in wässrigen Lösungen auf (Zask et al., 2008). Gleichzeitig zeigt PX-866 eine verminderte Toxizität *in vivo* und einen deutlich geringeren IC₅₀ Wert der PI3K-Inhibition (Howes et al., 2007; Ihle, 2005). Aus diesem Grund stellt PX-866 einen geeigneteren Kandidaten für den klinischen Einsatz dar als Wortmannin und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls auf seine senolytische Aktivität in HCT116- und MCF-7-Zellen untersucht. PX-866 war bereits aufgrund seiner antiproliferativen Eigenschaften Gegenstand mehrerer Phase-II-Studien und ist daher grundsätzlich im Menschen einsetzbar (Bowles et al., 2016; Pitz et al., 2015). Das senolytische Potential dieser Substanz wurde bisher allerdings nicht untersucht. Tatsächlich zeigte PX-866 im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest ebenfalls eine senolytische Aktivität in HCT116-Zellen (Abb. 9 C). Die Anzahl seneszenter und proliferierender MCF-7-Zellen hingegen war bei den jeweiligen PX-866 Konzentrationen annähernd identisch (Abb. 9 D). Da wie erwähnt durch den Kristallviolett-Zytotoxizitätstest keine eindeutige Abgrenzung von Zelltod und Proliferationshemmung vorgenommen werden kann, konnte (wie bei Wortmannin) mit weiteren Versuchen gezeigt werden, dass auch PX-866 einen senolytischen Effekt in MCF-7-Zellen besitzt (siehe Kapitel 3.4). Zu beachten ist die starke Empfindlichkeit der MCF-7-Zellen gegenüber PX-866 bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration (Abb. 9 D).

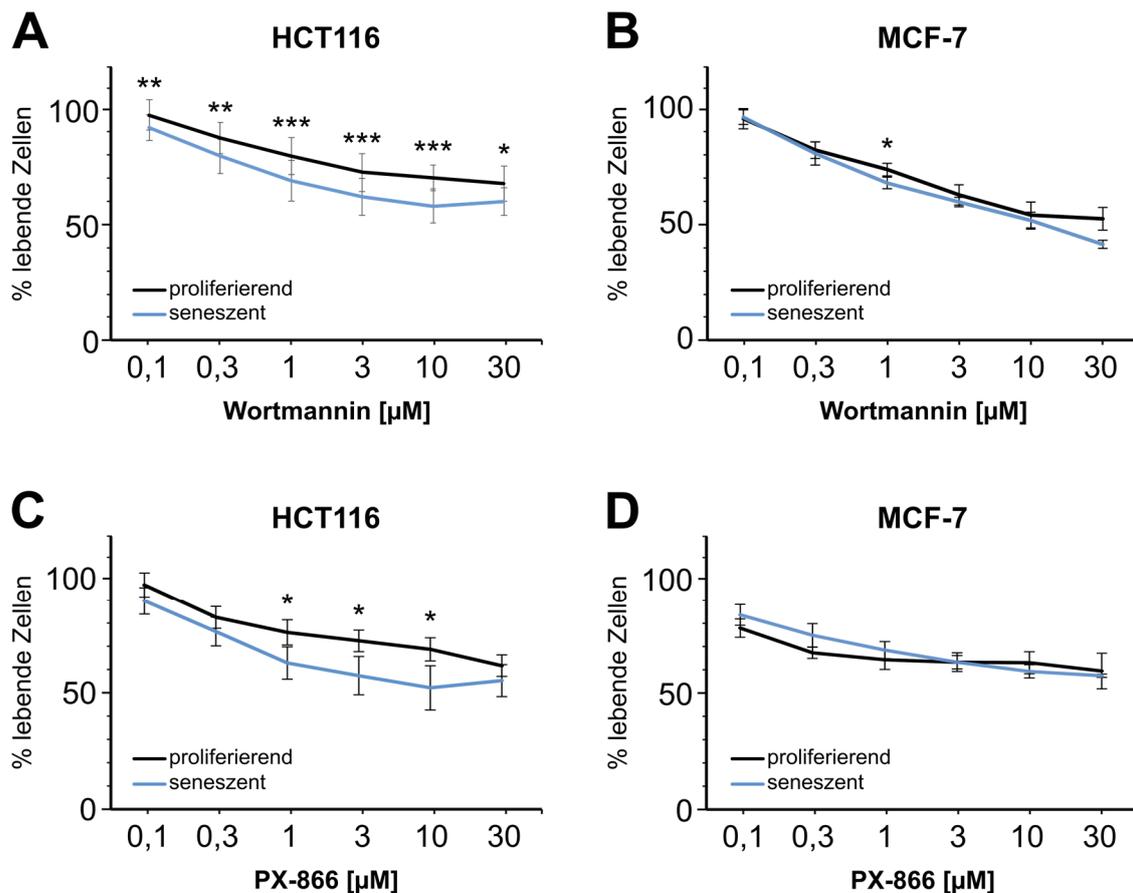


Abb. 9: Wortmannin und PX-866 zeigen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest in HCT116-Zellen senolytische Aktivität. Seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung) und proliferierende HCT116- und MCF-7-Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen Wortmannin und seinem klinischen Derivat PX-866 inkubiert. Die Quantifizierung des Zelltodes erfolgte mittels des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests. Die Absorptionen von jeweils unbehandelten proliferierenden und seneszenten Zellen wurden als 100% definiert. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei (B,C,D) oder zehn (A) unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.4 Verifizierung der senolytischen Aktivität von Wortmannin und PX-866

Zur Verifizierung des senolytischen Potentials von Wortmannin und PX-866 wurden zunächst mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen angefertigt (Abb. 10). Sowohl mit Wortmannin als auch mit PX-866 war eine deutlich verstärkte Ablösung seneszenter HCT116- und MCF-7-Zellen zu erkennen, die mit steigender Konzentration zunahm. Bei den proliferierenden Zellen war in höheren Konzentrationen die Abnahme der Zelldichte der adhärennten Zellen zu sehen, obwohl nur geringfügig mehr abgelöste Zellen im Überstand zu finden waren. Dies deutet auf eine Proliferationshemmung durch Wortmannin und PX-866 hin, was auch eine mögliche alternative Erklärung für die abnehmende Anzahl der proliferierenden Zellen im Kristallviolett-Screening sein könnte (für eine ausführlichere Erläuterung siehe Kapitel 4.2.1).

Die gezeigten Aufnahmen dienen nur der qualitativen Darstellung der Auswirkungen von Wortmannin und PX-866, aber es lässt sich bereits hier eine stärkere zytotoxische Wirkung auf seneszente Zellen feststellen, während proliferierende Zellen bei gleichen Konzentrationen deutlich unempfindlicher sind.

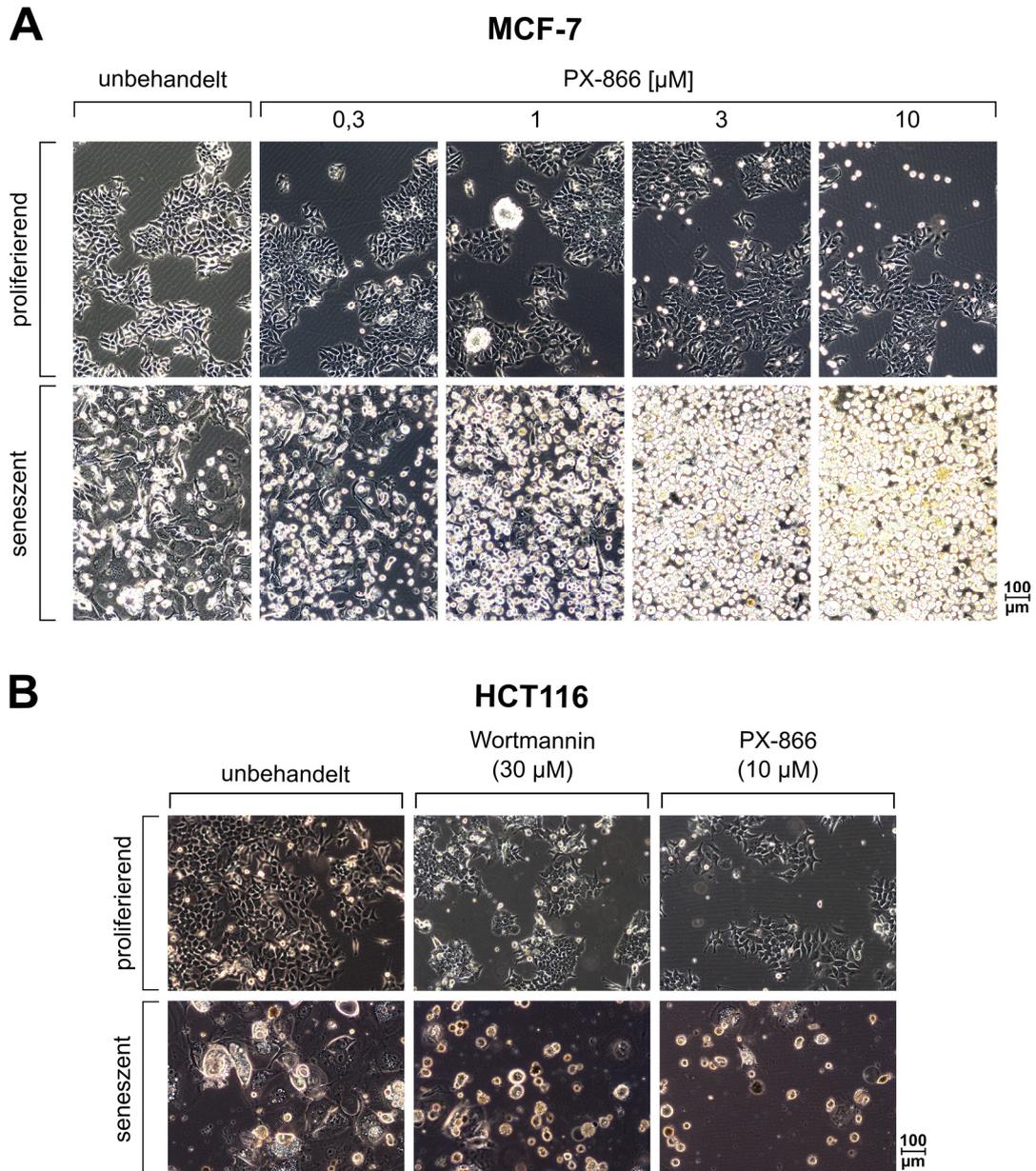


Abb. 10: Seneszente MCF-7 und HCT116-Zellen zeigen eine deutlich verstärkte Ablösung durch Wortmannin und PX-866. Seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung mit 10 Gy) und proliferierende Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin und PX-866 für 48 Stunden (A) oder 72 Stunden (B) inkubiert und mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen angefertigt. Alle gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Um die senolytische Aktivität von Wortmannin und PX-866 mittels anderer Methoden genauer zu verifizieren, erfolgte zunächst die fluoreszenzbasierte Messung der

PI-Aufnahme im Durchflusszytometer. Proliferierende und seneszente MCF-7-Zellen wurden hierfür jeweils mit verschiedenen Konzentrationen von PX-866 und Wortmannin inkubiert und der Zelltod nach 24 Stunden quantitativ bestimmt (Abb. 11). Mit zunehmenden Konzentrationen von Wortmannin und PX-866 nahm die Anzahl lebender seneszenten MCF-7-Zellen ab und mit PX-866 (10 μM) wurden sogar mehr als 60% Zelltod erreicht (Abb. 11 B). Der Anteil lebender proliferierender MCF-7-Zellen hingegen blieb auch mit höheren Wortmannin- und PX-866-Konzentrationen unverändert. Demnach wurden durch beide Substanzen selektiv nur seneszente, aber keine proliferierenden MCF-7-Zellen abgetötet.

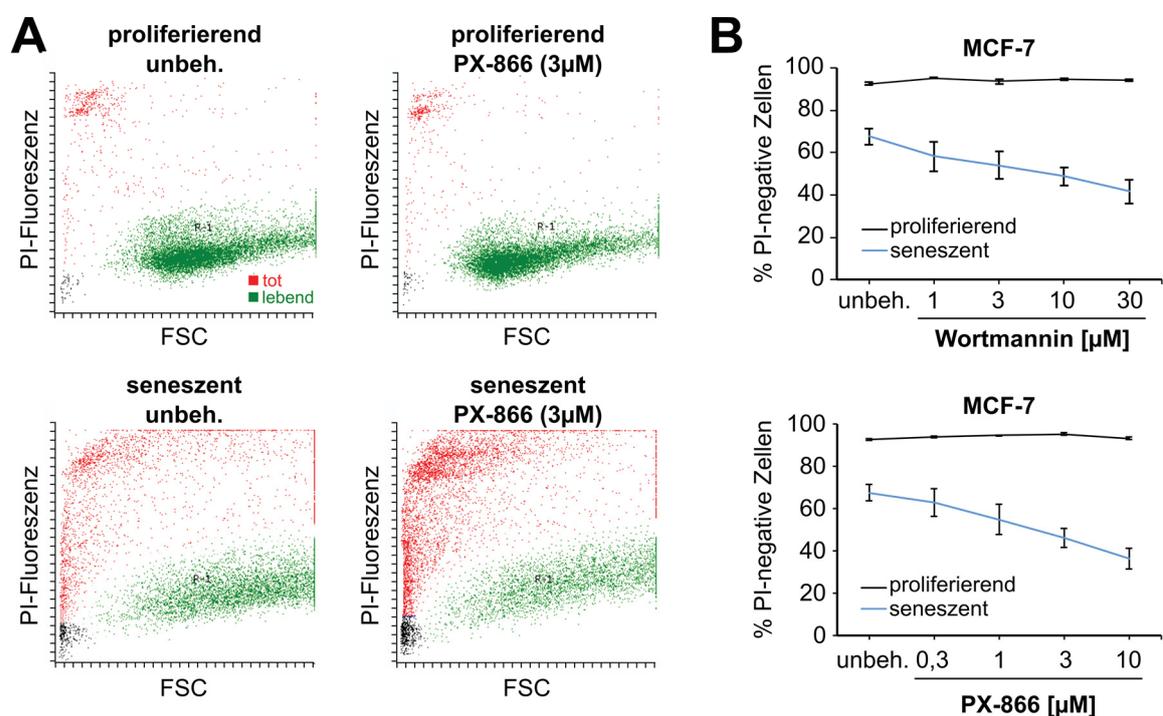


Abb. 11: Seneszente MCF-7-Zellen zeigen selektiv eine erhöhte PI-Aufnahme nach Behandlung mit Wortmannin und PX-866. Seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung mit 10 Gy) und proliferierende MCF-7-Zellen wurden verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin oder PX-866 ausgesetzt. Zur quantitativen Zelltodbestimmung erfolgte 24 Stunden später die durchflusszytometrische Messung der PI-Aufnahme. **(A)** PI-negative (lebende) Zellen sind grün markiert, PI-positive (tote Zellen) sind rot markiert. Die schwarz markierte Population lässt sich nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zuordnen (am ehesten Zelltrümmer). Die Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(B)** Anteil der PI-negativen MCF-7-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration von Wortmannin oder PX-866. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar. FSC = Forward Scatter, unbeh. = unbehandelt.

Es ist zu beachten, dass mit der durchflusszytometrischen Messung der maximal erreichbare Anteil lebender Zellen in den unbehandelten seneszenten MCF-7-Zellen nur circa 70% betrug (Abb. 11 B). Bei der Beurteilung des senolytischen Effekts muss diese scheinbare „basale“ Zelltodrate der seneszenten Zellen jeweils berücksichtigt werden. Der

Messvorgang selbst könnte dazu beigetragen haben, dass die seneszenten Zellen geschädigt wurden und auf diese Weise fälschlich zu hohe Zelltozzahlen gemessen wurden. Durch die morphologischen Veränderungen seneszenter Zellen (massive Größenzunahme und Abflachung) könnten sie nämlich anfälliger für die beim Pipettiervorgang auftretenden Scherkräfte sein und so mechanisch bedingt Zelltod erlitten haben. Hierfür spricht auch die Zunahme der Zelltrümmer mit niedriger PI-Aufnahme (in Abb. 11 A, schwarz markierte Signale). Insbesondere seneszente HCT116-Zellen waren sehr anfällig für die Schädigung der Zellmembranintegrität, was fälschlicherweise zu extrem hohen Zelltozzahlen führte (Daten nicht gezeigt), sodass die Methode in dieser Zelllinie nicht zur Quantifizierung herangezogen werden konnte.

Als weitere Methode zur quantitativen Zelltodbestimmung diente die Messung der LDH-Aktivität im Zellüberstand. Seneszente und proliferierende Zellen wurden für 24 Stunden mit Wortmannin oder PX-866 inkubiert und anschließend wurde mittels einer gekoppelten enzymatischen Reaktion die LDH-Aktivität in den Zellüberständen bestimmt. Diese Methodik wurde insbesondere gewählt, da die Zellen während des Messvorgangs nicht (wie bei Messung der PI-Aufnahme) einem mechanischen Stress ausgesetzt werden.

Durch Wortmannin und PX-866 Gabe wurde eine deutliche Zunahme der freigesetzten LDH-Aktivität seneszenter Zellen erzielt (Abb. 12), wobei in HCT116-Zellen der senolytische Effekt etwas deutlicher zu sehen war (Abb. 12 A, B). In seneszenten MCF-7-Zellen kam es durch eine Behandlung mit Wortmannin oder PX-866 ebenfalls zur Zelltodinduktion, allerdings schien der Effekt aufgrund der höheren basalen LDH-Freisetzung seneszenter unbehandelter MCF-7-Zellen weniger ausgeprägt als bei HCT116-Zellen zu sein (Abb. 12 C, D). In beiden Zelllinien wurde aber deutlich, dass die proliferierenden Zellen nach Wortmannin oder PX-866-Gabe kaum eine Änderung der freigesetzten LDH-Aktivität und somit keine Zelltodinduktion zeigten. Sowohl seneszente HCT116- als auch seneszente MCF-7-Zellen wurden also durch Wortmannin und PX-866 selektiv abgetötet.

Die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und PX-866 induzierten spezifisch Zelltod in seneszenten HCT116- und MCF-7-Zellen, was einerseits über eine verstärkte PI-Aufnahme (Abb. 11), andererseits über eine Zunahme der LDH-Freisetzung (Abb. 12) verifiziert werden konnte. Proliferierende Zellen hingegen zeigten nach Wortmannin- oder PX-866-Exposition in den verwendeten Konzentrationen keine verstärkte Zelltodinduktion. Somit stellen Wortmannin und PX-866 neu identifizierte Senolytika in den Tumorzelllinien HCT116- und MCF-7 dar.

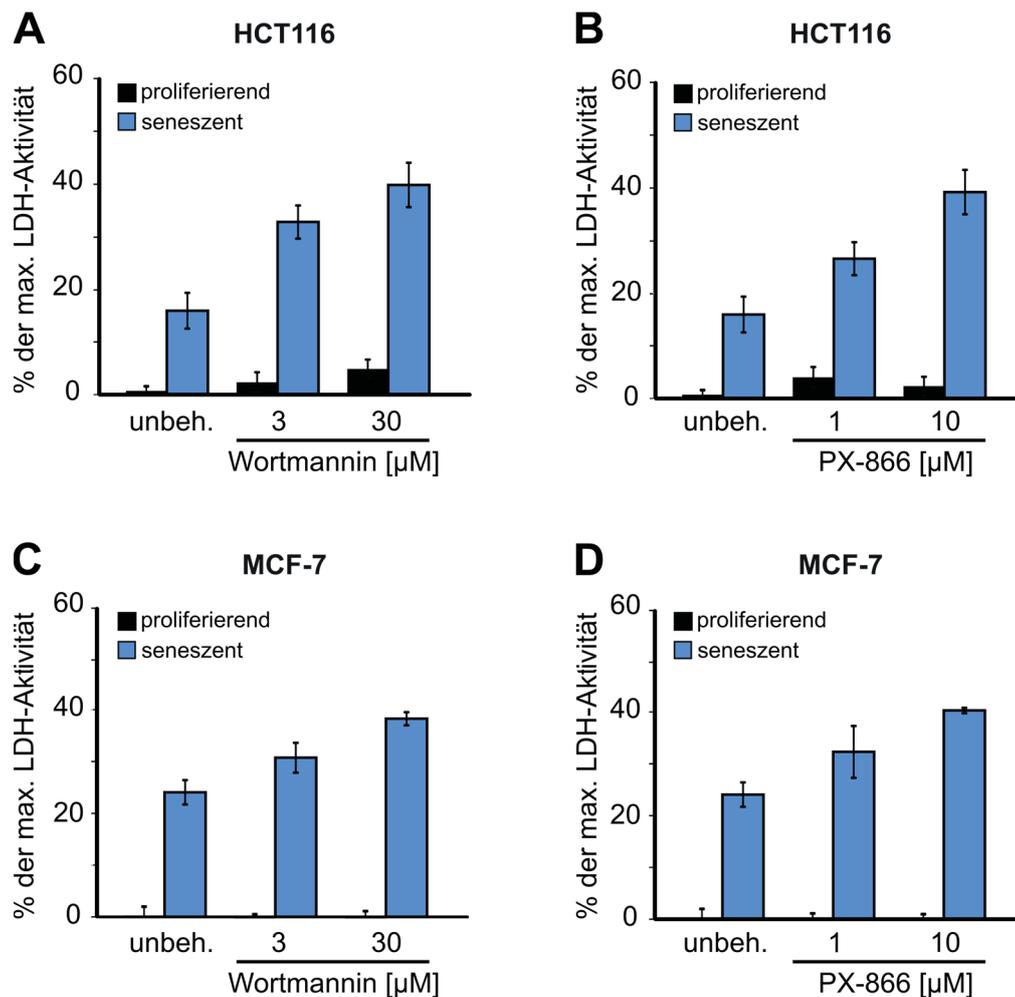


Abb. 12: Wortmannin- und PX-866 steigern die LDH-Freisetzung seneszenten HCT116- und MCF-7-Zellen. Seneszenz (Tag 7 nach Bestrahlung mit 10 Gy) und proliferierende HCT116- und MCF-7-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Wortmannin und PX-866 inkubiert. Die Messung der freigesetzten LDH-Aktivität erfolgte nach 24 Stunden. Die maximale LDH-Aktivität im Überstand wurde ermittelt durch Behandlung der Zellen mit einer 1%-Triton X-100 Lösung. Zu beachten ist, dass der Zelltodanteil proliferierender MCF-7-Zellen bei <1% lag (C,D). Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar. unbeh. = unbehandelt.

3.5 Charakterisierung der senolytischen Wirkung von Wortmannin und PX-866

3.5.1 Wortmannin und PX-866 reduzieren die AKT-Phosphorylierung

Zunächst sollte die Wirksamkeit der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und PX-866 auf Proteinebene über das nachgeschaltete Zielprotein AKT (Proteinkinase B) überprüft werden, das durch die PI3K-Aktivität zur Membran rekrutiert und dort phosphoryliert wird (für genauere Informationen zum PI3K/AKT-Signalweg siehe Kapitel 4.3.1). Eine Inhibition der PI3K-Aktivität sollte demnach zur Reduktion der AKT-Phosphorylierung führen.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sowohl in proliferierenden als auch in seneszenten HCT116-Zellen durch Wortmannin und PX-866 die Phosphorylierung an Serin 473 deutlich reduziert wurde, während die AKT-Expression unbeeinflusst blieb (Abb. 13 A). Gleiches gilt für proliferierende und seneszente MCF-7-Zellen (Abb. 13 B). Da Wortmannin und PX-866 zu einer Reduktion der AKT-Phosphorylierung führten, spricht dies für eine erfolgreiche Inhibierung der vorgeschalteten PI3K bei den hier verwendeten Konzentrationen.

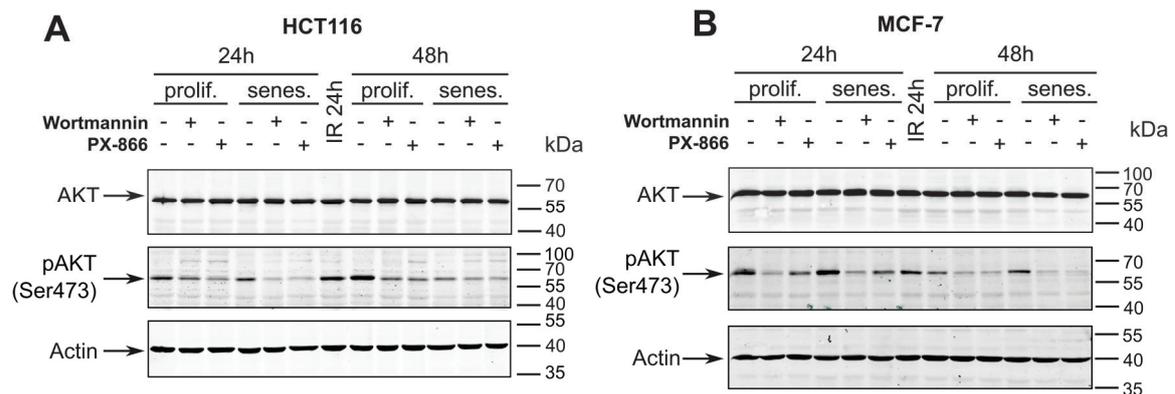


Abb. 13: Wortmannin und PX-866 reduzieren die AKT-Phosphorylierung. Seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung) und proliferierende Zellen wurden mit Wortmannin (3 μ M) oder PX (1 μ M) für 24 Stunden oder 48 Stunden inkubiert. Zellextrakte wurden hergestellt und mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. prolif. = proliferierend, senes. = seneszent.

3.5.2 Wortmannin und PX-866 beeinflussen die p53- und p21-Proteinexpression in seneszenten Zellen

Inwiefern Wortmannin und PX-866 den seneszenten Status der beiden Tumorzelllinien verändern, um Zelltod induzieren zu können, wurde anhand von Veränderungen der für die Seneszenz zentralen Proteine gezeigt. Der Transkriptionsfaktor p53 kann sowohl Seneszenz, als auch Apoptose induzieren und wird nach Bestrahlung in HCT116- und MCF-7-Zellen verstärkt stabilisiert. In diesen Zellsystemen kann p53 nach einer Behandlung mit ionisierender Strahlung über die Steigerung der Expression des CDK-Inhibitors p21 Zellzyklusarrest und Seneszenz vermitteln (Abbas and Dutta, 2009; Jänicke et al., 2008; Sohn et al., 2006). Im Allgemeinen spielt für die Induktion und Aufrechterhaltung der Seneszenz neben der p53-p21-Achse auch der Zellzyklusinhibitor p16 eine entscheidende Rolle. Die Genloci von p53 oder p16 sind allerdings in vielen Tumoren Ziel von Deletion oder epigenetischer Inhibition (Schosserer et al., 2017), sodass die Expression von funktionsfähigem p53 oder p16 nicht mehr möglich ist. Sowohl HCT116- als auch MCF-7-Zellen weisen zwar die Wildtyp-Form von p53 auf, allerdings besitzen

beide Zelllinien eine Inaktivierung des CDKN2A-Gens, sodass sie kein funktionsfähiges p16 exprimieren (Chakradeo et al., 2016). Somit können Veränderungen der p16-Expression in diesen Zelllinien als Ursache der senolytischen Wirkung von Wortmannin und PX-866 ausgeschlossen werden.

Um mögliche, durch Wortmannin und PX-866 verursachte Veränderungen des seneszenten Status auf Proteinebene feststellen zu können, wurden Zellextrakte angefertigt und mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Neben proliferierenden und seneszenten Zellen wurden auch Zellen untersucht, die nur 24 Stunden zuvor mit 10 Gy bestrahlt wurden (IR 24h), um die p53- und p21-Expression im Verlauf der Seneszenzinduktion beurteilen zu können. In HCT116-Zellen wurden sowohl p53 als auch p21 bereits 24 Stunden nach Bestrahlung verstärkt exprimiert (IR 24h), jedoch nahm insbesondere die p21-Expression im weiteren Verlauf der Seneszenzinduktion zu (Abb. 14 A). Proliferierende HCT116-Zellen zeigten eine basale p53-Expression, die durch Wortmannin oder PX-866 in den verwendeten Konzentrationen nicht verändert wurde. Die Expression von p21 wurde in proliferierenden HCT116-Zellen kaum detektiert. In seneszenten HCT116-Zellen verringerten sowohl Wortmannin als auch PX-866 die p53-Expression, beide Substanzen reduzierten die p21-Expression aber noch deutlicher. Die Effekte von Wortmannin und PX-866 auf die p53- und p21-Expression schienen unabhängig davon zu sein, ob die Zellen für 24 oder 48 Stunden mit den beiden Inhibitoren inkubiert wurden.

In proliferierenden MCF-7-Zellen wurde p21 nicht detektiert und auch nach Behandlung mit Wortmannin oder PX-866 war hier keine Änderung festzustellen (Abb. 14 B). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in den HCT116-Zellen wurde in seneszenten MCF-7-Zellen die p53-Expression durch Gabe von Wortmannin oder PX-866 nicht reduziert (Abb. 14 B). Überraschenderweise kam es aber wie bei seneszenten HCT116-Zellen auch in den seneszenten MCF-7-Zellen zu einer starken Abnahme von p21, die nach 48-stündiger Inkubation noch etwas deutlicher erkennbar war als nach 24-stündiger Inkubation mit Wortmannin und PX-866.

Auf Proteinebene bewirkten Wortmannin und PX-866 in den eingesetzten Konzentrationen also Veränderungen der für die Seneszenzinduktion und -aufrechterhaltung zentralen Proteine p53 und/ oder p21. In seneszenten MCF-7-Zellen wurde die p53-Expression durch die beiden Substanzen zwar nicht beeinflusst, interessanterweise kam es aber in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der p21-Expression.

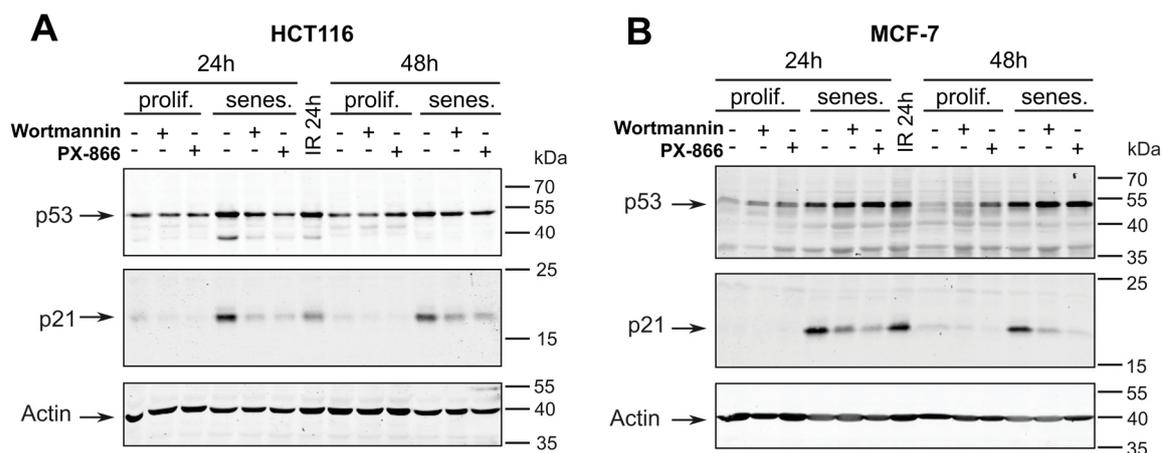


Abb. 14: Wortmannin und PX-866 reduzieren die p53- und p21-Expression in seneszenten Zellen. Seneszenz (Tag 7 nach Bestrahlung) und proliferierende Zellen wurden mit Wortmannin (3 μ M) oder PX (1 μ M) für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Als Referenzprobe für die p53- und p21-Expression dienten Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy (IR 24h). Zellextrakte wurden hergestellt und mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. prolif. = proliferierend, senes. = seneszent.

3.5.3 Identifizierung möglicher Angriffspunkte von Wortmannin und PX-866 in seneszenten Zellen

Wortmannin ist ein irreversibler pan-spezifischer PI3K-Inhibitor und kann somit alle PI3K der Klasse I (α -, β -, γ - und δ -Isoform) inhibieren (siehe auch Kapitel 4.3.1). Konzentrationsabhängig gehören auch die Klasse III PI3K (VPS34), PI-4-Kinase β , DNA-PK, ATM und der Autophagie-Regulator *mammalian target of rapamycin* (mTOR) zu den Zielproteinen von Wortmannin, da ihre katalytischen Domänen homolog sind und sie daher alle zu den *PI3K-related-kinases* gehören (Cardenas et al., 1998). PX-866 ist ebenfalls ein irreversibler pan-spezifischer Inhibitor der Klasse I PI3K, jedoch werden andere Vertreter der *PI3K-related-kinases* nicht inhibiert (Zask et al., 2008; Zhao et al., 2017). Beide Substanzen beeinflussen demnach die PI3K/AKT/mTOR-Achse (siehe Kapitel 4.3.1). Um zu evaluieren, inwieweit die senolytische Aktivität von PX-866 und Wortmannin tatsächlich auf der Inhibition der PI3K/AKT/mTOR-Achse beruht und um den molekularen Mechanismus weiter zu spezifizieren, wurden weitere Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs hinzugezogen (siehe Tabelle 10).

Obwohl NVP-BE2235 zu den Inhibitoren der Klasse I PI3K gehört, kann diese Substanz jedoch konzentrationsabhängig auch mTOR und die DNA-Schädigungskinasen ATM und ATR sowie DNA-PK inhibieren und zeigt somit eine Überschneidung mit dem Wirkspektrum von Wortmannin (Mukherjee et al., 2012). BYL719 hingegen ist ein selektiver Inhibitor der p110 α -Isoform der Klasse I PI3K und wurde ausgewählt, um eine mögliche Isoform-Abhängigkeit feststellen zu können (Méndez-Pertuz et al., 2017). Als Negativkontrollen und um mögliche Nebeneffekte von Wortmannin und PX-866 auf andere PI3K auszuschließen,

wurden SAR405 und 3-Methyladenin (3-MA) verwendet, die beide die Klasse III PI3K (VPS34) inhibieren. 3-MA kann jedoch konzentrationsabhängig auch Klasse I PI3K inhibieren (Ronan et al., 2014; Wu et al., 2010). Neben den PI3K-Inhibitoren wurden auch der AKT-Inhibitor MK2206 und der mTOR-Inhibitor Torin2 auf ihr senolytisches Potential hin untersucht, um zu evaluieren, inwiefern eine direkte Inhibition der PI3K für den beobachteten senolytischen Effekt erforderlich ist oder ob eine Inhibition des Signalwegs an späterer Stelle ebenfalls senolytisch wirkt. Die Inhibitoren wurden in gängigen, der Literatur entnommenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Tabelle 10) und jeweils auf proliferierende und seneszente HCT116- und MCF-7-Zellen getestet. Zur Quantifizierung des Zelltodes dienten die Messung der PI-Aufnahme (Abb. 15) und der LDH-Zytotoxizitätstest (Abb. 16) jeweils nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren.

Inhibitor	Zielproteine	Selektivität	Konzentrationen (μM)	Quelle für Konzentrationen
Wortmannin	PI3K, mTOR, PI-4K, DNA-PK, ATM, ATR	PI3K Klasse I	3 - 30	Ermittelt im Screening
PX-866	PI3K	PI3K Klasse I	1 - 10	Ermittelt im Screening
NVP-BEZ235	PI3K, mTOR, ATM, ATR	PI3K Klasse I	0,01 - 0,25	Maira et al., 2008
BYL719	PI3K	PI3K Klasse I α	5 - 50	Gobin et al., 2015
SAR405	PI3K	PI3K - Klasse III (VPS34)	1 - 10	Ronan et al., 2014 und persönl. Kommunikation David Schlütermann (AG Stork) HHU Düsseldorf
3-MA	PI3K	PI3K - Klasse III (VPS34) PI3K Klasse I	100 - 5000	Wu et al., 2010 und persönl. Kommunikation David Schlütermann (AG Stork) HHU Düsseldorf
MK2206	AKT	Isoformen 1,2,3	5 - 25	Sefton et al., 2013
Torin2	mTOR, ATM, ATR, DNA-PK	mTORC1 (kompetitiv)	0,1 - 1	Liu et al., 2013

Tabelle 10: Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs (Zusammengestellt aus Cardenas et al., 1998; Furet et al., 2013; Gobin et al., 2015; Howes et al., 2007; Ihle et al., 2006; Liu et al., 2013; Maira et al., 2008; Mukherjee et al., 2012; Pasquier, 2015; Ronan et al., 2014; Sefton et al., 2013; Wu et al., 2010)

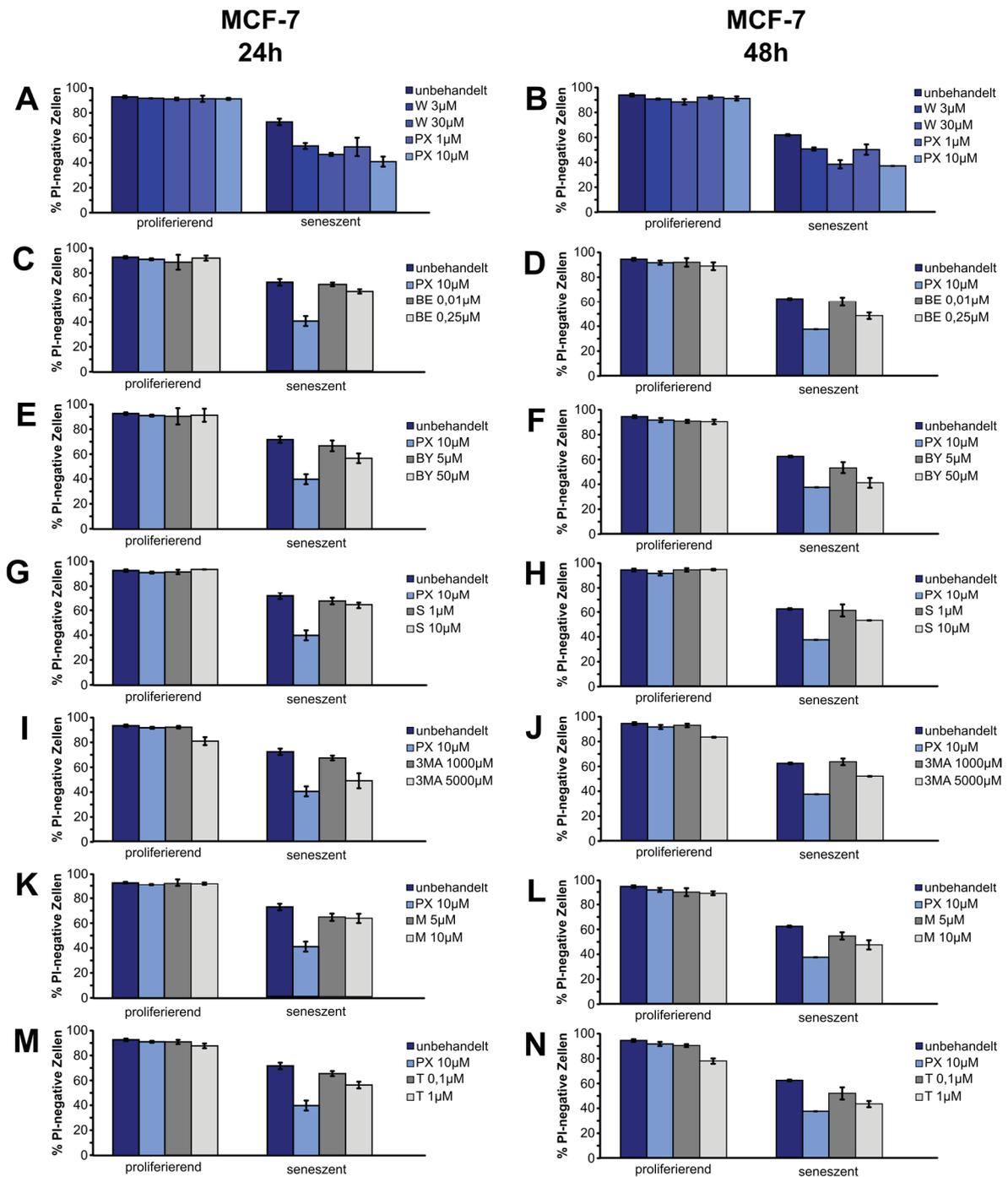


Abb. 15: Evaluation der senolytischen Wirkung verschiedener Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in MCF-7-Zellen. Proliferierende und seneszente (Tag 7 nach Bestrahlung) MCF-7-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Der Zelltod wurde quantifiziert mittels durchflusszytometrischer Messung der PI-Aufnahme. Zur besseren Vergleichbarkeit befinden sich in jedem Diagramm unbehandelte proliferierende und seneszente Zellen (dunkelblau), sowie mit PX-866 (10 µM) behandelte Zellen (hellblau). Die Inhibitoren sind jeweils in grau dargestellt. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar. W = Wortmannin, PX = PX-866, BE = NVP-BE2235, BY = BYL719, S = SAR405, 3-MA = 3-Methyladenin, M = MK2206, T = Torin2

Als Positivkontrollen für einen senolytischen Effekt wurden Wortmannin und PX-866 eingesetzt. Der größte senolytische Effekt konnte hierbei jeweils mit PX-866 (10 μ M) erzielt werden (Abb. 15 A, B).

Die eingesetzten Inhibitoren zeigten unterschiedliche Effekte auf seneszente und proliferierende MCF-7-Zellen (Abb. 15 C-N). Interessanterweise erreichte der p110 α spezifische PI3K-Inhibitor BYL719 nach 48 Stunden eine ähnliche Reduktion der lebenden seneszenten Zellen wie PX-866, während die Zahl der lebenden proliferierenden Zellen nicht nennenswert beeinflusst wurde (Abb. 15 F). Die senolytische Wirkung von BYL719 tritt somit verzögert ein, ist aber in ihrem Ausmaß mit der von PX-866 vergleichbar. Der pan-PI3K-Inhibitor NVP-BEZ235 und der AKT-Inhibitor MK2206 zeigten ebenfalls erst verzögert eine zytotoxische Wirkung auf seneszente Zellen (Abb. 15 D, L). Allerdings sind die Effekte beider Inhibitoren weniger stark ausgeprägt als bei BYL719.

Einen vergleichsweise schwachen zytotoxischen Effekt hatte der Klasse III-PI3K-Inhibitor SAR405. Erst nach 48 Stunden war überhaupt eine geringe Zunahme des Zelltods seneszenten Zellen zu erkennen (Abb. 15 H). Sowohl der Klasse I & III-Inhibitor 3-MA, als auch der mTOR-Inhibitor Torin2 zeigten zwar nach 48 Stunden eine erkennbare Reduktion der lebenden seneszenten Zellen (Abb. 15 J, N), jedoch reduzierten beide auch die Anzahl der proliferierenden Zellen. Somit kann ihre Wirkung nicht als senolytisch eingeordnet werden.

Darüber hinaus wurde das senolytische Potential dieser Inhibitoren mittels Messung der freigesetzten LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand von HCT116-Zellen bestimmt (Abb. 16). Als Positivkontrollen für einen senolytischen Effekt dienten hier ebenfalls PX-866 und Wortmannin (Abb. 16 A, B).

Weder in seneszenten, noch in proliferierenden HCT116-Zellen zeigte der pan-PI3K-Inhibitor NVP-BEZ235 einen nennenswerten Effekt (Abb. 16 C, D). Hingegen zeigten die VPS34-selektiven Inhibitoren 3-MA und SAR405 sowie der p110 α -selektive Inhibitor BYL719 zumindest eine schwach ausgeprägte zytotoxische Wirkung auf seneszente HCT116-Zellen nach 48 Stunden, während proliferierende Zellen nicht beeinflusst wurden (Abb. 16 F, H, J). Allerdings konnten alle drei Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen nicht die durch PX-866 erzielten Zelltodzahlen in seneszenten Zellen erzielen. Der mTOR-Inhibitor Torin2 zeigte einen ähnlich schwach ausgeprägten Effekt auf seneszente Zellen, allerdings war hier nach 48 Stunden auch eine beginnende zytotoxische Wirkung auf die proliferierenden Zellen zu erkennen (Abb. 16 N). Der AKT-Inhibitor MK2206 war (insbesondere in der hohen Konzentration) sogar stark zytotoxisch für seneszente und proliferierende HCT116-Zellen und stellt somit ebenfalls keinen geeigneten Kandidaten für eine senolytische Therapie dar.

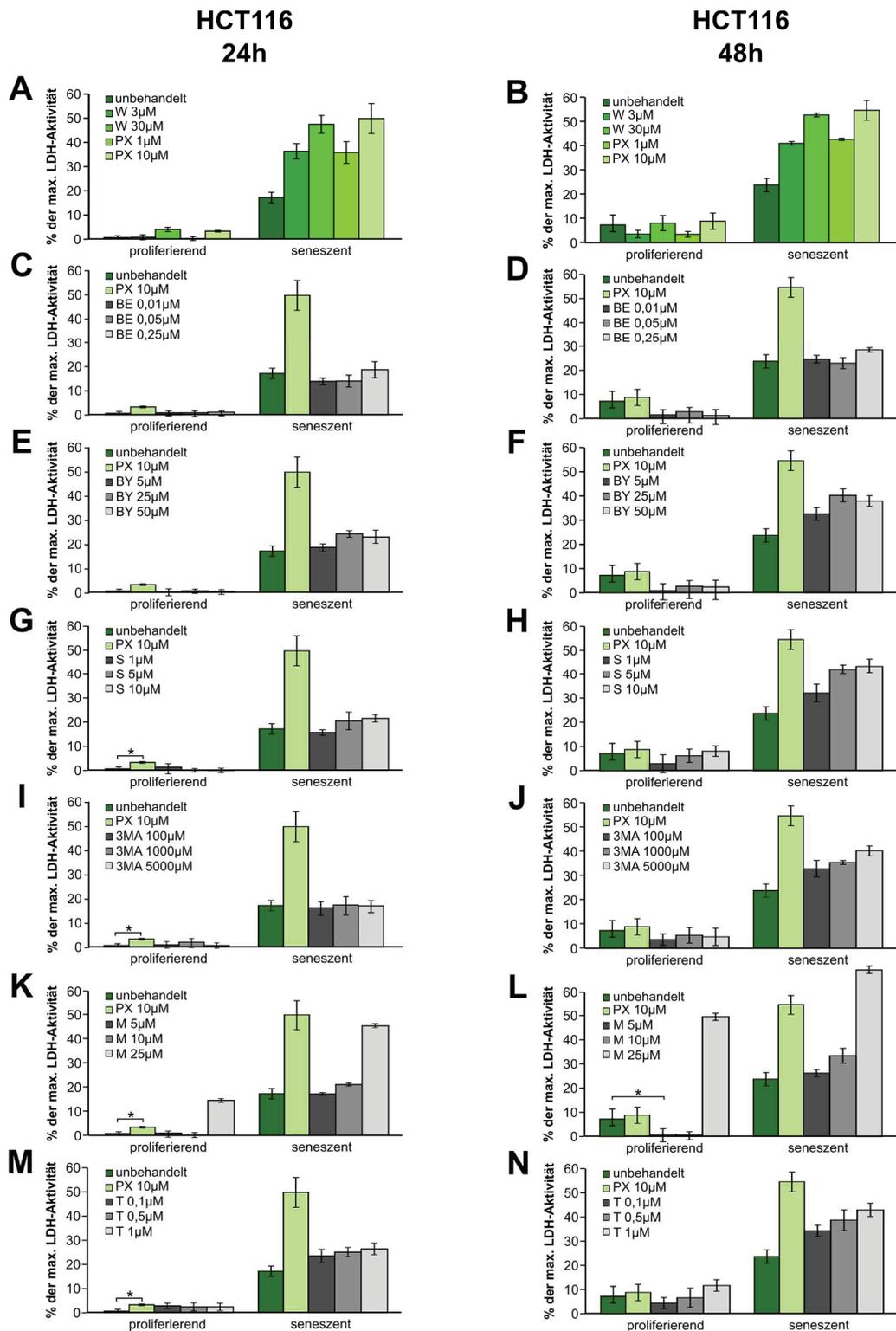


Abb. 16: Evaluation der senolytischen Wirkung von Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in HCT116-Zellen. Seneszenz (Tag 7 nach Bestrahlung mit 10 Gy) und proliferierende HCT116-Zellen wurden mit den Inhibitoren für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Die LDH-Aktivitäten wurden in den Zellüberständen ermittelt und zur maximal freisetzbaren LDH-Aktivität ins Verhältnis gesetzt. Die basal freigesetzte LDH-Aktivität unbehandelter proliferierender und seneszenten HCT116-Zellen ist jeweils in dunkelgrün dargestellt. Die verschiedenen Inhibitoren (in Graustufen) wurden mit PX-866 (10 µM) (hellgrün) verglichen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar (Ausnahme: MK2206 25 µM nur n=2). W = Wortmannin, PX = PX-866, BE = NVP-BE235, BY = BYL719, S = SAR405, 3-MA = 3-Methyladenin, M = MK2206, T = Torin2.

Zusammenfassend konnte mit keinem der getesteten Inhibitoren der senolytische Effekt von PX-866 vollständig reproduziert werden. Der mTOR-Inhibitor Torin2 erwies sich für proliferierende MCF-7-Zellen und in geringerem Maße auch für proliferierende HCT116-Zellen als zytotoxisch und scheidet somit als senolytischer Kandidat aus. Ähnlich verhält es sich mit dem AKT-Inhibitor MK2206, der aufgrund seiner starken zytotoxischen Wirkung auf proliferierende HCT116-Zellen ebenfalls keine senolytische Aktivität zeigte. Allerdings konnte in MCF-7-Zellen ein geringer senolytischer Effekt gezeigt werden. Der Autophagie-Inhibitor 3-MA erwies sich vor allem für proliferierende MCF-7-Zellen als zytotoxisch und zeigte auch in HCT116-Zellen keine selektive Eliminierung seneszenten Zellen. Der VPS34-Inhibitor SAR405 beeinflusste in beiden Tumorzelllinien den Anteil lebender proliferierender Zellen in den verwendeten Konzentrationen nicht und zeigte verzögert eine geringe Zunahme der Zelltodrate seneszenten Zellen, jedoch war der senolytische Effekt insgesamt eher schwach ausgeprägt. Der Klasse I-PI3K-Inhibitor NVP-BEZ235 zeigte in MCF-7-Zellen einen ähnlich schwach ausgeprägten senolytischen Effekt, allerdings wurde in HCT116-Zellen die Zelltodrate seneszenten Zellen nicht nennenswert beeinflusst.

Der p110 α -spezifische PI3K-Inhibitor BYL719 zeigte als einziger in beiden Zelllinien eine senolytische Wirkung, wobei der Effekt in MCF-7-Zellen stärker ausgeprägt war. In dieser Zelllinie wurden die seneszenten Zellen fast genauso effektiv abgetötet wie mit PX-866, während die Anzahl lebender proliferierender Zellen nicht beeinflusst wurde. Dieser Inhibitor ist somit interessant für weiterführende Untersuchungen, um den molekularen Wirkmechanismus der senolytischen Substanzen Wortmannin und PX-866 in HCT116- und MCF-7-Zellen genauer zu charakterisieren.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung potentieller Senolytika in HCT116- und MCF-7-Zellen

4.1.1 Die Wirkung von Senolytika ist abhängig vom Zelltyp

Die ersten als senolytisch eingestuften Substanzen waren der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib und das Flavonol Quercetin (Zhu et al., 2015). Dasatinib wirkte in Präadipozyten senolytisch, während es in HUVECs durch die Substanz kaum zu einer Reduktion der seneszenten Zellen kam. Umgekehrt konnte für Quercetin ein senolytischer Effekt in HUVECs nachgewiesen werden, jedoch nicht in Präadipozyten (Zhu et al., 2015). Sowohl HUVECs als auch Präadipozyten sind primäre Zellen, also Zellen, die direkt aus einem Gewebeverband isoliert wurden und nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit besitzen. Auch in alternden Mäusen konnte die gleichzeitige Gabe von Dasatinib und Quercetin die Anzahl seneszenten Zellen unter anderem in der Leber und im Fettgewebe reduzieren. Es zeigte sich durch Applikation beider Substanzen eine generelle Verlängerung der Gesundheitsspanne sowie eine verbesserte kardiale und vaskuläre Funktionalität (Zhu et al., 2015). Dasatinib und Quercetin scheinen demnach *in vivo* also auf mehrere Zelltypen senolytisch zu wirken. Der senolytische Effekt beider Substanzen wurde allerdings lediglich im Bereich der altersassoziierten Erkrankungen evaluiert und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur in nicht-malignen Zellen gezeigt. Bei den in dieser Arbeit getesteten immortalisierten Tumorzelllinien HCT116 und MCF-7 konnte keine selektive Eliminierung seneszenten Zellen durch Dasatinib und Quercetin beobachtet werden (Kapitel 3.1). Da der seneszente Status sich zelltypabhängig unterschiedlich manifestieren kann (Hernandez-Segura et al., 2017), muss also auch die Reaktion auf eine als senolytisch eingestufte Substanz nicht immer gleich ausfallen. Eine andere Arbeitsgruppe überprüfte die senolytische Aktivität der beiden Substanzen ebenfalls in Tumorzellen (Hepatozelluläres-Karzinom, HCC), die durch Chemotherapeutika in die Seneszenz getrieben wurden. Auch hier zeigte sich, dass die Anzahl seneszenten HCC-Zellen durch Dasatinib und Quercetin nicht reduziert werden konnte (Kovacovicova et al., 2018). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint es deshalb nicht verwunderlich, dass Dasatinib und Quercetin auch in den hier verwendeten Tumorzelllinien (HCT116- und MCF-7) keine selektive Eliminierung seneszenten Zellen hervorriefen (Abb. 6).

Der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin demonstrierte zwar in verschiedenen primären, nicht-malignen Zellen eine senolytische Aktivität (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017), jedoch nicht in HCT116- und MCF-7-Zellen (Abb. 6). Auch diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass Senolytika nicht nur zelltypspezifisch agieren, sondern dass deren Wirkung auch davon abhängig zu sein scheint, ob es sich um Tumorzellen oder um nicht-maligne

Zellen handelt. Des Weiteren wurde im Fall von Geldanamycin die Seneszenz durch oxidativen Stress in Ercc1-defizienten MEF-Zellen induziert, die eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität besitzen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden allerdings durch ionisierende Strahlung in die Seneszenz gebracht. Somit könnte die senolytische Wirkung einer Substanz nicht nur abhängig vom vorliegenden Zelltyp, sondern auch vom Seneszenz-induzierenden Mechanismus sein.

Es ist auch zu berücksichtigen, dass sowohl Dasatinib und Quercetin als auch Geldanamycin die p16-Expression in primären Zellen reduzieren (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017; Zhu et al., 2015). Es wäre möglich, dass die senolytische Wirkung also über die Inhibition der p16-Wirkung vermittelt wird und die Substanzen daher nur in Zellen senolytisch wirken, die p16 exprimieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 besitzen allerdings beide kein funktionsfähiges p16 (Chakradeo et al., 2016; Mirzayans et al., 2012) und sind daher für die Induktion und Aufrechterhaltung des seneszenten Status auf die p53-p21-Achse angewiesen. Möglicherweise konnten also die Substanzen in den verwendeten HCT116- und MCF-7-Zellen keine senolytische Wirkung zeigen, da diese Zelllinien ihren seneszenten Status über p21 aufrechterhalten und die p21-Wirkung eventuell weniger stark inhibiert wird als die von p16.

Die senolytische Wirkung einer Substanz ist demnach von verschiedenen Faktoren abhängig. Einerseits spielt der vorliegende Zell- bzw. Gewebetyp eine Rolle, wobei insbesondere die Unterscheidung zwischen Tumorzellen und nicht-malignen Zellen relevant zu sein scheint. Des Weiteren könnte die senolytische Wirkung abhängig vom Seneszenz-induzierenden Stimulus sein, da unterschiedliche Seneszenz-auslösende Stimuli zu Unterschieden im Expressionsprofil der seneszenten Zellen führen (Purcell et al., 2014). Dies könnte dazu führen, dass seneszente Zellen sehr unterschiedliche Reaktionen auf ein potentielles Senolytikum zeigen und daher muss beispielsweise eine Substanz, die in replikativ-seneszenten Zellen senolytisch wirkt, nicht zwangsläufig auch in DNA-Schädigungs-induzierten oder Onkogen-induzierten seneszenten Zellen senolytisch agieren. Vor diesem Hintergrund wäre es nun äußerst interessant zu untersuchen, inwieweit der hier in dieser Arbeit als Senolytikum identifizierte PI3K-Inhibitor PX-866 auch in primären Zellen wie z.B. HUVECs oder Präadipozyten eine ähnliche Wirkung zeigt.

4.1.2 Seneszente Zellen zeigten sich im Naturstoff-Screening resistenter als proliferierende Zellen

Im Screening der insgesamt 180 Naturstoffe zeigte ein großer Anteil der Substanzen weder eine Wirkung auf proliferierende, noch auf seneszente Zellen (Abb. 7). Da nur ein begrenzter Konzentrationsbereich getestet werden konnte, würden möglicherweise manche Substanzen einen Effekt erst in höheren Konzentrationen demonstrieren. Eine

Konzentrationserhöhung, um eventuell maskierte senolytische Effekte sichtbar zu machen, ist selbstverständlich nicht in unbegrenztem Maß sinnvoll, da eine Substanz in ausreichend hoher Dosierung irgendwann für jede Zelle letal wäre. Darüber hinaus sollten die Substanzen auch in der Zellkultur in einem Konzentrationsbereich eingesetzt werden, der physiologisch erreichbare Konzentrationen im menschlichen Organismus widerspiegelt, damit die Voraussetzung für einen späteren klinischen Einsatz überhaupt gegeben ist. Da die maximale Plasmakonzentration von vielen Anti-Tumor-Therapeutika beispielsweise eher selten über 30 µM liegt (Liston and Davis, 2017), scheint somit eine weitere Konzentrationserhöhung der Naturstoffe im Rahmen des Screenings nicht zielführend.

Insgesamt befanden sich mit Wortmannin und Kahalalide F nur zwei Substanzen unter den 180 Naturstoffen, die im Screening als senolytisch klassifiziert werden konnten. Umgekehrt konnten jedoch einige Substanzen identifiziert werden, die proliferierende Zellen weitaus effektiver abtöteten als seneszente Zellen (siehe Abb. 7 B). Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass seneszente Zellen für gewöhnlich resistenter gegenüber zelltodinduzierenden Stimuli sind, da sie verstärkt anti-apoptotische Faktoren exprimieren (Sanders et al., 2013; Wang, 1995; Yosef et al., 2016). Hierzu zählt beispielsweise die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 (Childs et al., 2014). Aufgrund dieser Eigenschaft sind seneszente Zellen weniger empfindlich gegenüber toxischen Naturstoffen als proliferierende Zellen und reagieren erst bei deutlich höheren Konzentrationen mit der Induktion von Zelltod.

Einige Substanzen erwiesen sich als ebenso zytotoxisch für seneszente wie für proliferierende Zellen. Da für das Screening zwei Tumorzelllinien verwendet wurden, könnte evaluiert werden, ob diese Naturstoffe selektiv nur Tumorzellen abtöten oder ob sie in den verwendeten Konzentrationen auch zytotoxisch für nicht-maligne Zellen sind. Hierfür könnten diese Substanzen beispielsweise auf Fibroblasten getestet werden. Substanzen, die nämlich eine selektive Zytotoxizität für Tumorzellen aufweisen, wären interessante Kandidaten für potentielle Chemotherapeutika. Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass eine dieser zytotoxischen Substanzen tatsächlich selektiv nur Tumorzellen angreift, da diese Substanzen effektiv sowohl proliferierende, als auch seneszente Tumorzellen gleichermaßen abgetötet haben und somit vermutlich eine Inhibition zentraler, essentieller intrazellulärer Vorgänge stattgefunden haben muss. Mit großer Wahrscheinlichkeit würden diese Substanzen daher auch für nicht-maligne Zellen zytotoxisch sein.

4.1.3 Kahalalide F als potentielles Senolytikum in HCT116-Zellen

Eine der beiden Substanzen, die im Kristallviolett-Screening als senolytisch eingestuft wurden, ist Kahalalide F. Für diese Substanz wurde bereits eine zytotoxische Wirkung auf verschiedene Tumorzelllinien wie beispielsweise Prostata-, Mamma- (unter anderem auch

MCF-7) und Bronchialkarzinomzellen beschrieben (Beesoo et al., 2014). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass nicht-maligne Zelllinien wie z.B. IMR90 oder HUVEC weniger empfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Kahalalide F sind (Suárez et al., 2003). Generell macht diese Eigenschaft Kahalalide F zu einem potentiellen Kandidaten für den klinischen Einsatz, da idealerweise die gesunden, nicht-malignen Zellen des Organismus nicht angegriffen werden sollen. Kahalalide F wurde bereits im Rahmen von klinischen Phase-I und II-Studien als Anti-Tumor-Therapeutikum getestet (Miguel-Lillo et al., 2015). Das senolytische Potential von Kahalalide F wurde allerdings bisher weder beschrieben noch untersucht.

Auch die hier verwendeten Tumorzelllinien HCT116 und MCF-7 reagierten mit gesteigerter Zelltodinduktion nach Inkubation mit Kahalalide F (Kapitel 3.2). Die starke Zytotoxizität gegenüber beiden Tumorzelllinien (insbesondere in den höheren Konzentrationen) bestätigt die schon beschriebene antitumoröse Wirkung der Substanz. Interessanterweise gab es jedoch einen Konzentrationsbereich (bei ca. 10 μM), in dem seneszente HCT116-Zellen im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest empfindlicher gegenüber Kahalalide F waren als proliferierende Zellen (Abb. 8). Die senolytische Wirkung konnte allerdings mit der Quantifizierung der freigesetzten LDH-Aktivität nicht reproduziert werden. Möglich wäre es, Kahalalide F in kleinschrittigeren Konzentrationsstufen zu testen, um so auch mit anderen Methoden den Bereich zu ermitteln, in dem Kahalalide F eine senolytische Wirkung zeigt. Fraglich bleibt, ob die senolytische Wirkung von Kahalalide F mit einem derart kleinen Wirkfenster überhaupt im Patienten nutzbar gemacht werden kann, da dort die Plasmakonzentration der Substanz weitaus größeren Schwankungen als in der Zellkultur unterliegen kann. Interessanterweise gibt es bereits ein Analogon von Kahalalide F, Elisidepsin, das eine geringere Toxizität aufweist und ebenfalls bereits in klinischen Phase-II-Studien Anwendung gefunden hat (Beesoo et al., 2014). Es könnte getestet werden, ob Elisidepsin ebenfalls eine senolytische Wirkung in den hier verwendeten Tumorzelllinien zeigt, möglicherweise aber mit einem breiteren Wirkfenster.

Der Wirkmechanismus von Kahalalide F konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden (Beesoo et al., 2014; Miguel-Lillo et al., 2015). Allerdings wurde bereits vor einigen Jahren beschrieben, dass die Substanz in die Organisation der Lysosomen eingreifen kann (García-Rocha et al., 1996; Janmaat, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit Kahalalide F behandelt wurden, eine extreme Größenzunahme und veränderte Membranpermeabilität ihrer Lysosomen aufweisen (Suárez et al., 2003). Da Tumorzellen vom normalen Zellmetabolismus abweichen können, um die kontinuierliche Proliferation aufrecht zu erhalten und ihr Überleben zu sichern, kann dies unter anderem dazu führen, dass sie von lysosomalen Recycling-Programmen abhängig werden (Fennelly and Amaravadi, 2017). Falls der Hauptwirkmechanismus von Kahalalide F tatsächlich in einer

lysosomalen Funktionseinschränkung liegt, könnten Tumorzellen, die einen größeren Anteil an lysosomaler Masse besitzen (wie z.B. Prostatakarzinomzellen), empfindlicher gegenüber der Substanz sein (García-Rocha et al., 1996). Es ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass Zellen im Rahmen der Seneszenzinduktion ebenfalls ihre lysosomale Masse vermehren (Carnero, 2013; Dimri et al., 1995). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die beobachtete senolytische Wirkung von Kahalalide F in seneszenten HCT116-Zellen sein. So könnte es ebenfalls möglich sein, dass auch nicht-maligne Zellen, die eigentlich unempfindlicher gegenüber Kahalalide F sind, durch Seneszenzinduktion empfindlicher gegenüber der Substanz werden. Demnach könnte das senolytische Potential von Kahalalide F (oder auch von seinem klinischen Derivat Elisidepsin) auch in weiteren Zelllinien getestet werden, da die Zunahme der lysosomalen Masse ein allgemeines Merkmal zellulärer Seneszenz ist und Kahalalide F somit durchaus das Potential besitzt, in mehreren Zelllinien eine senolytische Aktivität zu zeigen.

Interessanterweise wurde durch eine weitere Arbeitsgruppe beschrieben, dass Kahalalide F in den PI3K/AKT-Signalweg eingreifen kann, indem es eine Abnahme der AKT-Phosphorylierung bewirkt (Janmaat, 2005). Da auch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten senolytischen Substanzen Wortmannin und PX-866 den PI3K/AKT-Signalweg inhibieren, könnte der beobachtete senolytische Effekt von Kahalalide F auch auf der Inhibition dieses Signalweges beruhen (für weitere Informationen zum PI3K/AKT/mTOR-Signalweg siehe Kapitel 4.3).

4.2 Wortmannin und PX-866 stellen neu identifizierte Senolytika in HCT116- und MCF-7-Zellen dar

4.2.1 Wortmannin und PX-866 induzieren selektiv Zelltod in seneszenten HCT116- und MCF-7-Zellen

Der PI3K-Inhibitor Wortmannin erwies sich im Screening der Naturstoffbibliothek ebenfalls als senolytisch, jedoch in einem deutlich breiteren Konzentrationsbereich als Kahalalide F (Abb. 9). Im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz ist Wortmannin allerdings nachteilig. Zum einen besitzt die Substanz eine sehr geringe Halbwertszeit in wässrigen Lösungen, zum anderen zeigte Wortmannin im Mausmodell eine deutliche Hepatotoxizität und eine schlechte Pharmakokinetik (Howes et al., 2007). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit evaluiert, ob auch PX-866, ein klinisch vorteilhafteres Derivat von Wortmannin, in den beiden Tumorzelllinien ebenfalls einen senolytischen Effekt ausübt. PX-866 ist durch die Öffnung des Furanrings deutlich stabiler als Wortmannin und kann PI3K bereits bei geringeren Konzentrationen inhibieren (Zask et al., 2008). Im Mausmodell erwies es sich

als deutlich geringer hepatotoxisch und zeigte eine günstigere Pharmakokinetik (Howes et al., 2007) und auch die Anwendbarkeit im Menschen wurde bereits in klinischen Phase-II Studien überprüft und bestätigt (Bowles et al., 2016; Pitz et al., 2015).

Im initialen Screening mithilfe des Kristallviolett-Zytotoxizitätstests konnte durch Wortmannin und PX-866 nur ein vergleichsweise geringer Unterschied zwischen den Überlebenskurven seneszenten und proliferierender Zellen erzielt werden (Abb. 9). In den zur Verifikation des senolytischen Effekts durchgeführten Versuchen wurde jedoch deutlich, dass fast ausschließlich seneszente Zellen abgetötet werden und der senolytische Effekt somit deutlich stärker ausfällt als zunächst im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest angenommen. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass die verwendeten Methoden den Zelltod auf unterschiedliche Arten quantifizieren.

Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest werden adhärente Zellen fixiert und gefärbt, während tote Zellen, die sich abgelöst haben und sich deshalb im Zellüberstand befinden, entfernt werden. Es ist bereits mehrfach beschrieben worden, dass Wortmannin und PX-866 die Proliferation von Tumorzellen inhibieren (Courtney et al., 2010; Hossain et al., 2012; Howes et al., 2007). Durch eine Proliferationshemmung verbleiben allerdings im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest auch weniger adhärente Zellen, die fixiert und gefärbt werden können. Das im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest gemessene Signal gibt lediglich die Menge der verbliebenen adhären Zellen wieder, sodass mit dieser Methode nicht eindeutig differenziert werden kann, ob ein niedrigeres Signal aufgrund einer Proliferationshemmung oder aufgrund von Zelltodinduktion gemessen wurde. Wortmannin und PX-866 haben im initialen Screening also das Signal seneszenten Zellen durch die Induktion von Zelltod reduziert, während proliferierende Zellen lediglich in ihrem Wachstum inhibiert wurden. Der senolytische Effekt wirkte deshalb zunächst weniger deutlich.

Verifiziert wurde die senolytische Aktivität von Wortmannin und PX-866 mit der Messung der PI-Aufnahme und der Messung der LDH-Aktivität im Zellüberstand, da diese beiden Methoden eine Differenzierung zwischen Proliferationshemmung und Zelltodinduktion erlauben. Sowohl in HCT116- als auch in MCF-7-Zellen konnte unter Verwendung dieser Methoden gezeigt werden, dass seneszente Zellen durch beide Substanzen selektiv abgetötet werden, während der Anteil lebender proliferierender Zellen unbeeinflusst blieb (Kapitel 3.4).

4.2.2 Wortmannin und PX-866 heben den seneszenten Status von HCT116- und MCF-7-Zellen auf

Seneszenz kann unter anderem durch den CDK-Inhibitor p16 vermittelt werden, jedoch wird dieser von HCT116- und MCF-7-Zellen nicht exprimiert, weshalb beide Zelllinien für die Seneszenzinduktion auf die Aktivierung der p53-p21-Achse angewiesen sind (siehe

Kapitel 1.1). In HCT116-Zellen führten Wortmannin und PX-866 zu einer Reduktion der p53- und p21-Expression (Abb. 14). Für p53-defiziente HCT116-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass sie refraktär gegenüber Seneszenz-induzierenden Stimuli sind und es stattdessen in diesen Zellen zur Induktion von Zelltod kommt (Sohn et al., 2006). Die Inaktivierung der p53-Expression mittels RNA-Interferenz führte in bereits seneszenten MEF-Zellen dazu, dass der seneszente Status sogar wieder aufgehoben wurde und die Zellen erneut in den Zellzyklus eintraten (Dirac and Bernards, 2003). Auch bei replikativ seneszenten Fibroblasten führte die Inaktivierung von p53 zu einer Wiederaufnahme der Proliferation, allerdings nur bei Zellen mit gleichzeitig niedriger p16-Expression (Beausejour, 2003). Mehrfach beschrieben wurde auch die zentrale Funktion von p21 für die dauerhafte Aufrechterhaltung des seneszenten Status und das Überleben seneszenter Zellen (Muñoz-Espín and Serrano, 2014; Yosef et al., 2017). Für seneszente HCT116-Zellen könnte es bedeuten, dass der seneszente Status unter einer Abnahme von p53 und p21 nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Eine Abnahme beider Proteine könnte zu einem erneuten Eintritt in den Zellzyklus führen und aufgrund des schon vorliegenden DNA-Schadens sowie dem Überwiegen pro-apoptotischer Stimuli die Induktion von Zelltod zur Folge haben.

Interessanterweise scheint in MCF-7-Zellen die senolytische Wirkung von Wortmannin und PX-866 p53-unabhängig zu sein, da hier nur eine Abnahme der p21-Expression beobachtet werden konnte, während die p53-Expression unverändert blieb (Abb. 14). Es wurde bereits beschrieben, dass p21 durch die Proteinkinase AKT p53-unabhängig phosphoryliert werden kann (unter anderem an Serin 146), was zu einer Stabilisierung von p21 führt (Li et al., 2002). So wäre es demnach möglich, dass eine Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch Wortmannin oder PX-866 umgekehrt zu einer Reduktion der p21-Stabilität führen könnte und zwar unabhängig von p53. Durch die deutliche Abnahme der p21-Expression in MCF-7-Zellen ist auch in dieser Zelllinie davon auszugehen, dass Wortmannin und PX-866 den seneszenten Status der Zellen aufheben könnten. Weiterführende Untersuchungen könnten Aufschluss darüber liefern, inwiefern sich der senolytische Wirkmechanismus von Wortmannin und PX-866 in HCT116- und MCF-7-Zellen unterscheidet. Interessant wäre es, den Mechanismus zu identifizieren, durch den die p53- und/oder p21-Expression reduziert wird, also herauszufinden, ob die Ursache in einer verringerten Transkription bzw. Translation, einem verstärkten proteasomalen Abbau oder einer Destabilisierung der Proteine liegt. Beispielsweise könnte auf Proteinebene evaluiert werden, inwiefern Wortmannin und PX-866 zu einer Abnahme der p21-Phosphorylierung an Serin 146 führen und so gegebenenfalls die p21-Stabilität beeinflussen. Zu testen bleibt auch, ob zwischen der Abnahme von p53 und/oder p21 und der senolytischen Wirkung von Wortmannin und PX-866 ein kausaler oder korrelativer

Zusammenhang besteht. Einerseits könnte die Abnahme von p53 und/oder p21 Ursache der Zelltodinduktion in seneszenten Zellen sein, andererseits könnten p53 und p21 lediglich als Folge im Rahmen eines anderen Mechanismus, der für den Zelltod verantwortlich ist, reduziert werden. Für einen korrelativen Zusammenhang zwischen der senolytischen Wirkung und der Abnahme der p53- und p21-Expression spricht, dass in proliferierenden Zellen, in denen die p53-p21-Achse nicht aktiv ist, kein Zelltod durch Wortmannin und PX-866 induziert wurde. Wird die Wirkung der beiden senolytischen Substanzen also über die Reduktion von p53 und /oder p21 vermittelt, wäre so auch erklärt, warum selektiv nur seneszente und nicht proliferierende Zellen eliminiert wurden.

Darüber hinaus ergibt sich die Fragestellung, welche Form des Zelltods nach Wortmannin und PX-866-Gabe in den seneszenten Zellen ausgelöst wird. Der zugrundeliegende Zelltodmechanismus in seneszenten HCT116-Zellen könnte mit dem von p53-defizienten Tumorzellen vergleichbar sein, bei denen eine Schädigung der DNA (z.B. durch Chemotherapeutika) zur sogenannten mitotischen Katastrophe führen kann (Nitta et al., 2004). Es handelt sich hierbei um eine sehr komplexe Signalkaskade, die durch einen inadäquaten Eintritt von Zellen in die Mitose aktiviert werden kann (Vitale et al., 2011). Durch PX-866 und Wortmannin könnte ein erneuter Eintritt der seneszenten Zellen in den Zellzyklus ermöglicht werden und beim Versuch der erneuten Zellteilung könnte dann durch den bereits vorliegenden DNA-Schaden die mitotische Katastrophe induziert werden (Gewirtz et al., 2016). Einerseits wäre es möglich, über Analyse des DNA-Gehalts im Kern zu verifizieren, ob seneszente Zellen durch Wortmannin und PX-866 tatsächlich erneut in den Zellzyklus eintreten. Auch die Messung der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Aufnahme könnte eine Antwort auf diese Fragestellung liefern, da BrdU während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird und so eine mögliche Wiederaufnahme der Proliferation seneszenten Zellen sichtbar machen kann. Um genauer zu charakterisieren, welche Form des Zelltods in den seneszenten Zellen induziert wird, könnten Caspaseinhibitoren zur Apoptoseinhibition oder Inhibitoren der Nekroptose (wie z.B. Nekrostatin-1) verwendet werden.

Zusammenfassend scheinen Wortmannin und PX-866 in der Lage zu sein, über Beeinflussung von p53 und/oder p21 den seneszenten Status der Tumorzellen aufzuheben. Weiterführende Versuche könnten Aufschluss darüber geben, über welche genauen molekularen Mechanismen die beiden PI3K-Inhibitoren die p53- und p21-Expression beeinflussen und so zum Abbruch des Seneszenzprogramms und zur Zelltodinduktion führen.

Untereinheiten, die die Aktivität und Lokalisation der PI3K modulieren können. Die Produkte der durch PI3K katalysierten Reaktionen, also PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ dienen als *second messenger* für viele verschiedene Signalwege in der Zelle, die unter anderem zelluläre Prozesse wie Apoptose, Autophagie, Migration und Proliferation beeinflussen (Ersahin et al., 2015).

PI3K	Aktiviert durch	Isoformen	Substrate	Produkte	Beteiligt an
IA	RTK, Ras	p110 α , p110 β , p110 δ	PtdIns, PtdIns(4)P, PIP₂	PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P ₂ , PIP₃	Zellwachstum, Rezeptor- Signalübertragung, (Autophagie)
IB	GPCR, Ras	p110 γ			
II	vermutlich GPCR, RTK	C2 α , C2 β C2 γ	PtdIns, PtdIns(4)P	PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P ₂	Endozytose
III	konstitutiv	VPS34	PtdIns		Autophagie, Endozytose

Tabelle 11: Isoformen der PI3-Kinasen (Erstellt nach Bader et al., 2005; Jean and Kiger, 2014)
RTK=Rezeptortyrosinkinase, GPCR=G *Protein-Coupled-Receptor*, PtdIns=Phosphatidylinositol

In vitro können die PI3Ks der Klasse I alle drei aufgeführten Substrate phosphorylieren, *in vivo* wird jedoch bevorzugt PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert (Bader et al., 2005). PIP₃ kann als *second messenger* weitere Kinasen wie AKT (Proteinkinase B) oder *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1) für ihre Aktivierung zur Membran rekrutieren (Abb. 18) (Jean and Kiger, 2014). Damit AKT vollständig aktiv ist, benötigt es die duale Phosphorylierung an Serin 473 (durch mTOR *Complex 2*/ mTORC2 oder DNA-PK) und an Threonin 308 (durch PDK1) (Syed et al., 2013). In der aktiven Form kann AKT nun zu Zellwachstums- und Proliferationsprozessen beitragen, indem es zahlreiche weitere Proteine phosphoryliert. Ein zentrales Substrat von AKT ist die Serin-Threonin-Kinase mTOR. Diese kann intrazellulär zwei Signalkomplexe formen, den mTOR *Complex 1* (mTORC1) und den mTOR *Complex 2* (mTORC2), wobei nur mTORC1 ein Substrat von AKT darstellt, während mTORC2 oberhalb von AKT an dessen Aktivierung beteiligt ist (Ersahin et al., 2015).

Die zentrale Rolle des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs für die Tumorentstehung ist schon seit langem bekannt. Genomische Analysen einer Vielzahl verschiedener Tumore zeigten, dass eine Überaktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs (neben der Inhibition des p53-Signalweges) zu den häufigsten Veränderungen der analysierten Tumore gehört (Sanchez-Vega et al., 2018).

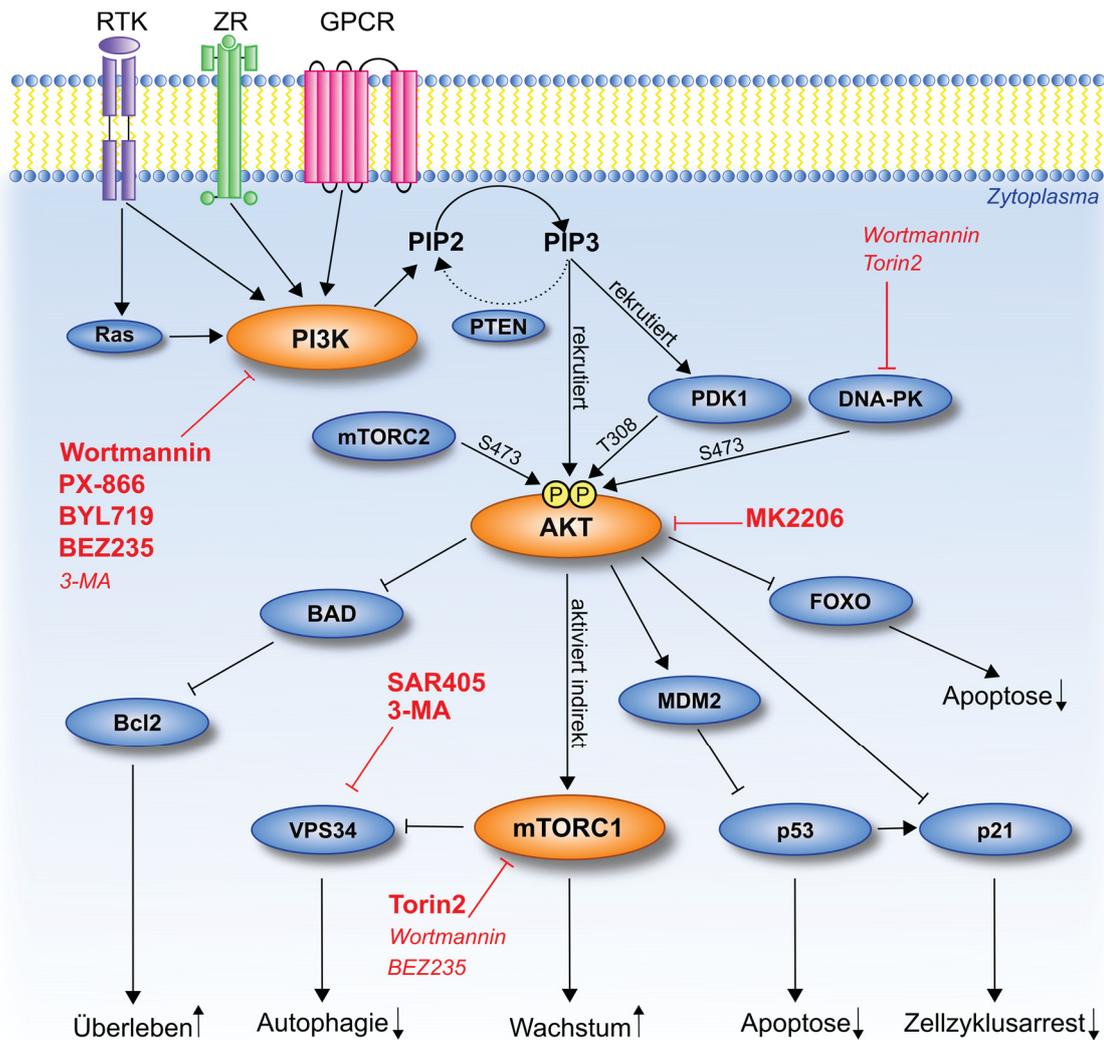


Abb. 18: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt Zellüberleben. PI3Ks können aktiviert werden durch Rezeptortyrosinkinasen, Ras, Zytokinrezeptoren oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Nach ihrer Aktivierung katalysieren PI3Ks die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. Die Phosphatase PTEN kann diese Phosphorylierung wieder aufheben. Durch PIP3 werden die Kinasen AKT und PDK1 zur Membran rekrutiert, was zur Phosphorylierung und Aktivierung von AKT führt. Die Aktivierung von mTORC1 bewirkt Zellwachstum und Proliferation. Apoptose, Autophagie und Zellzyklusarrest werden durch die AKT-Aktivität inhibiert. *Off-target*-Effekte der verwendeten Inhibitoren sind jeweils kursiv dargestellt. (Erstellt nach Courtney et al., 2010; Greer and Brunet, 2005; Pasquier, 2015; Zhao et al., 2017) RTK = Rezeptortyrosinkinase, ZR = Zytokinrezeptor, GPCR = G Protein-Coupled-Receptor.

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt auch für die Seneszenzinduktion und ihre Aufrechterhaltung eine zentrale Rolle. Die Induktion der Seneszenz kann beispielsweise durch AKT vermittelt werden, indem es über die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies die Expression von FOXO-Transkriptionsfaktoren hemmt (Nogueira et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass bei AKT-Defizienz die Onkogen-induzierte und die Stress-induzierte Seneszenz nicht eingeleitet werden können (Nogueira et al., 2008). Auch die Inhibition des AKT-Substrates mTOR mittels Rapamycin konnte die Seneszenzinduktion verhindern bzw. verzögern (Demidenko et al., 2009; Iglesias-Bartolome et al., 2012). Bei gleichzeitiger Gabe

mit einem Seneszenz-induzierenden Stimulus konnte der mTOR-Inhibitor Rapamycin bewirken, dass die Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation behielten. Eingeschränkt konnte der Verlust des proliferativen Potentials sogar verhindert werden, wenn Rapamycin verzögert, also 3 oder sogar 9 Tage nach Zugabe des initialen Seneszenz-induzierenden-Stimulus gegeben wurde (Demidenko et al., 2009).

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist aus einem weiteren Grund für seneszente Zellen von Bedeutung, da mTOR den proinflammatorischen SASP modulieren kann. Durch mTORC1-Inhibition mittels Rapamycin konnte in seneszenten Fibroblasten unter anderem die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6, das eine Hauptkomponente des SASP darstellt, vermindert werden (Laberge et al., 2015).

Neben der Seneszenzinduktion und SASP-Ausbildung ist der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auch an der langfristigen Aufrechterhaltung des seneszenten Status und dem Überleben seneszenter Zellen beteiligt. Seneszente Zellen zeigen eine Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli, um sich unter anderem vor ihrem eigenen pro-apoptotischen SASP zu schützen (Kirkland and Tchkonja, 2017). Durch Analyse von Proteinexpressionsprofilen seneszenter Zellen konnten mehrere anti-apoptotische Signalwege identifiziert werden, die in seneszenten Zellen verstärkt aktiv sind und ihr Überleben sichern. Durch gezielte Inhibition von an diesen Signalwegen beteiligten Proteinen kann der seneszente Status nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zur Zelltodinduktion (Kirkland et al., 2017). Zu den bisher identifizierten anti-apoptotischen Faktoren zählen beispielsweise die BCL-2/BCL-X_L-Familie und Hsp-90 Proteine. Auch PI3Ks wurden als Vertreter dieser für die Apoptoseresistenz verantwortlichen Faktoren beschrieben (Zhu et al., 2015).

In seneszenten Präadipozyten und HUVECs konnte durch Inhibition der PI3K δ Zelltod induziert werden, während das Ausschalten anderer PI3K-Isoformen sich in diesen Zelllinien allerdings nicht als senolytisch erwies (Zhu et al., 2015). Die δ Isoform wurde überraschenderweise bisher vor allem in hämatopoetischen Zellen beschreiben (Jean and Kiger, 2014; Zhu et al., 2015). Dass PI3Ks für die Aufrechterhaltung des seneszenten Status von Bedeutung sind, zeigen auch die Flavonole Quercetin und Fisetin, die in HUVECs als senolytisch eingestuft wurden (Zhu et al., 2017, 2015). Beide Substanzen inhibieren unter anderem unspezifisch PI3Ks, wobei Fisetin zusätzlich auch mTOR inhibieren kann (Syed et al., 2013, 2016; Zhu et al., 2015). Quercetin konnte allerdings weder in HCT116- noch in MCF-7-Zellen eine selektive Eliminierung seneszenter Zellen erreichen (zu möglichen Ursachen siehe Kapitel 4.1.1).

Auch die Ergebnisse von Fuhrmann-Stroissnigg et al. zeigen, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eine Rolle in der Aufrechterhaltung des seneszenten Status spielt (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017). Der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin und sein Derivat 17-DMAG (17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin) hatten in MEF-Zellen eine

senolytische Wirkung und bewirkten eine deutliche Abnahme der AKT-Phosphorylierung (bei konstanter *total*-AKT-Expression) in seneszenten Zellen, was zu der Annahme führte, dass Hsp90 AKT stabilisieren kann. Entsprechend vermuteten sie, dass die Hsp90-Inhibition die AKT-Phosphorylierung inhibiert und damit Zelltod in den seneszenten Zellen induziert (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017).

Es ist bereits bekannt, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auch eine Rolle in der Radioresistenz von Tumorzellen spielt und dass Inhibitoren dieses Signalwegs zu einer Radiosensitivierung bestrahlter Tumorzellen führen, wenn sie kurz vor oder gleichzeitig mit einer Bestrahlung appliziert wurden (Holler et al., 2016; Yu et al., 2017). Beispielsweise konnte für MCF-Zellen gezeigt werden, dass der mTOR-Inhibitor RAD001 zu mehr Induktion von Zelltod führt, wenn die Zellen kurz vor der Bestrahlung mit dieser Substanz inkubiert wurden (Albert et al., 2006). Für HCT116-Zellen wurde ebenfalls beschrieben, dass der duale PI3K/AKT-Inhibitor NVP-BEZ235 die Tumorzellen für eine Behandlung mit ionisierender Strahlung sensitivieren kann, da die kompensatorische Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs nach Bestrahlung verhindert wird (Chen et al., 2015). Vermutlich wird die Radioresistenz insbesondere durch AKT vermittelt, da es Effektorproteine phosphoryliert, die in Reparaturprozesse von Doppelstrangbrüchen involviert sind (Szymonowicz et al., 2018). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass NVP-BEZ235 zur Inhibition der PI3K-*related-kinases* ATM und DNA-PK führt, die zentrale Kinasen in der Antwort auf Bestrahlungs-induzierte Doppelstrangbrüche sind (Mukherjee et al., 2012). Auch für Wortmannin wurde eine radiosensitivierende Wirkung aufgrund der Inhibition von ATM und DNA-PK beschrieben (Mirzayans et al., 2004). Der hier identifizierte senolytische Effekt von Wortmannin und PX-866 muss allerdings von dem Begriff der Radiosensitivierung abgegrenzt werden, da in der vorliegenden Forschungsarbeit die Tumorzellen erst am siebten Tag nach Bestrahlung mit den Substanzen inkubiert wurden und somit nicht die initiale Reaktion der Tumorzellen auf die Bestrahlung beeinflusst wurde. Wortmannin und PX-866 konnten also erst wirken, nachdem ein Großteil der Zellen einen vollständigen seneszenten Phänotyp ausgebildet hatte und damit einhergehend einige Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene stattfanden (siehe hierzu Kapitel 1.2). Aufgrund seiner zentralen Rolle in verschiedenen Vorgängen der zellulären Seneszenz (insbesondere bei der Aufrechterhaltung des seneszenten Status und dem langfristigen Überleben seneszenten Zellen) stellt der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg einen therapeutisch sehr interessanten Angriffspunkt potentieller senolytischer Substanzen dar.

4.3.2 Die Inhibition von Klasse I PI3-Kinasen wirkt in HCT116- und MCF-7-Zellen senolytisch

Die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und PX-866 erwiesen sich in HCT116- und MCF-7-Zellen als senolytisch. Um zu ermitteln, inwieweit der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg für das Überleben seneszenter HCT116- und MCF-7-Zellen notwendig ist, und um zu evaluieren, ob die senolytische Wirkung tatsächlich auf der Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs beruht, wurden weitere Inhibitoren dieses Signalwegs auf ihre Wirkung in den beiden Tumorzelllinien getestet. Der molekulare senolytische Wirkmechanismus von Wortmannin und PX-866 sollte auf diese Weise genauer beleuchtet werden. Bei Wortmannin und PX-866 handelt es sich um pan-spezifische Inhibitoren der PI3Ks, sie inhibieren also Isoform-unabhängig alle Vertreter der Klasse I PI3Ks. Wortmannin ist in den verwendeten Konzentrationen darüber hinaus in der Lage mTOR, DNA-PK, ATM und ATR zu inhibieren (Cardenas et al., 1998). PX-866 inhibiert spezifischer nur die Vertreter der Klasse I PI3Ks mit Ausnahme der β -Isoform (Ihle, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass PX-866 in HCT116- und MCF-7-Zellen sogar eine geringfügig stärkere senolytische Aktivität aufweist als Wortmannin (Abb. 15 A, B und 16 A, B). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die senolytische Wirkung von Wortmannin hauptsächlich auf die Inhibition der Klasse I PI3Ks und weniger auf andere Nebeneffekte zurückzuführen ist. Die Inhibition der PI3Ks durch Wortmannin und PX-866 wurde durch Analyse der AKT-Phosphorylierung überprüft. Sowohl in seneszenten als auch in proliferierenden Zellen führten die Inhibitoren zu einer Abnahme der aktivierenden Ser473 AKT-Phosphorylierung.

Auch der PI3K-Inhibitor BYL719 zeigte eine (verzögerte) senolytische Wirkung sowohl in HCT116 als auch in MCF-7-Zellen (Abb. 15 G, H und 16 E, F). BYL719 wird als selektiver Inhibitor der p110 α -Isoform der Klasse I PI3Ks bezeichnet, da der IC₅₀-Wert für die Inhibition der p110 α -Isoform im geringen nanomolaren Bereich liegt (5 nM). Jedoch können in höheren Konzentrationen auch die anderen Isoformen der Klasse I PI3Ks inhibiert werden (der IC₅₀ für p110 β Isoform beträgt 1200 nM, für p110 γ 250 nM und für p110 δ 290 nM) (Furet et al., 2013). Somit kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die senolytische Wirkung von BYL719 in den hier verwendeten Konzentrationen (bis zu 50 μ M) auch auf die Inhibition der anderen Klasse I Isoformen zurückgeführt werden kann. Es bleibt daher zu testen, inwieweit die senolytische Wirkung von BYL719 auf der Inhibition der α -Isoform beruht. Beispielsweise könnte über einen Isoform-spezifischen p110 - Knockdown evaluiert werden, welche Isoformen tatsächlich für die senolytische Wirkung verantwortlich sind. Interessant wäre insbesondere ein p110 δ -spezifischer Knockdown, da diese Isoform bereits als möglicher Angriffspunkt von Senolytika identifiziert wurde, allerdings bisher nur in nicht-malignen, primären Zellen (Zhu et al., 2015).

Der pan-spezifische PI3K-Inhibitor NVP-BEZ235 zeigte nur in MCF-7-Zellen, nicht in HCT116-Zellen, einen schwachen senolytischen Effekt, obwohl sich sein Wirkspektrum mit dem von Wortmannin und PX-866 überschneidet (Tabelle 10). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sowohl Wortmannin als auch PX-866 irreversible Inhibitoren der PI3Ks sind, während NVP-BEZ235 diese lediglich reversibel inhibieren kann (Maira et al., 2008; Zask et al., 2008). Möglicherweise ist also für die senolytische Wirkung eine irreversible Inhibition der PI3Ks notwendig oder reversible Inhibitoren müssten in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Inwiefern für die senolytische Wirkung eine direkte Inhibition der PI3Ks erforderlich ist oder ob auch eine Inhibition der nachgeschalteten Proteine AKT und mTOR in den beiden Tumorzelllinien senolytisch wirkt, wurde ebenfalls evaluiert. Seneszenz Zellen wurden zwar sowohl durch den AKT-Inhibitor MK2206 als auch den mTORC1-Inhibitor Torin2 abgetötet, allerdings wurden in den verwendeten Konzentrationen auch proliferierende Zellen abgetötet. Möglicherweise ist die direkte Inhibition von AKT oder mTORC1 für proliferierende Zellen zytotoxisch, da die senolytische Wirkung von Wortmannin und PX-866 nicht auf der Inhibition der PI3K/AKT/mTOR-Achse, sondern auf Nebeneffekten der PI3-Kinasen beruht. Sowohl HCT116- als auch MCF-7-Zellen besitzen aktivierende Mutationen im PIK3CA Gen, das für die katalytische (p110 α) Untereinheit der Klasse I PI3Ks kodiert, wobei HCT116 eine Mutation der Kinase-Domäne und MCF-7 der helikalen Domäne aufweisen (Vasudevan et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen mit aktivierenden Mutationen des PIK3CA-Gens nicht unbedingt eine verstärkte AKT-Phosphorylierung zeigen, was zu der Annahme führte, dass die Tumorigenität dieser Zelllinien über einen anderen Weg vermittelt werden könnte. Tatsächlich lag in diesen Zellen eine verstärkte Expression von PDK1 vor und über *knockdown*-Versuche konnte eine Abhängigkeit der Tumorzellen von PDK1 und dessen Substrat SGK3 gezeigt werden (Vasudevan et al., 2009). Es wäre demnach möglich, dass die hier verwendeten HCT116- und MCF-7-Zellen aufgrund der vorliegenden PIK3CA-Mutation für die Aufrechterhaltung der Seneszenz nicht auf die PI3K/AKT/mTOR-Achse, sondern vor allem auf die PI3K/PDK1/SGK3-Achse angewiesen sind und Wortmannin und PX-866 über Inhibition dieses Signalwegs senolytisch wirken.

Da primäre, nicht-maligne Zellen (wie z.B. Fibroblasten) physiologisch keine Mutation im PIK3CA-Gen besitzen, könnte überprüft werden, ob Wortmannin und PX-866 in diesen Zellen ebenfalls eine senolytische Wirkung besitzen. Wenn die senolytische Wirkung von PX-866 und Wortmannin in HCT116- und MCF-7-Zellen hauptsächlich auf ihrer PIK3CA-Mutation und damit auf ihrer verstärkten Abhängigkeit von der PI3K-Aktivierung beruht, sollten die Substanzen in Fibroblasten keinen senolytischen Effekt haben. Die Unterschiede von Tumorzellen und nicht-malignen Zellen in Bezug auf ihre Abhängigkeit von bestimmten

Signalwegen könnten auch dazu geführt haben, dass der in Präadipozyten als senolytisch beschriebene Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib in den hier verwendeten Tumorzellen keine senolytische Wirkung zeigte.

Um zu evaluieren, ob die senolytische Wirkung von Wortmannin und PX-866 tatsächlich auf der Inhibition der Klasse I PI3Ks und nicht auf die Inhibition anderer Vertreter der *PI3K-related-kinases* zurückzuführen ist, wurden außerdem die Klasse III (VPS34)-Inhibitoren SAR405 und 3-MA verwendet. SAR405 ist in den verwendeten Konzentrationen ein selektiver VPS34-Inhibitor (Ronan et al., 2014), wobei 3-MA in den hier verwendeten Konzentrationen auch andere PI3Ks inhibieren kann (Miller et al., 2010). Durch die beiden Inhibitoren konnte nur in HCT116-Zellen ein im Vergleich zu PX-866 verzögerter und schwächerer senolytischer Effekt erzielt werden. Seneszente MCF-7-Zellen wurden hingegen kaum durch die beiden Inhibitoren abgetötet. Der verzögerte senolytische Effekt in HCT116-Zellen scheint also zumindest bei SAR405 nicht auf der Inhibition der Klasse I PI3Ks zu beruhen. Möglicherweise ist VPS34 (zumindest in HCT116) auch ein weiterer potentieller Angriffspunkt für eine senolytische Therapie. Der VPS34-Inhibitor SAR405 ist vor allem als Autophagie-Inhibitor bekannt, da VPS34 in der Autophagieinduktion eine Rolle spielt (Pasquier, 2015). Durch einen Nährstoffmangel wird mTORC1 weniger aktiviert, was eine verstärkte VPS34 Aktivität zur Folge hat und so Autophagie in der Zelle induziert wird (siehe Abb. 18) (Pasquier, 2015). Ein Zusammenhang zwischen Autophagie und Seneszenz wurde bereits vielfach vermutet und diskutiert, wobei der Autophagie sowohl anti-seneszente als auch pro-seneszente Eigenschaften zugeschrieben werden (Gewirtz, 2013; Pawlikowski et al., 2013; Young et al., 2009). Einerseits kann Autophagie die Induktion der Seneszenz verhindern, indem auslösende Stressoren wie reaktive Sauerstoffspezies entfernt werden, andererseits kann sie die dauerhafte Aufrechterhaltung der Viabilität bereits seneszenten Zellen sowie die Ausbildung des SASP unterstützen (Kwon et al., 2017). Aufgrund der hier beobachteten (wenn auch geringen) senolytischen Wirkung von SAR405 kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine VPS34-Inhibition (und damit eine Autophagie-Inhibition) in HCT116-Zellen eine senolytische Wirkung hat. Im Mausmodell konnten Therapie-induzierte seneszente Zellen (siehe Kapitel 1.3) über Blockierung der Autophagie selektiv eliminiert werden, was zur Tumorregression und verbesserten Behandlungsergebnissen führte (Dörr et al., 2013). Interessanterweise führte eine weitere Arbeitsgruppe zur Identifizierung neuer Senolytika ein Screening von Naturstoffen durch, die bereits als Autophagieregulatoren bekannt waren, und konnten auf diese Weise die Substanz 17-DMAG identifizieren, die in den verwendeten Zellen einen senolytischen Effekt zeigte (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017). Es scheint also sinnvoll, sich die besonderen metabolischen Anforderungen seneszenten Zellen und ihre Abhängigkeit von der Autophagie als pharmakologischen Angriffspunkt nutzbar zu machen.

Dennoch muss beachtet werden, dass die Beziehung zwischen den Prozessen der Seneszenz und der Autophagie noch längst nicht vollständig beleuchtet wurde, weswegen nicht generell davon ausgegangen werden kann, dass Autophagie-Inhibitoren grundsätzlich eine senolytische Wirkung besitzen.

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung der verschiedenen Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs gezeigt werden, dass die senolytische Wirkung von Wortmannin und PX-866 in HCT116- und MCF-7-Zellen zwar zum Teil auf der irreversiblen Inhibition der Klasse I PI3Ks beruht, aber vermutlich weitere Nebeneffekte für die senolytische Wirkung verantwortlich sind, da andere pan-spezifische Klasse I PI3K-Inhibitoren den senolytischen Effekt von PX-866 nur abgeschwächt reproduzieren konnten. Der senolytische Effekt des PI3K-Inhibitors BYL719 deutet darauf hin, dass die Aktivität der α -Isoform zumindest teilweise für das Überleben der seneszenten Zellen verantwortlich ist. Ein schwacher senolytischer Effekt konnte auch durch Inhibition des Autophagie-Regulators VPS34 erreicht werden, was für eine gewisse Abhängigkeit des seneszenten Status von der Autophagie sprechen könnte. Es ist nicht auszuschließen, dass der ausgeprägte senolytische Effekt von PX-866 möglicherweise auf einer kombinierten Inhibition verschiedener PI3Ks beruht und in den verwendeten Konzentrationen nicht nur die Klasse I PI3Ks, sondern auch die Klasse III PI3K VPS34 durch PX-866 inhibiert werden.

4.4 Ausblick und Schlussfolgerung

Im Rahmen des Screenings der marinen Naturstoffbibliothek auf potentielle Senolytika konnte der PI3K-Inhibitor Wortmannin als neuer Vertreter dieser Substanzklasse identifiziert werden. PX-866 stellt ein wesentlich stabileres und weniger hepatotoxisches Derivat von Wortmannin dar und zeigte ebenfalls in den beiden getesteten Tumorzelllinien eine senolytische Aktivität, wobei der senolytische Effekt sogar noch ausgeprägter war als bei Wortmannin. Um den molekularen Wirkmechanismus der neu identifizierten Senolytika Wortmannin und PX-866 genauer zu charakterisieren, könnte mittels *small interfering RNA* (siRNA) die Translation der verschiedenen PI3Ks in jeweils proliferierenden und seneszenten Zellen inhibiert werden. Die Quantifizierung des resultierenden Zelltods könnte Aufschluss darüber geben, welche der PI3K-Isoformen für den senolytischen Effekt hauptverantwortlich sind, oder ob sogar nur eine kombinierte Inhibition den gewünschten senolytischen Effekt erzielt.

Des Weiteren ist die Frage interessant, ob Wortmannin und PX-866 auch in Zellen senolytisch wirken, in denen Seneszenz auf eine andere Weise als durch ionisierende Strahlung induziert wurde. Beispielsweise könnte die DNA-Schädigungs-induzierte Seneszenz auch mittels Chemotherapeutika wie beispielsweise Camptothecin in den beiden Tumorzelllinien erzielt werden. Zu testen bliebe auch, ob die beiden Inhibitoren

sogar senolytisches Potential in anderen Zelllinien mit anderen Seneszenzformen besitzen. Beispielsweise könnten Tumorzellen, die eine induzierbare Ras-Überexpression besitzen, in die Onkogen-induzierte Seneszenz gebracht werden und zur Evaluierung des senolytischen Potentials von Wortmannin und PX-866 verwendet werden. Schließlich bleibt auch zu testen, ob Wortmannin und PX-866 auf nicht-maligne Zellen wie beispielsweise Fibroblasten zytotoxisch wirken, da ein Einsatz als Senolytikum nur möglich ist, wenn gesunde Zellen des Organismus nicht angegriffen werden. Hierbei stellt PX-866 grundsätzlich einen geeigneten Kandidaten dar, da diese Substanz bereits in klinischen Studien getestet wurde und eine tolerierbare Toxizität gezeigt hat (Bowles et al., 2016; Pitz et al., 2015). Insbesondere könnte evaluiert werden, ob Wortmannin und PX-866 in Fibroblasten ebenfalls eine senolytische Wirkung zeigen. Im Rahmen einer Tumorthherapie kann nämlich nicht nur in den Tumorzellen selbst, sondern auch in Tumor-assoziierten Fibroblasten Seneszenz induziert werden (Short et al., 2019; Sieben et al., 2018). Wünschenswert wäre es demnach (im Hinblick auf eine effektive senolytische Therapie im Menschen), dass PX-866 sowohl in seneszenten Tumorzellen, als auch in seneszenten nicht-malignen Zellen (wie z.B. Fibroblasten) einen senolytischen Effekt hätte.

Die gezielte Induktion von Seneszenz und der Einsatz von Senolytika stellen einen vergleichsweise jungen, aber vielversprechenden Ansatz der translationalen Forschung dar. Senolytika gewinnen zunehmend an Bedeutung und die Wirksamkeit und Sicherheit einiger Vertreter dieser Substanzklasse wird bereits in klinischen Studien untersucht, allerdings nur im Bereich der altersassoziierten Erkrankungen (Niedernhofer and Robbins, 2018; Sun et al., 2018). Aktuell befinden sich Substanzen mit senolytischer Aktivität in klinischen Phase-II oder sogar bereits in Phase-IV-Studien, darunter auch Dasatinib und Quercetin (Sun et al., 2018). Grundsätzlich scheint die Gabe von Senolytika also auch im menschlichen Organismus möglich zu sein. Der Einsatz von Senolytika im Rahmen von onkologischen Erkrankungen hat bisher jedoch deutlich weniger Beachtung erfahren. Allerdings scheint genau hier ein sehr vielversprechender Ansatzpunkt in der onkologischen Therapie zu liegen. Einerseits kann durch Reduktion Tumor-assoziiertes seneszenten Zellen ihr SASP-bedingtes tumorförderndes Milieu verringert werden und so das Tumorstadium inhibiert werden. Andererseits können Therapienebenwirkungen und die Entstehung von Tumorrezidiven positiv beeinflusst werden, da auch hier seneszenten Zellen eine Rolle zugeschrieben wird (Schosserer et al., 2017).

Denkbar wäre ein zweistufiger Therapieansatz, bei dem die Eliminierung seneszenten Tumorzellen im Anschluss an eine pro-seneszente Therapie erfolgt (Sieben et al., 2018). Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung, die zurzeit in der Tumorthherapie primär zur Zelltodinduktion genutzt werden, sind ebenso in der Lage, Seneszenz zu induzieren, wobei für die Seneszenzinduktion in der Regel niedrigere Dosen erforderlich sind als für die

Induktion von Zelltod (Chakradeo et al., 2016; Schosserer et al., 2017). So könnte zunächst mit Chemotherapeutika (in geringerer Dosierung) in den Zellen des Tumorgewebes Seneszenz induziert werden und erst in einem zweiten Schritt könnten diese seneszenten Tumorzellen gezielt durch Senolytika eliminiert werden (Sieben et al., 2018). Die Dosisreduktion der eingesetzten Chemotherapeutika sollte so auch zur Reduktion der vielen unerwünschten Nebenwirkungen, wie beispielsweise Anämie, Fatigue oder Nausea führen. In einer Vielzahl der Fälle wird eine Anti-Tumor-Therapie nämlich nicht aufgrund fehlenden Ansprechens des Tumors abgebrochen, sondern aufgrund der toxischen Wirkung auf gesunde Zellen des Organismus. Dieser Ansatz könnte also insgesamt die Effizienz von Chemotherapien erhöhen und durch Inhibition des pro-tumorigenen Mikromilieus der seneszenten Zellen sogar die Entstehung von Rezidiven verhindern (Sieben et al., 2018). Nicht zuletzt wurde das Auftreten seneszenten Zellen auch in bestrahlungsinduzierten fibrotischen Arealen beispielweise in der Lunge nachgewiesen (Nguyen et al., 2018). Eine Depletion seneszenten Zellen nach einer Radiotherapie birgt somit das Potential, auch hier unerwünschte Wirkungen zu reduzieren und die Verträglichkeit der Radiotherapie zu erhöhen. Generell werden noch klinische Studien benötigt, um die Auswirkungen von senolytischen Therapien im Menschen zu evaluieren. Insbesondere wären Studien interessant, in denen Senolytika speziell im Anschluss an eine Seneszenz-induzierende Radio- oder Chemotherapie gegeben wurden (Short et al., 2019). Somit kann die Suche nach neuen senolytischen Substanzen, wie das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Senolytikum PX-866, Wegbereiter für spätere klinisch einsetzbare Therapeutika sein und einen Beitrag zur Etablierung eines völlig neuen Therapieansatzes im Bereich der Onkologie leisten.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer* 9, 400–414. <https://doi.org/10.1038/nrc2657>
- Albert, J.M., Kim, K.W., Cao, C., Lu, B., 2006. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 1183–1189. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0400>
- Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al., 2017. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132-147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K., 2005. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer* 5, 921–929. <https://doi.org/10.1038/nrc1753>
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., van Deursen, J.M., 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Beausejour, C.M., 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal* 22, 4212–4222. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>
- Beesoo, R., Neergheen-Bhujun, V., Bhagooli, R., Bahorun, T., 2014. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 768, 84–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.03.005>
- Bowles, D.W., Kochenderfer, M., Cohn, A., Sideris, L., Nguyen, N., Cline-Burkhardt, V., Schnadig, I., Choi, M., Nabell, L., Chaudhry, A., et al., 2016. A Randomized, Phase II Trial of Cetuximab With or Without PX-866, an Irreversible Oral Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor, in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma. *Clinical Colorectal Cancer* 15, 337-344.e2. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.03.004>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 7.
- Brunelle, J.L., Green, R., 2014. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE), in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 151–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Cardenas, M.E., Sanfridson, A., Cutler, N.S., Heitman, J., 1998. Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *Trends in biotechnology* 16, 427–433.
- Carlton, J.G., Cullen, P.J., 2005. Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends in Cell Biology* 15, 540–547. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.08.005>
- Carnero, A., 2013. Markers of Cellular Senescence, in: Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G. (Eds.), *Cell Senescence*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 63–81. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_4
- Chakradeo, S., W Elmore, L., A Gewirtz, D., 2016. Is senescence reversible? *Current drug targets* 17, 460–466.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al., 2016. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine* 22, 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
- Chen, Y.-H., Wei, M.-F., Wang, C.-W., Lee, H.-W., Pan, S.-L., Gao, M., Kuo, S.-H., Cheng, A.-L., Teng, C.-M., 2015. Dual Phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor is an effective radiosensitizer for colorectal cancer. *Cancer Letters* 357, 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.015>

- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., van Deursen, J.M., 2014. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO reports* 15, 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., van Deursen, J.M., 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine* 21, 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B., Engelman, J.A., 2010. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 1075–1083. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.3641>
- Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., Waterhouse, N.J., 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016, pdb.prot087163. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>
- de Magalhães, J.P., Passos, J.F., 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 170, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.001>
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., Toussaint, O., 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols* 4, 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M.-L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al., 2014. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* 31, 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Demaria, M., O’Leary, M.N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A.M., et al., 2017. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discovery* 7, 165–176. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>
- Demidenko, Z.N., Zubova, S.G., Bukreeva, E.I., Pospelov, V.A., Pospelova, T.V., Blagosklonny, M.V., 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle* 8, 1888–1895. <https://doi.org/10.4161/cc.8.12.8606>
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dirac, A.M.G., Bernards, R., 2003. Reversal of Senescence in Mouse Fibroblasts through Lentiviral Suppression of p53. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11731–11734. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300023200>
- Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al., 2013. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501, 421–425. <https://doi.org/10.1038/nature12437>
- Ersahin, T., Tuncbag, N., Cetin-Atalay, R., 2015. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems* 11, 1946–1954. <https://doi.org/10.1039/C5MB00101C>
- Essmann, F., Bantel, H., Totzke, G., Engels, I., Sinha, B., Schulze-Osthoff, K., 2003. *Staphylococcus aureus* a-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death and Differentiation* 13.
- Essmann, F., Engels, I.H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U., 2004. Apoptosis Resistance of MCF-7 Breast Carcinoma Cells to Ionizing Radiation Is Independent of p53 and Cell Cycle Control but Caused by the Lack of Caspase-3 and a Caffeine-

- Inhibitable Event. *Cancer Research* 64, 7065–7072. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1082>
- Fagagna, F., d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., Jackson, S.P., 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198. <https://doi.org/10.1038/nature02118>
- Fennelly, C., Amaravadi, R.K., 2017. Lysosomal Biology in Cancer, in: Öllinger, K., Appelqvist, H. (Eds.), *Lysosomes*. Springer New York, New York, NY, pp. 293–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6934-0_19
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016, pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fruman, D.A., Chiu, H., Hopkins, B.D., Bagrodia, S., Cantley, L.C., Abraham, R.T., 2017. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 170, 605–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>
- Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y.Y., Zhao, J., McGowan, S.J., Zhu, Y., Brooks, R.W., Grassi, D., Gregg, S.Q., Stripay, J.L., Dorransoro, A., et al., 2017. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00314-z>
- Furet, P., Guagnano, V., Fairhurst, R.A., Imbach-Weese, P., Bruce, I., Knapp, M., Fritsch, C., Blasco, F., Blanz, J., Aichholz, R., et al., 2013. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 3741–3748. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.007>
- García-Rocha, M., Bonay, P., Avila, J., 1996. The antitumoral compound Kahalalide F acts on cell lysosomes. *Cancer Letters* 99, 43–50. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)04036-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)04036-6)
- Gewirtz, D.A., 2013. Autophagy and senescence: A partnership in search of definition. *Autophagy* 9, 808–812. <https://doi.org/10.4161/auto.23922>
- Gewirtz, D.A., Alotaibi, M., Yakovlev, V.A., Povirk, L.F., 2016. Tumor Cell Recovery from Senescence Induced by Radiation with PARP Inhibition. *Radiation Research* 186, 327–332. <https://doi.org/10.1667/RR14437.1>
- Gobin, B., Huin, M.B., Lamoureux, F., Ory, B., Charrier, C., Lanel, R., Battaglia, S., Redini, F., Lezot, F., Blanchard, F., et al., 2015. BYL719, a new α -specific PI3K inhibitor: Single administration and in combination with conventional chemotherapy for the treatment of osteosarcoma: BYL719 PI3K α Inhibitor: Therapeutic Value in Osteosarcoma. *International Journal of Cancer* 136, 784–796. <https://doi.org/10.1002/ijc.29040>
- Gonzalez-Meljem, J.M., Apps, J.R., Fraser, H.C., Martinez-Barbera, J.P., 2018. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 118, 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0066-1>
- Greer, E.L., Brunet, A., 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410–7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>
- Guo, N., Parry, E.M., Li, L.-S., Kembou, F., Lauder, N., Hussain, M.A., Berggren, P.-O., Armanios, M., 2011. Short Telomeres Compromise β -Cell Signaling and Survival. *PLoS ONE* 6, e17858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017858>
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, S., Sharpless, N.E., 2017. Senescence in Health and Disease. *Cell* 169, 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T.V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., Demaria, M., 2017. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology* 27, 2652–2660.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>

- Holler, M., Grottke, A., Mueck, K., Manes, J., Jücker, M., Rodemann, H.P., Toulany, M., 2016. Dual Targeting of Akt and mTORC1 Impairs Repair of DNA Double-Strand Breaks and Increases Radiation Sensitivity of Human Tumor Cells. *PLOS ONE* 11, e0154745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154745>
- Hossain, M.Z., Akter, Kleve, Gealt, 2012. Wortmannin induces MCF-7 breast cancer cell death via the apoptotic pathway, involving chromatin condensation, generation of reactive oxygen species, and membrane blebbing. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 103. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S31712>
- Howes, A.L., Chiang, G.G., Lang, E.S., Ho, C.B., Powis, G., Vuori, K., Abraham, R.T., 2007. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 2505–2514. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0698>
- Iglesias-Bartolome, R., Patel, V., Cotrim, A., Leelahavanichkul, K., Molinolo, A.A., Mitchell, J.B., Gutkind, J.S., 2012. mTOR Inhibition Prevents Epithelial Stem Cell Senescence and Protects from Radiation-Induced Mucositis. *Cell Stem Cell* 11, 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.007>
- Ihle, N.T., 2005. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 4, 1349–1357. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0149>
- Ihle, N.T., Paine-Murrieta, G., Berggren, M.I., Baker, A., Wipf, P., Abraham, R.T., Kirkpatrick, D.L., Powis, G., 2006. The phosphoinositide-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the EGFR inhibitor gefitinib in A-549 human non small cell lung cancer xenografts. 19.
- Jänicke, R.U., Lee, F.H., Porter, A.G., 1994. Nuclear c-Myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Molecular and Cellular Biology* 14, 5661–5670. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.9.5661>
- Jänicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., 2007. The Multiple Battles Fought by Anti-Apoptotic p21. *Cell Cycle* 6, 407–413. <https://doi.org/10.4161/cc.6.4.3855>
- Jänicke, R.U., Sohn, D., Schulze-Osthoff, K., 2008. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death & Differentiation* 15, 959–976. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.33>
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9357–9360. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9357>
- Janmaat, M.L., 2005. Kahalalide F induces necrosis-like cell death that involves depletion of ErbB3 and inhibition of Akt signaling. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011361>
- Jean, S., Kiger, A.A., 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science* 127, 923–928. <https://doi.org/10.1242/jcs.093773>
- Jones, K.R., Elmore, L.W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L.F., Holt, S.E., Gewirtz, D.A., 2005. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *International Journal of Radiation Biology* 81, 445–458. <https://doi.org/10.1080/09553000500168549>
- Jun, I., Lau, L.F., 2010. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing 5.
- Kim, E.-C., Kim, J.-R., 2019. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease 9.
- Kirkland, J.L., Tchkonina, T., 2017. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine* 21, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>
- Kirkland, J.L., Tchkonina, T., Zhu, Y., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., 2017. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *Journal of the American Geriatrics Society* 65, 2297–2301. <https://doi.org/10.1111/jgs.14969>
- Kovacovicova, K., Skolnaja, M., Heinmaa, M., Mistrik, M., Pata, P., Pata, I., Bartek, J., Vinciguerra, M., 2018. Senolytic Cocktail Dasatinib+Quercetin (D+Q) Does Not

- Enhance the Efficacy of Senescence-Inducing Chemotherapy in Liver Cancer. *Frontiers in Oncology* 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00459>
- Kwon, Y., Kim, J.W., Jeoung, J.A., Kim, M.-S., Kang, C., 2017. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Molecules and Cells*. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0151>
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al., 2015. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology* 17, 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Lehman, T.A., Reddel, R., Spillare, E., Kaighn, M.E., Harris, C.C., 1991. *Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes* 12.
- Li, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A., 2002. AKT/PKB Phosphorylation of p21^{Cip/WAF1} Enhances Protein Stability of p21^{Cip/WAF1} and Promotes Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry* 277, 11352–11361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109062200>
- Liston, D.R., Davis, M., 2017. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clinical Cancer Research* 23, 3489–3498. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>
- Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., Zhang, X., Hur, W., Liu, Y., Kwiatkowski, N.P., Wang, J., Westover, K.D., Gao, P., et al., 2013. Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Research* 73, 2574–2586. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1702>
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. and Hein, L. (2016). *Pharmakologie und Toxikologie*. 18., vollständig überarbeitete Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 508, 511
- Maira, S.-M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chene, P., De Pover, A., Schoemaker, K., et al., 2008. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 1851–1863. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0017>
- Martin, J.A., Brown, T.D., Heiner, A.D., Buckwalter, J.A., 2004. Chondrocyte Senescence, Joint Loading and Osteoarthritis: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 427, S96–S103. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000143818.74887.b1>
- Mellert, H., Sykes, S.M., Murphy, M.E., McMahon, S.B., 2007. The ARF/Oncogene Pathway Activates p53 Acetylation within the DNA Binding Domain. *Cell Cycle* 6, 1304–1306. <https://doi.org/10.4161/cc.6.11.4343>
- Méndez-Pertuz, M., Martínez, P., Blanco-Aparicio, C., Gómez-Casero, E., Belén García, A., Martínez-Torrecedrada, J., Palafox, M., Cortés, J., Serra, V., Pastor, J., et al., 2017. Modulation of telomere protection by the PI3K/AKT pathway. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01329-2>
- Miguel-Lillo, B., Valenzuela, B., Peris-Ribera, J.E., Soto-Matos, A., Pérez-Ruixo, J.J., 2015. Population pharmacokinetics of kahalalide F in advanced cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 76, 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2800-1>
- Miller, S., Oleksy, A., Perisic, O., Williams, R.L., 2010. Finding a fitting shoe for Cinderella: Searching for an autophagy inhibitor. *Autophagy* 6, 805–807. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12577>
- Mirzayans, R., Andrais, B., Hansen, G., Murray, D., 2012. Role of p16 INK4A in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry Research International* 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/951574>
- Mirzayans, R., Pollock, S., Scott, A., Enns, L., Andrais, B., Murray, D., 2004. Relationship between the radiosensitizing effect of wortmannin, DNA double-strand break rejoining, and p21WAF1 induction in human normal and tumor-derived cells. *Molecular Carcinogenesis* 39, 164–172. <https://doi.org/10.1002/mc.20005>
- Mukherjee, B., Tomimatsu, N., Amancherla, K., Camacho, C.V., Pichamoorthy, N., Burma, S., 2012. The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM-

- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses. *Neoplasia* 14, 34-IN8. <https://doi.org/10.1593/neo.111512>
- Multhoff, G., Molls, M., Radons, J., 2012. Chronic Inflammation in Cancer Development. *Frontiers in Immunology* 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00098>
- Muñoz-Espín, D., Serrano, M., 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A., Lu, X., 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 702–712. <https://doi.org/10.1038/nrm2451>
- Myriantopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P.V.S., Cooks, T., Vassilakopoulos, T.P., Pangalis, G.A., Kouloukoussa, M., Kittas, C., Georgakilas, A.G., Gorgoulis, V.G., 2019. Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 193, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.006>
- Nguyen, H.Q., To, N.H., Zadigue, P., Kerbrat, S., De La Taille, A., Le Gouvello, S., Belkacemi, Y., 2018. Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 129, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.012>
- Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., 2018. Senotherapeutics for healthy ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Nitta, M., Kobayashi, O., Honda, S., Hirota, T., Kuninaka, S., Marumoto, T., Ushio, Y., Saya, H., 2004. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 23, 6548–6558. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207873>
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.-C., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Tonic, I., Unterman, T., Hay, N., 2008. Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.003>
- Noren Hooten, N., Evans, M.K., 2017. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/55533>
- Otvos, L., Wade, J.D., 2014. Current challenges in peptide-based drug discovery. *Frontiers in Chemistry* 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00062>
- Pasquier, B., 2015. SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy* 11, 725–726. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1033601>
- Pawlikowski, J.S., Adams, P.D., Nelson, D.M., 2013. Senescence at a glance. *Journal of Cell Science* 126, 4061–4067. <https://doi.org/10.1242/jcs.109728>
- Pitz, M.W., Eisenhauer, E.A., MacNeil, M.V., Thiessen, B., Easaw, J.C., Macdonald, D.R., Eisenstat, D.D., Kakumanu, A.S., Salim, M., Chalchal, H., et al., 2015. Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou365>
- Purcell, M., Kruger, A., Tainsky, M.A., 2014. Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle* 13, 3927–3937. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.973327>
- Riccardi, C., Nicoletti, I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 1, 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Ronan, B., Flamand, O., Vescovi, L., Dureuil, C., Durand, L., Fassy, F., Bachelot, M.-F., Lambertson, A., Mathieu, M., Bertrand, T., et al., 2014. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nature Chemical Biology* 10, 1013–1019. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1681>
- Salmonowicz, H., Passos, J.F., 2017. Detecting senescence: a new method for an old pigment. *Aging Cell* 16, 432–434. <https://doi.org/10.1111/acer.12580>
- Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A., McDaid, H.M., 2017. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01964-1>

- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadou, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafein, S., et al., 2018. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321-337.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>
- Sanders, Y.Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., Thannickal, V.J., 2013. Histone Modifications in Senescence-Associated Resistance to Apoptosis by Oxidative Stress. *Redox Biology* 1, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.004>
- Schosserer, M., Grillari, J., Breitenbach, M., 2017. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00278>
- Sefton, E.C., Qiang, W., Serna, V., Kurita, T., Wei, J.-J., Chakravarti, D., Kim, J.J., 2013. MK-2206, an AKT Inhibitor, Promotes Caspase-Independent Cell Death and Inhibits Leiomyoma Growth. *Endocrinology* 154, 4046–4057. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1389>
- Serrano, M., 2017. Ageing: Tools to eliminate senescent cells. *Nature* 545, 294–296. <https://doi.org/10.1038/nature22493>
- Shetty, N., Gupta, S., 2014. Eribulin drug review. *South Asian journal of cancer* 3, 57–59. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.126527>
- Short, S., Fielder, E., Miwa, S., von Zglinicki, T., 2019. Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.056>
- Sieben, C.J., Sturmlechner, I., van de Sluis, B., van Deursen, J.M., 2018. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends in Cell Biology* 28, 723–737. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.006>
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Janicke, R.U., 2006. p21 Blocks Irradiation-Induced Apoptosis Downstream of Mitochondria by Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Caspase-9 Activation. *Cancer Research* 66, 11254–11262. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1569>
- Sohn, D., Peters, D., Piekorz, R.P., Budach, W., Jänicke, R.U., 2016. miR-30e controls DNA damage-induced stress responses by modulating expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 and caspase-3. *Oncotarget* 7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7432>
- Suárez, Y., González, L., Cuadrado, A., Berciano, M., Lafarga, M., Muñoz, A., 2003. Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2, 863–872.
- Sun, Y., Coppé, J.-P., Lam, E.W.-F., 2018. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends in Molecular Medicine* 24, 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.002>
- Syed, D., Adhami, V., Khan, M., Mukhtar, H., 2013. Inhibition of Akt/mTOR Signaling by the Dietary Flavonoid Fisetin. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13, 995–1001. <https://doi.org/10.2174/18715206113139990129>
- Syed, D.N., Adhami, V.M., Khan, N., Khan, M.I., Mukhtar, H., 2016. Exploring the molecular targets of dietary flavonoid fisetin in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 40–41, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.04.003>
- Szymonowicz, K., Oeck, S., Krysztofiak, A., van der Linden, J., Iliakis, G., Jendrossek, V., 2018. Restraining Akt1 Phosphorylation Attenuates the Repair of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks and Reduces the Survival of Irradiated Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2233. <https://doi.org/10.3390/ijms19082233>
- Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., Kirkland, J.L., 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *Journal of Clinical Investigation* 123, 966–972. <https://doi.org/10.1172/JCI64098>
- Vasudevan, K.M., Barbie, D.A., Davies, M.A., Rabinovsky, R., McNear, C.J., Kim, J.J., Hennessy, B.T., Tseng, H., Pochanard, P., Kim, S.Y., et al., 2009. AKT-Independent

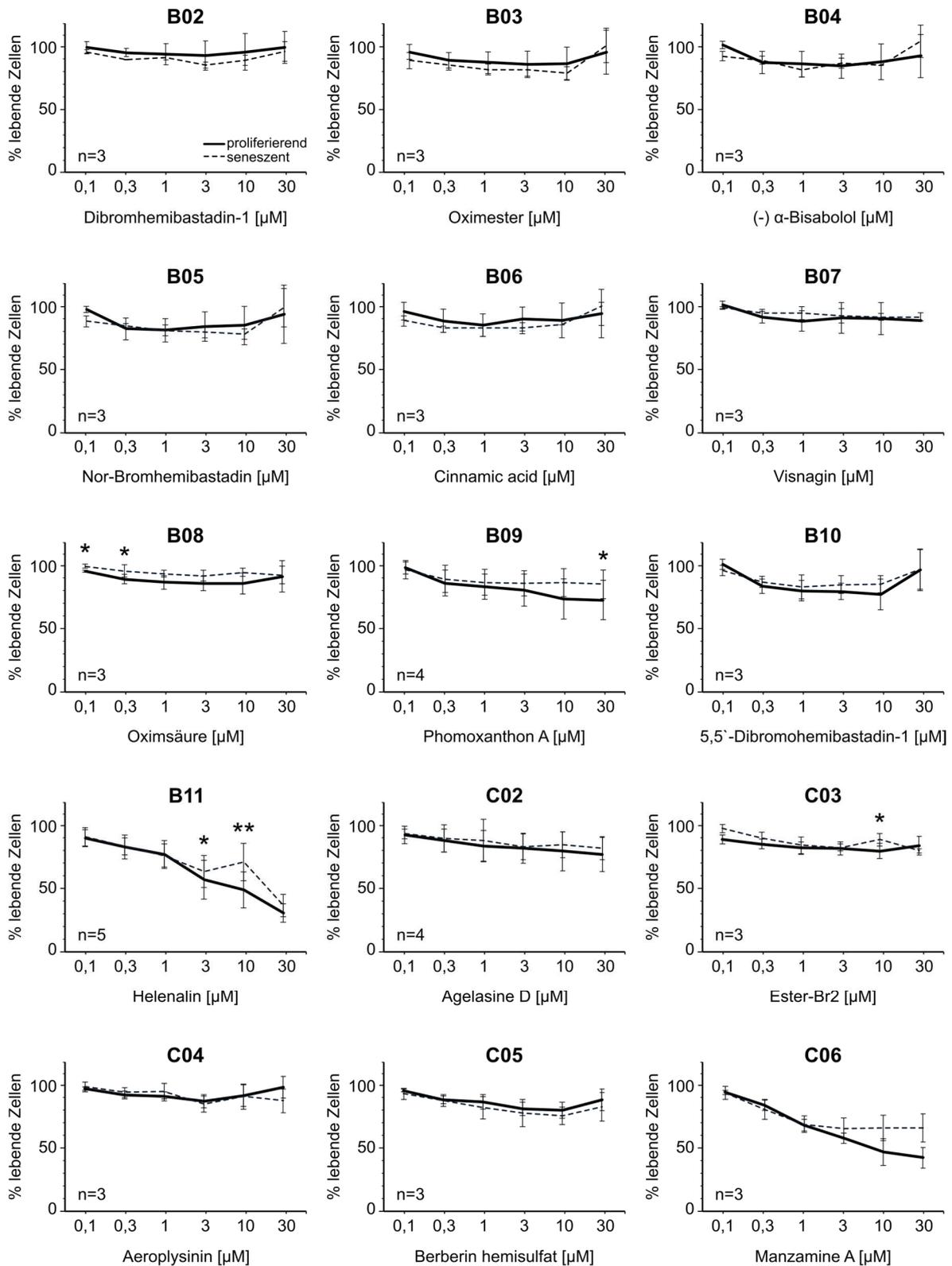
- Signaling Downstream of Oncogenic PIK3CA Mutations in Human Cancer. *Cancer Cell* 16, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.012>
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., Kroemer, G., 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 385–392. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>
- Wang, E., 1995. Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bcl-2 Is Involved 10.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P., Shen, H.-M., 2010. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 285, 10850–10861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080796>
- 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. *The EMBO Journal* 36, 2280–2295. <https://doi.org/10.15252/embj.201695553>
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., et al., 2016. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>
- Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al., 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development* 23, 798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709>
- Yu, C.-C., Hung, S.-K., Lin, H.-Y., Chiou, W.-Y., Lee, M.-S., Liao, H.-F., Huang, H.-B., Ho, H.-C., Su, Y.-C., 2017. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19817>
- Zask, A., Kaplan, J., Toral-Barza, L., Hollander, I., Young, M., Tischler, M., Gaydos, C., Cinque, M., Lucas, J., Yu, K., 2008. Synthesis and Structure–Activity Relationships of Ring-Opened 17-Hydroxywortmannins: Potent Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitors with Improved Properties and Anticancer Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 1319–1323. <https://doi.org/10.1021/jm7012858>
- Zhao, W., Qiu, Y., Kong, D., 2017. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.006>
- Zhu, Y., Doornebal, E.J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., 2017. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* 9, 955.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al., 2016. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428–435. <https://doi.org/10.1111/accel.12445>
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al., 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658. <https://doi.org/10.1111/accel.12344>

6 Anhang

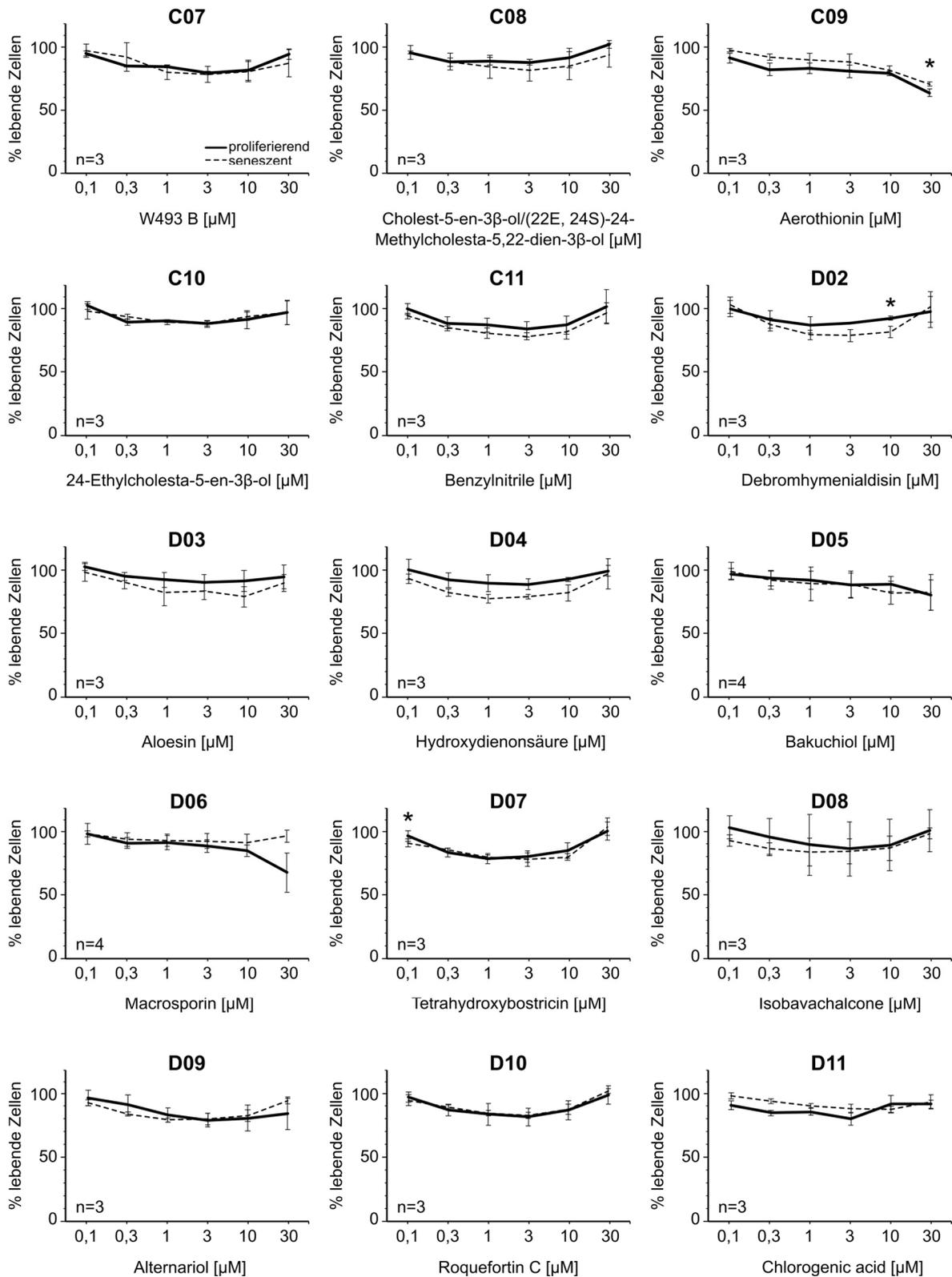
Die 180 getesteten Naturstoffe wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. h.c. P. Proksch (Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Düsseldorf). Für das Screening der Naturstoffbibliothek wurden HCT116 bzw. MCF-7-Zellen im 96-Well-Format ausgesät und zur Induktion von Seneszenz einer Röntgenstrahlung von 10 Gy ausgesetzt. An Tag 7 nach Bestrahlung wurden seneszenten, sowie am Tag zuvor ausgesäte proliferierende HCT116- bzw. MCF-7-Zellen mit den Naturstoffen in verschiedenen Konzentrationen (0,1 µM bis 30 µM) für 24 Stunden inkubiert. Die Absorptionswerte von jeweils unbehandelten proliferierenden und seneszenten Zellen wurden als 100% definiert. Die gezeigten Daten stellen jeweils Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten dar. Die Signifikanzen wurden berechnet mittels eines zweiseitigen gepaarten Student's t-Tests (bei $n \geq 3$). Verglichen wurden hier die Überlebenswerte von proliferierenden mit denen von seneszenten Zellen jeweils bei den gleichen Konzentrationswerten. Bei einem p-Wert unter 0,05 liegt ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der überlebenden proliferierenden und der überlebenden seneszenten Zellen vor. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Die Nummerierung der Naturstoffe ergibt sich aus ihrer Anordnung auf den 96-Well-Platten, in denen sie geliefert wurden (insgesamt drei 96-Well Platten P01, P02 und P03 mit jeweils 60 Substanzen). Die Bezeichnungen B02, B03, B04 etc. beziehen sich auf die Position der einzelnen Substanz auf der jeweiligen 96-Well Platte.

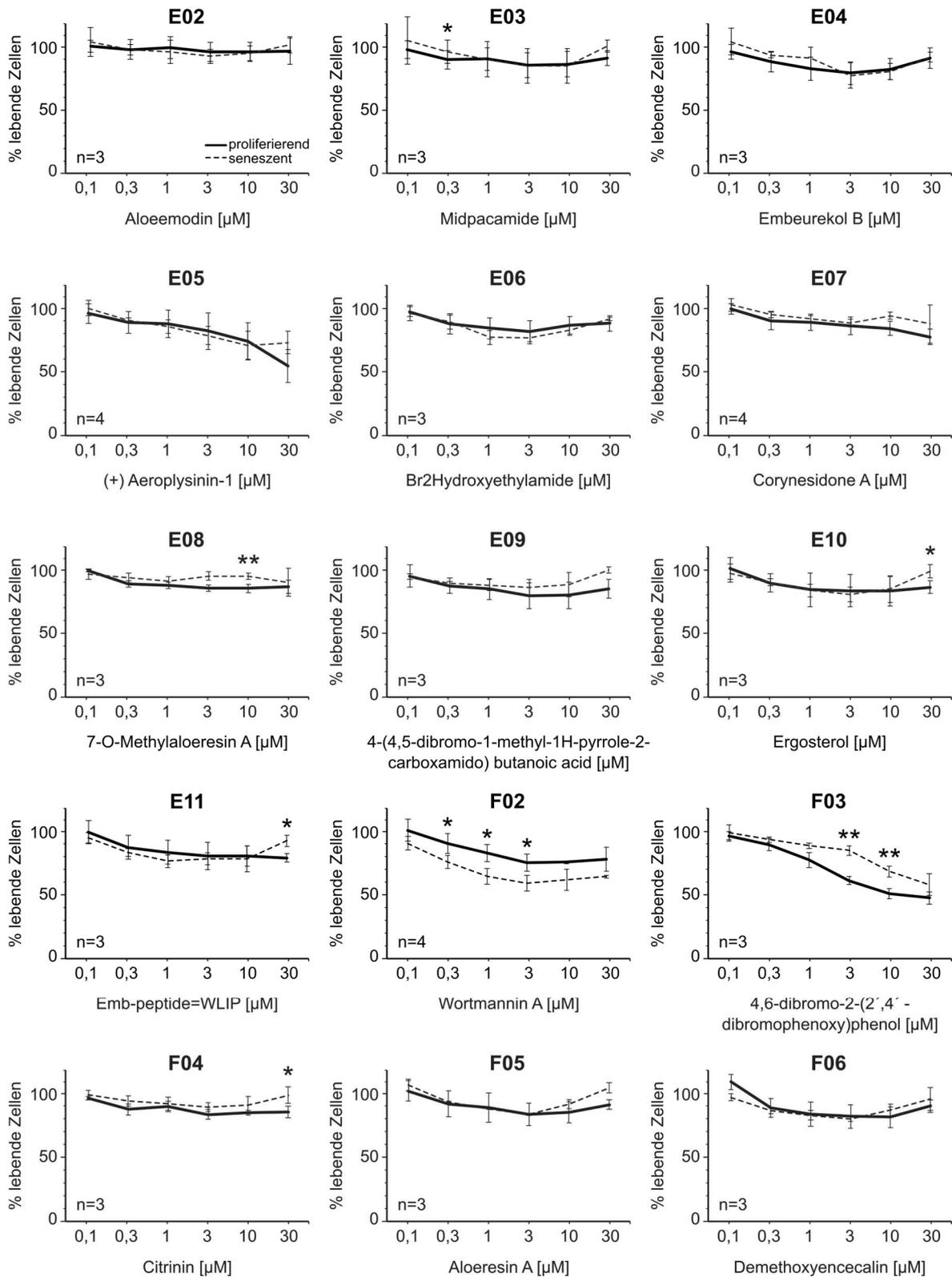
HCT116 P01B02- P01C06



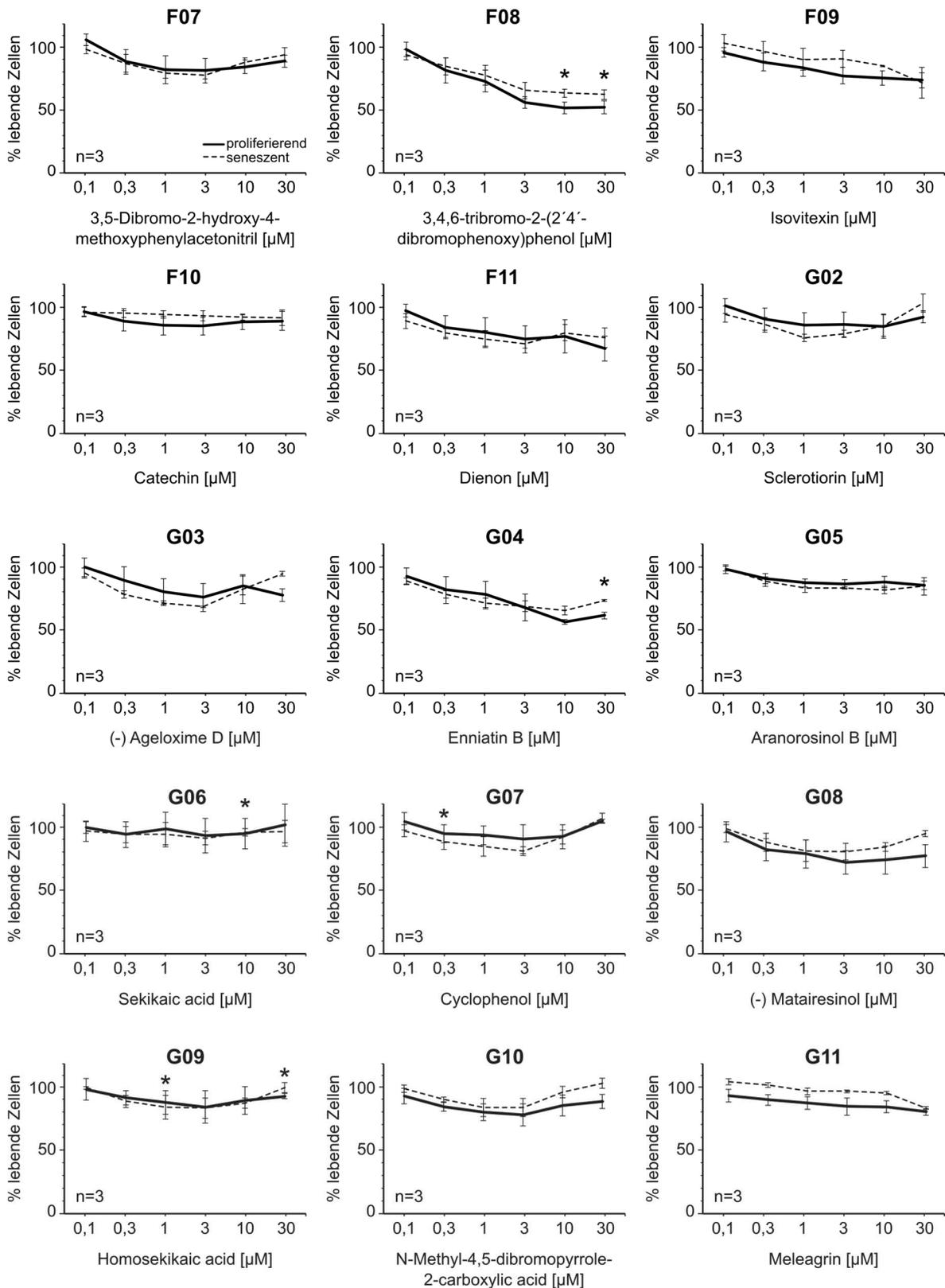
HCT116 P01C07- P01D11



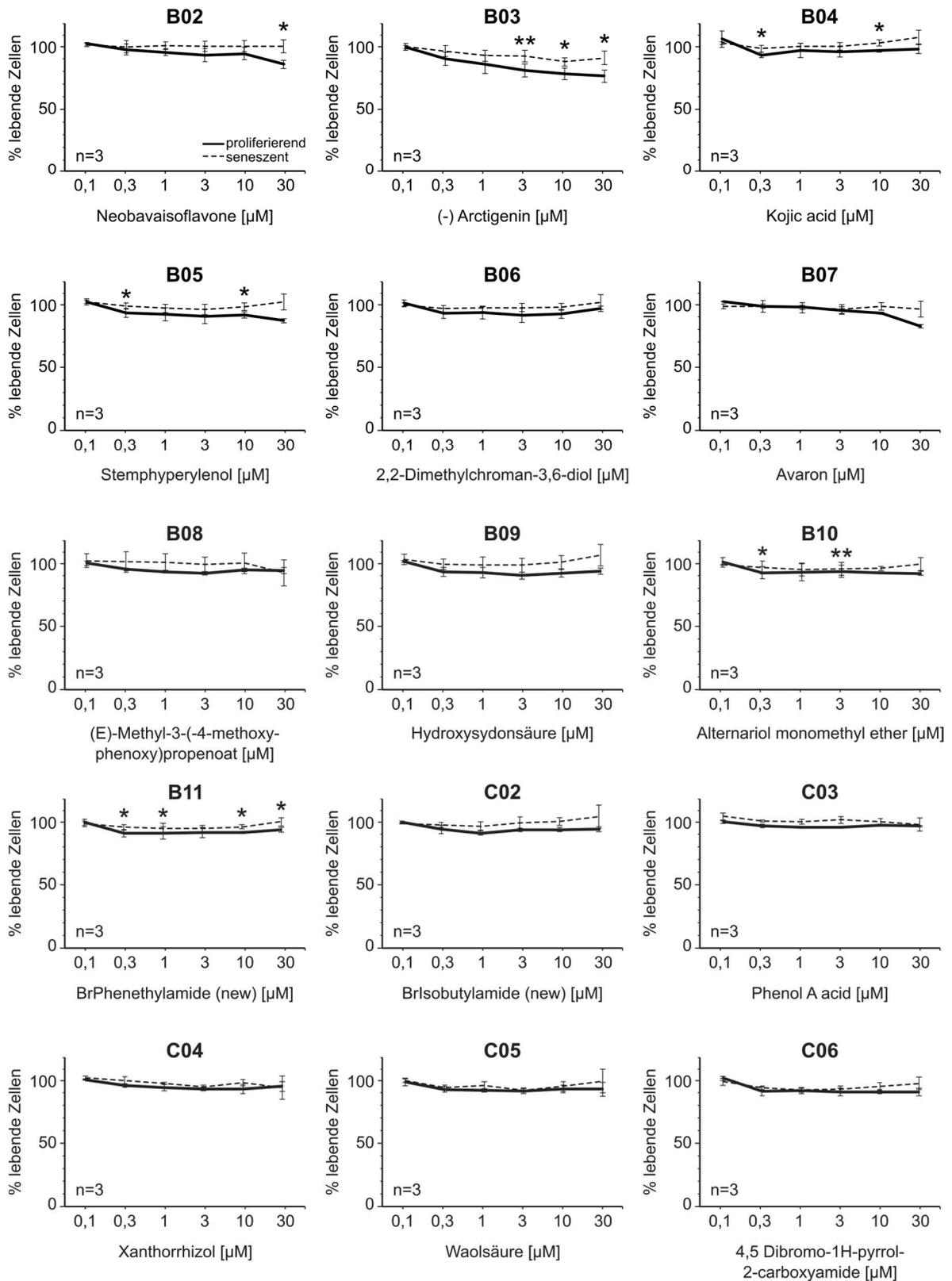
HCT116 P01E02- P01F06



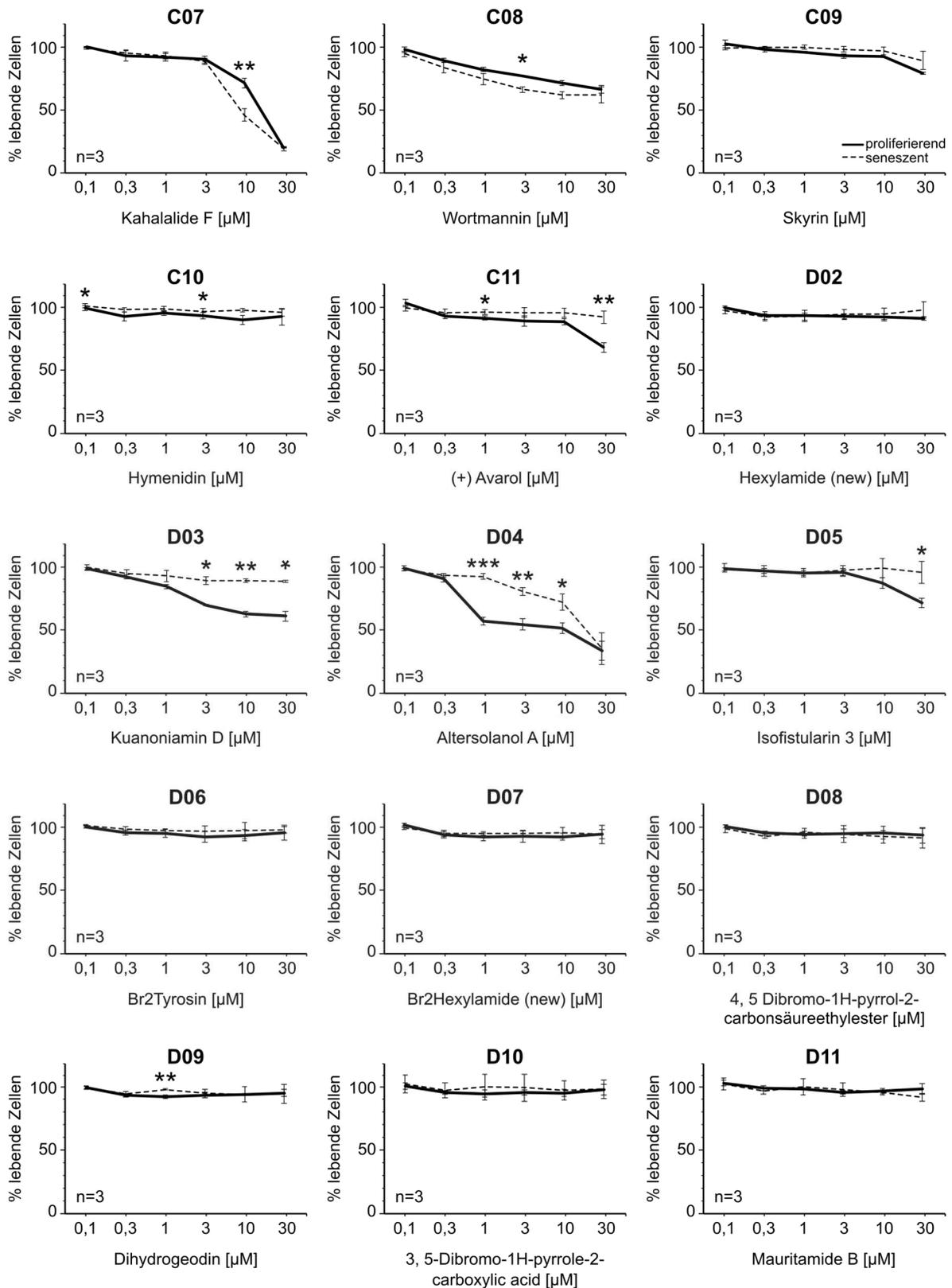
HCT116 P01F07- P01G11



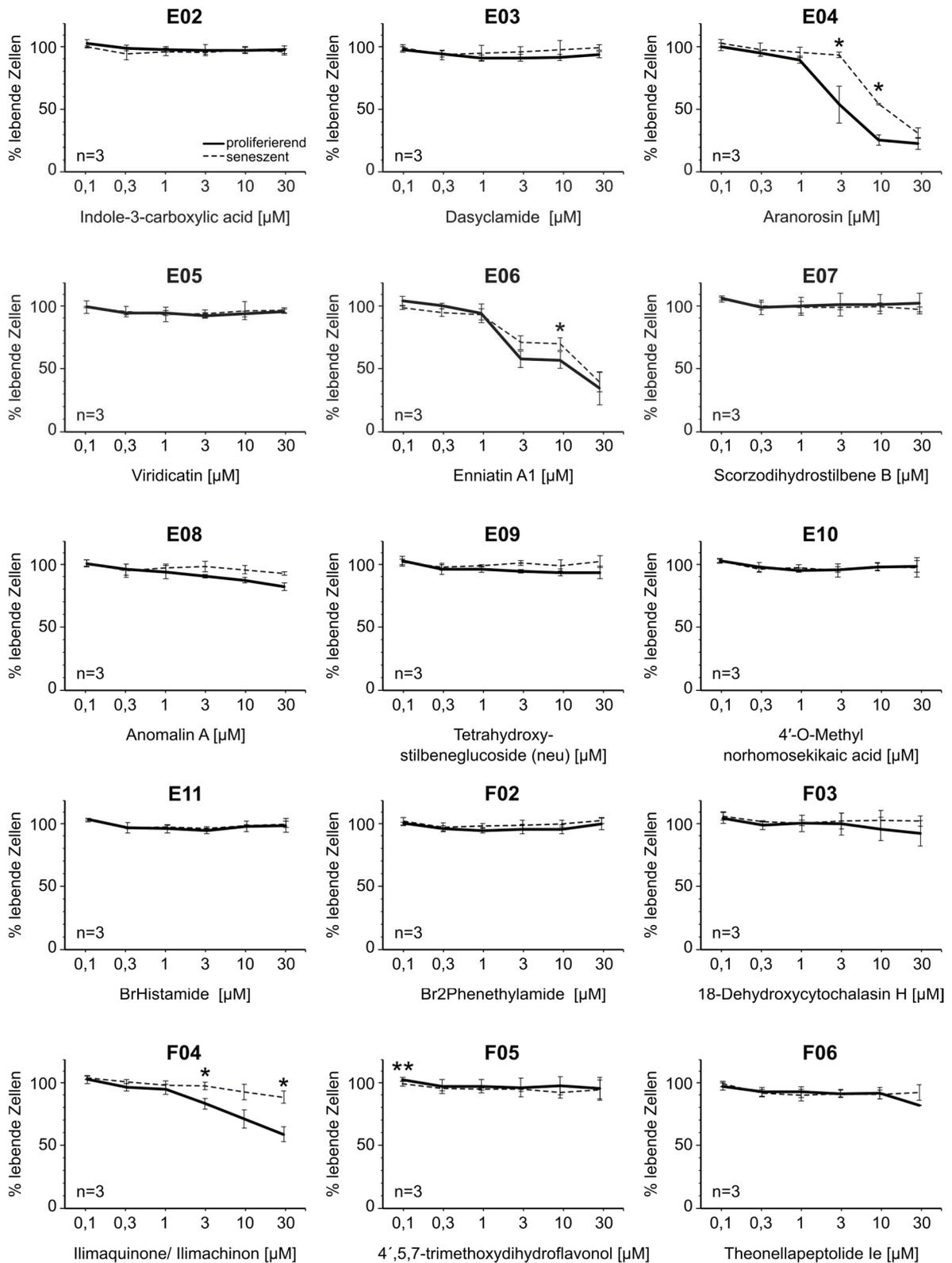
HCT116 P02B02- P01C06



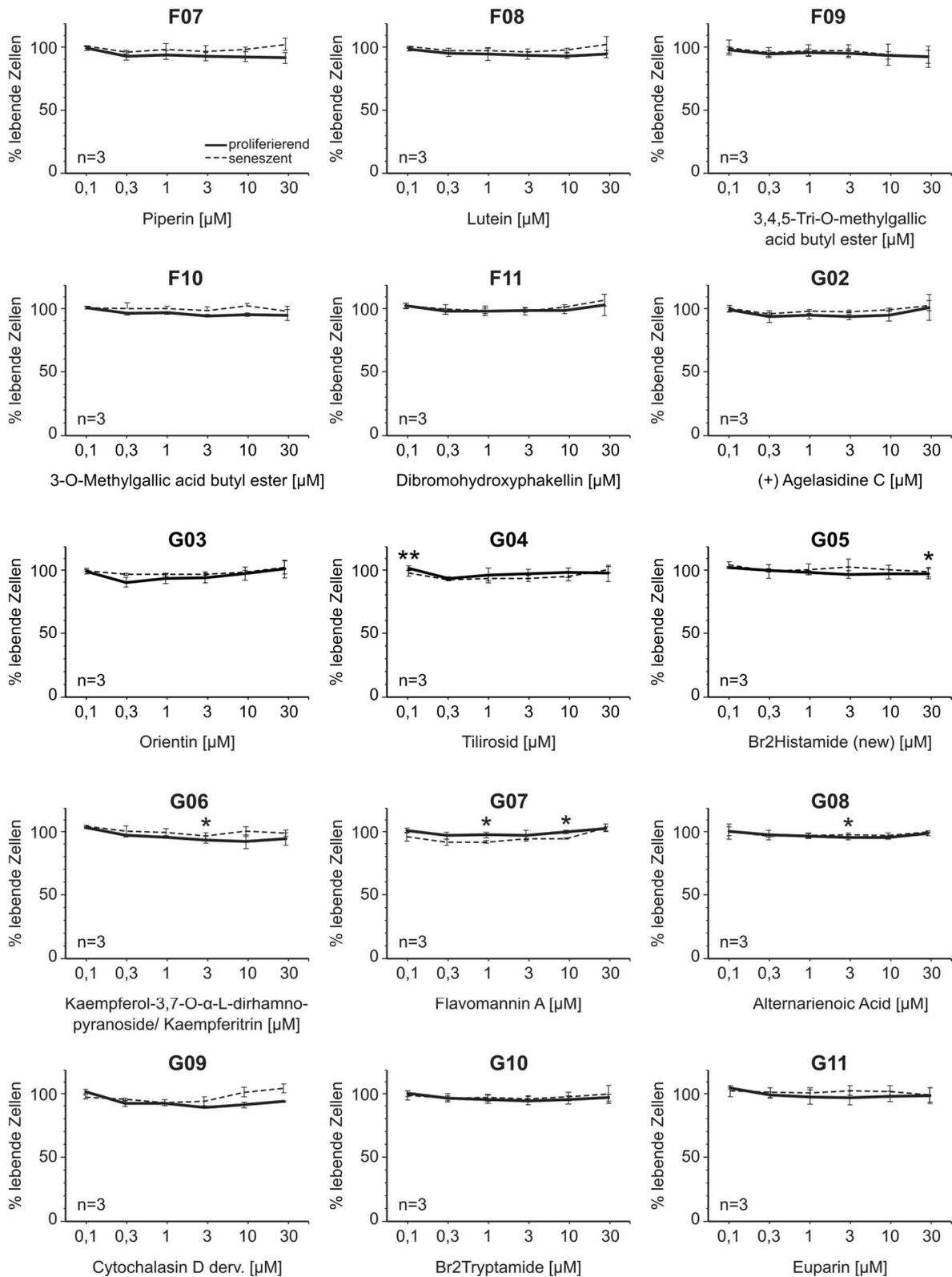
HCT116 P02C07- P02D11



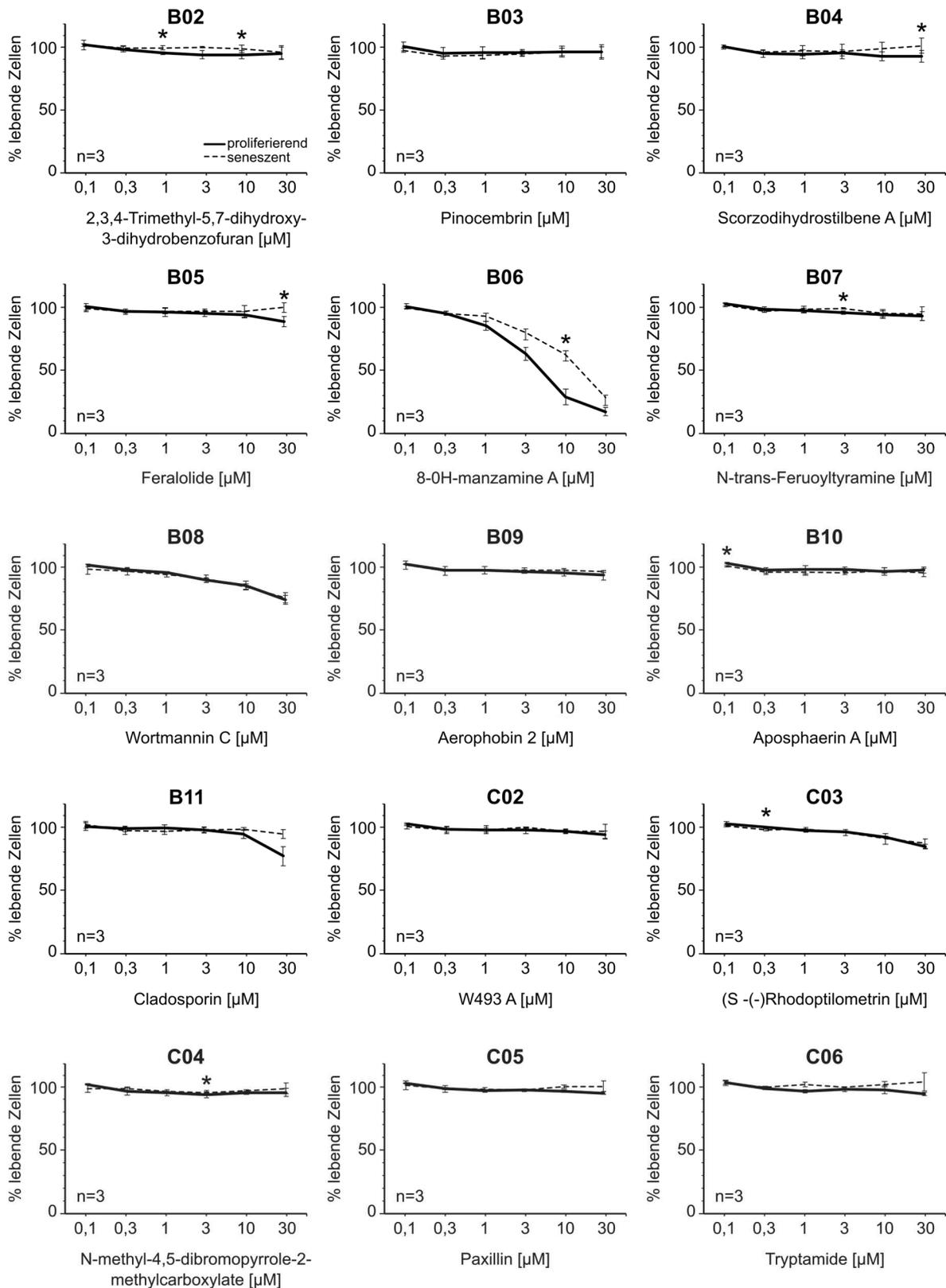
HCT116 P02E02- P02F06



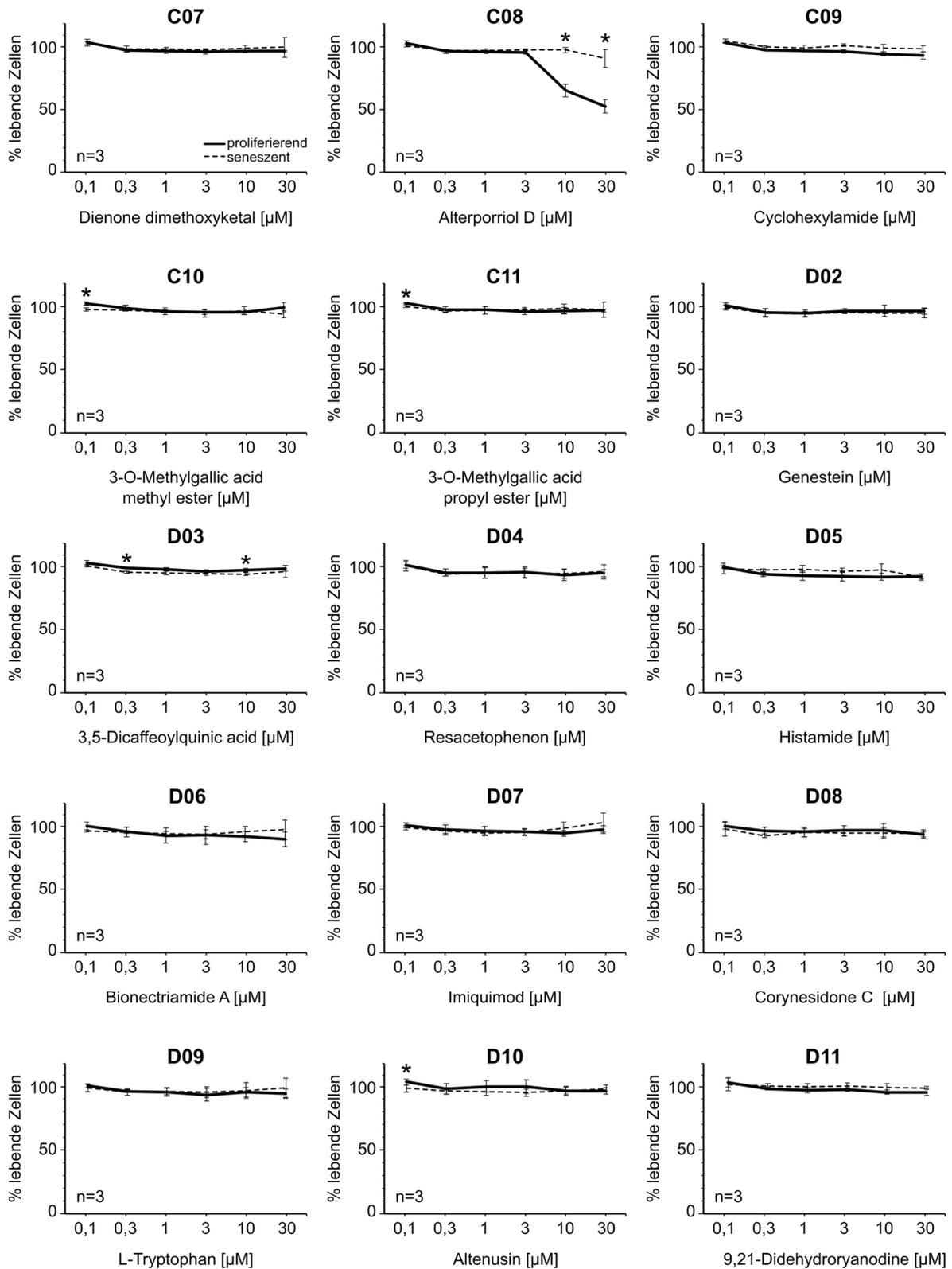
HCT116 P02F07- P02G11



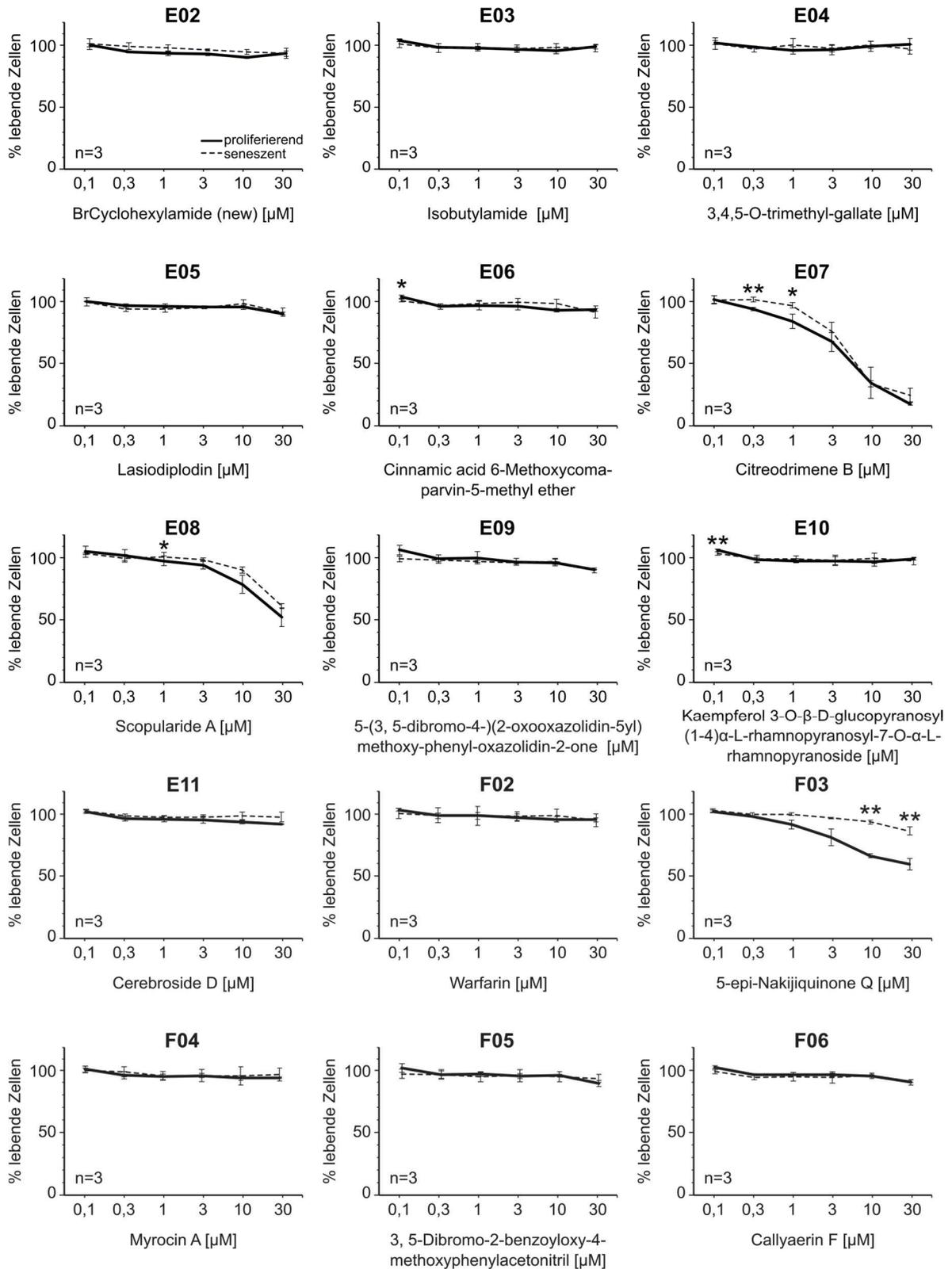
HCT116 P03B02- P03C06



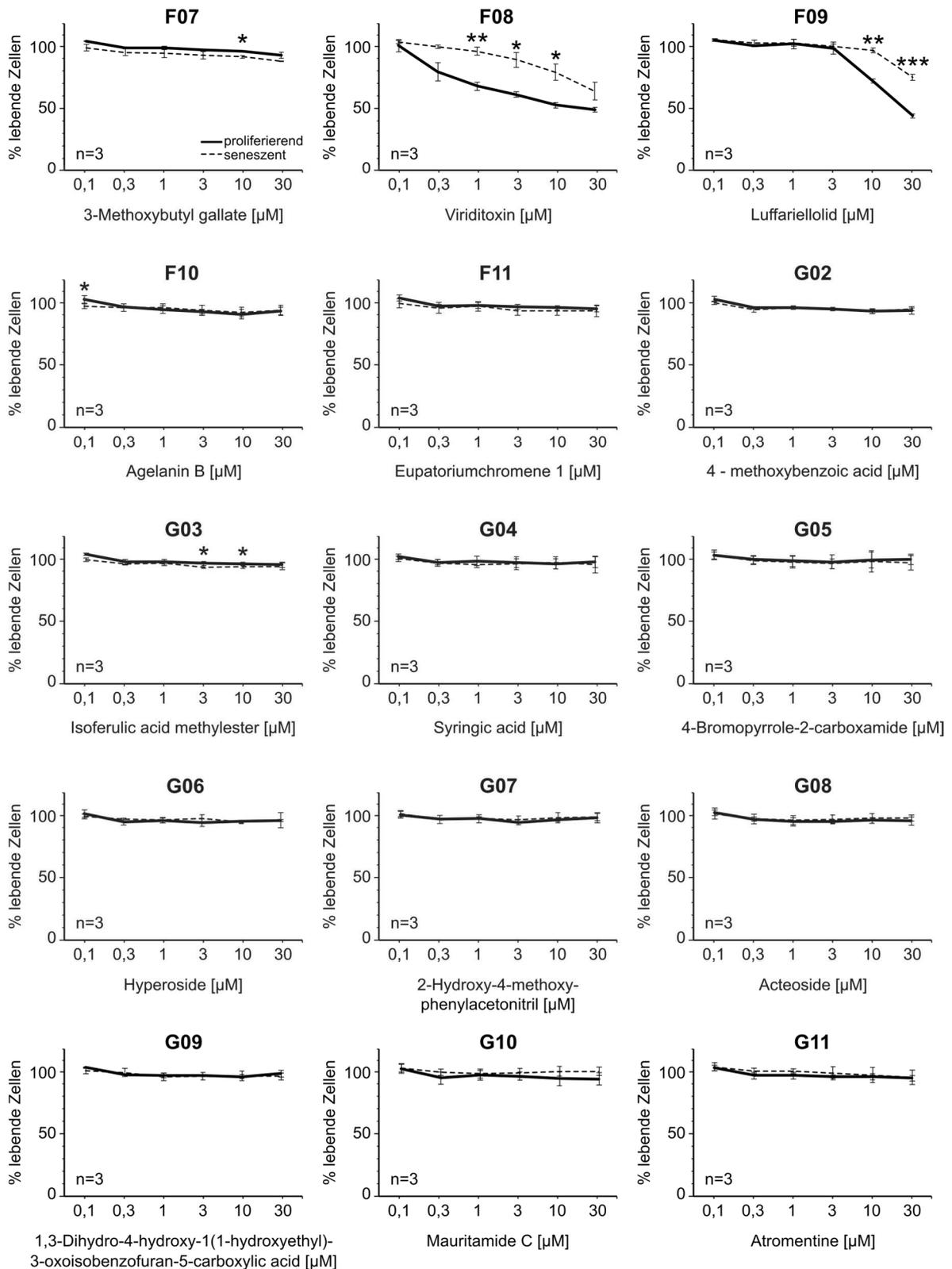
HCT116 P03C07- P03D11



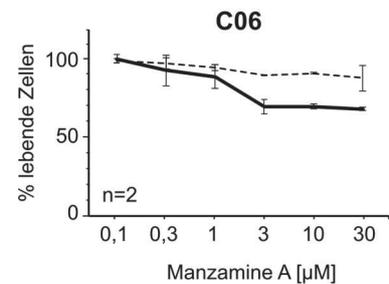
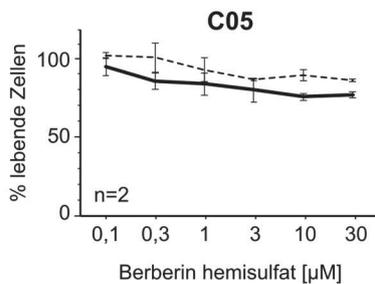
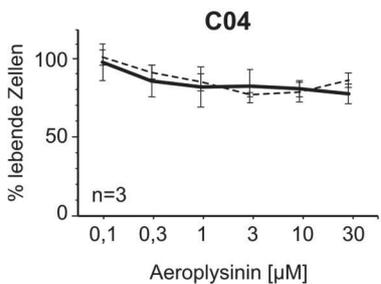
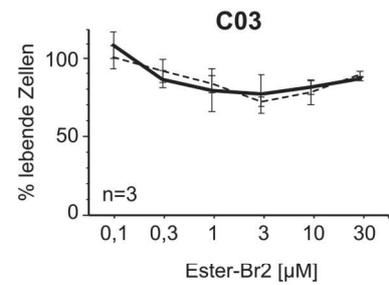
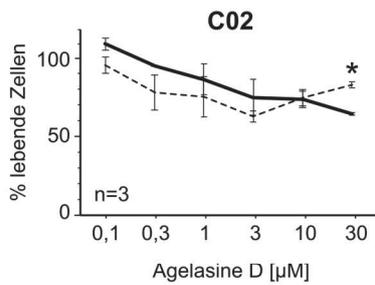
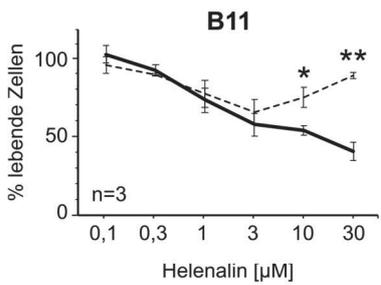
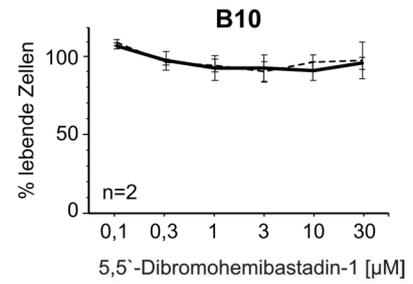
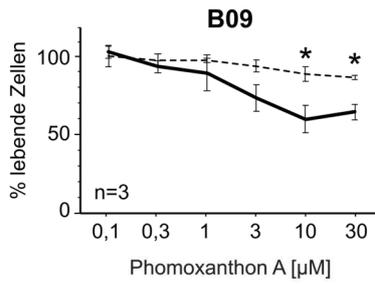
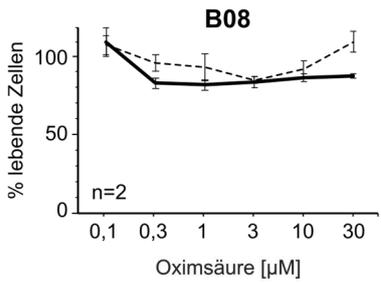
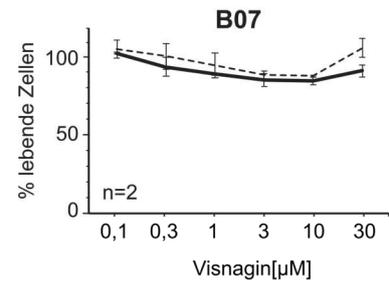
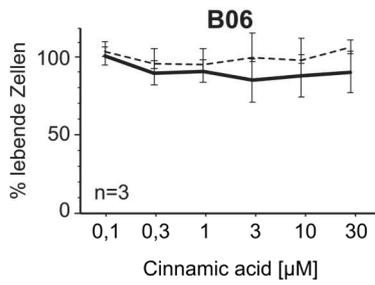
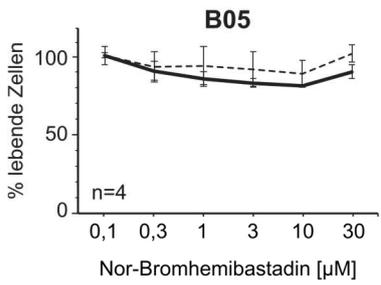
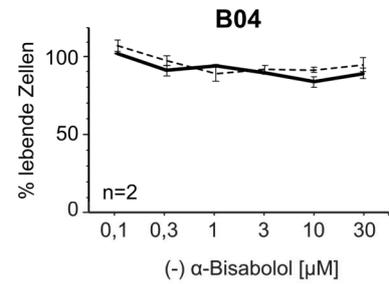
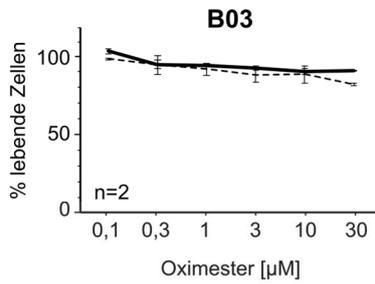
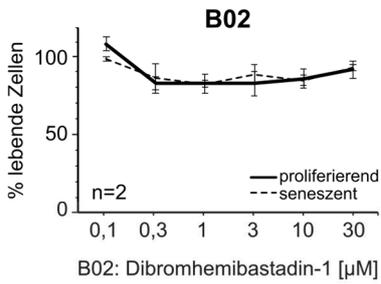
HCT116 P03E02- P03F06



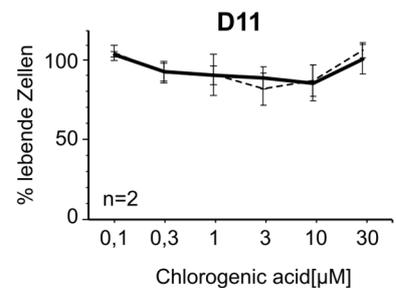
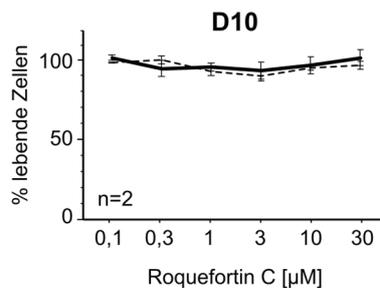
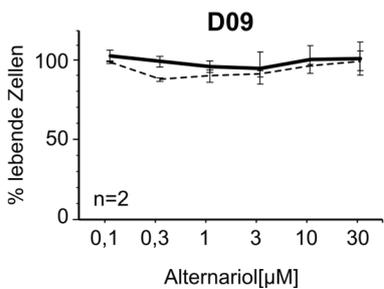
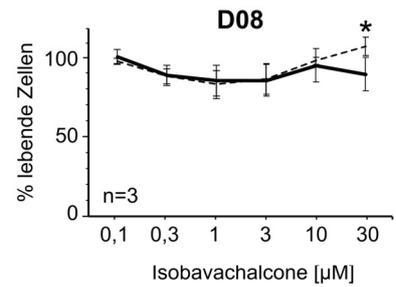
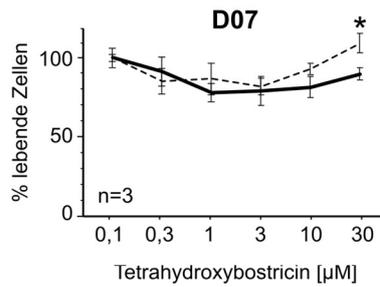
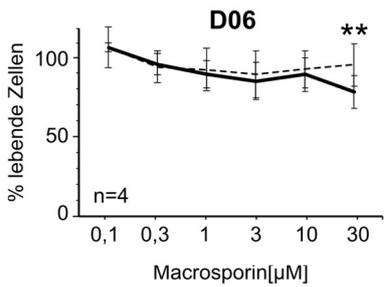
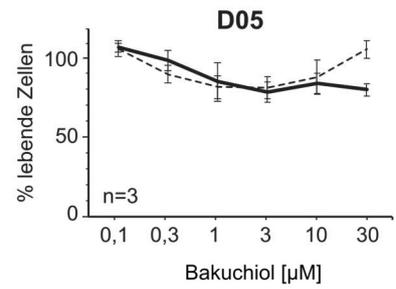
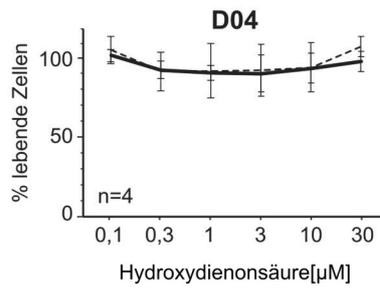
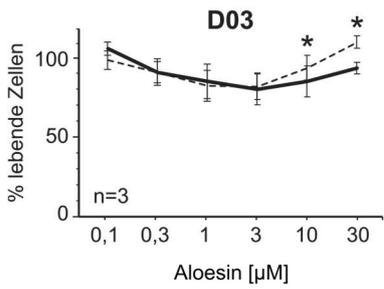
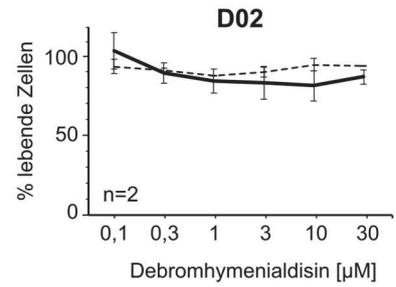
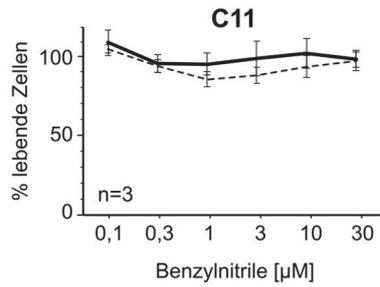
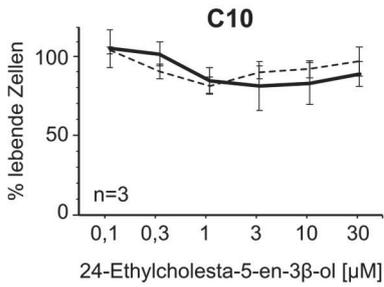
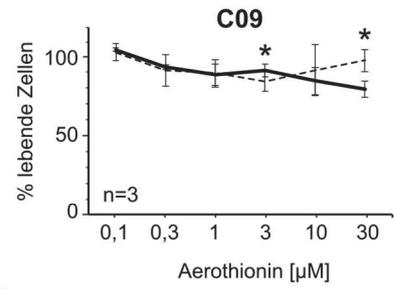
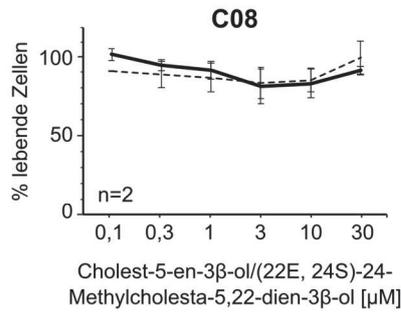
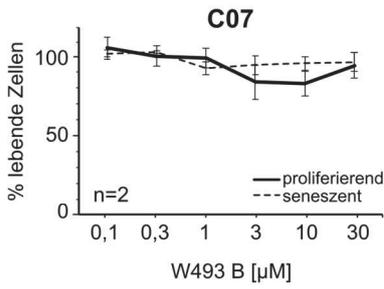
HCT116 P03F07- P03G11



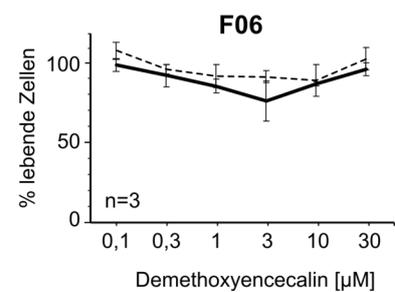
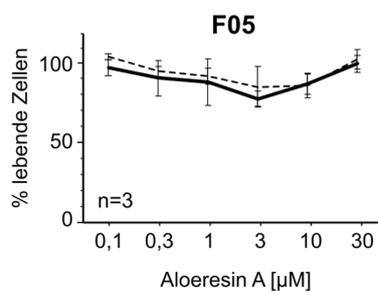
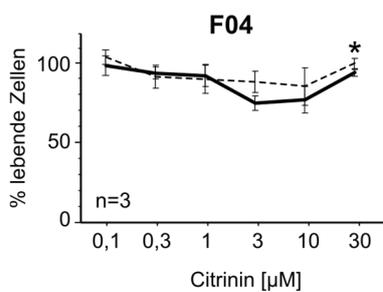
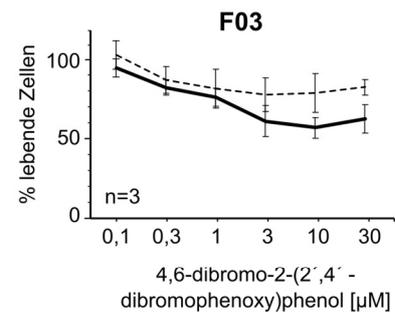
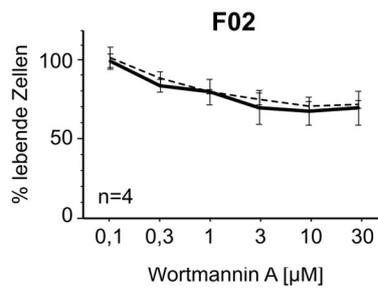
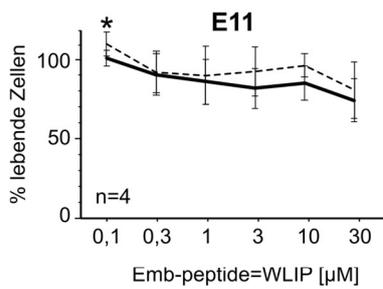
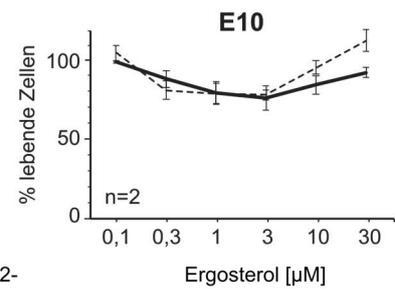
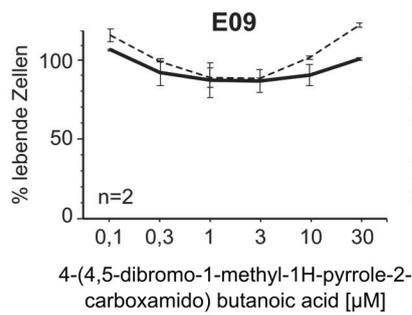
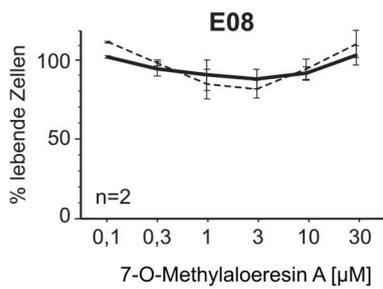
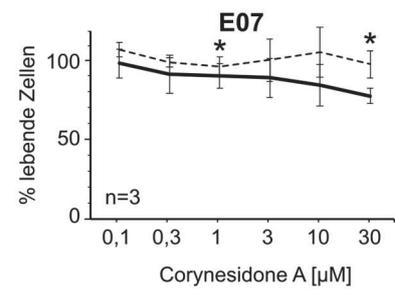
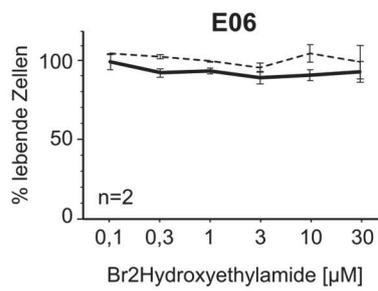
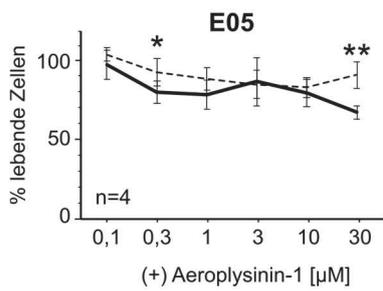
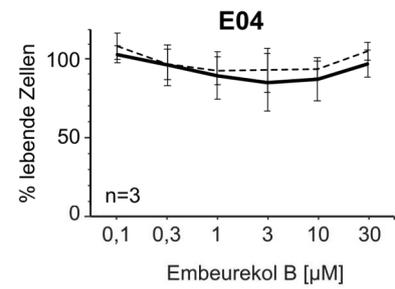
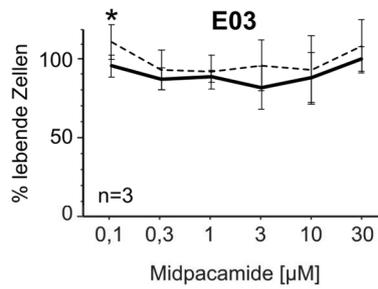
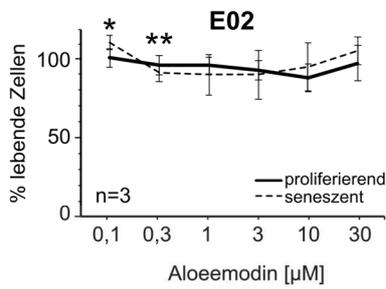
MCF-7 P01B02- P01C06



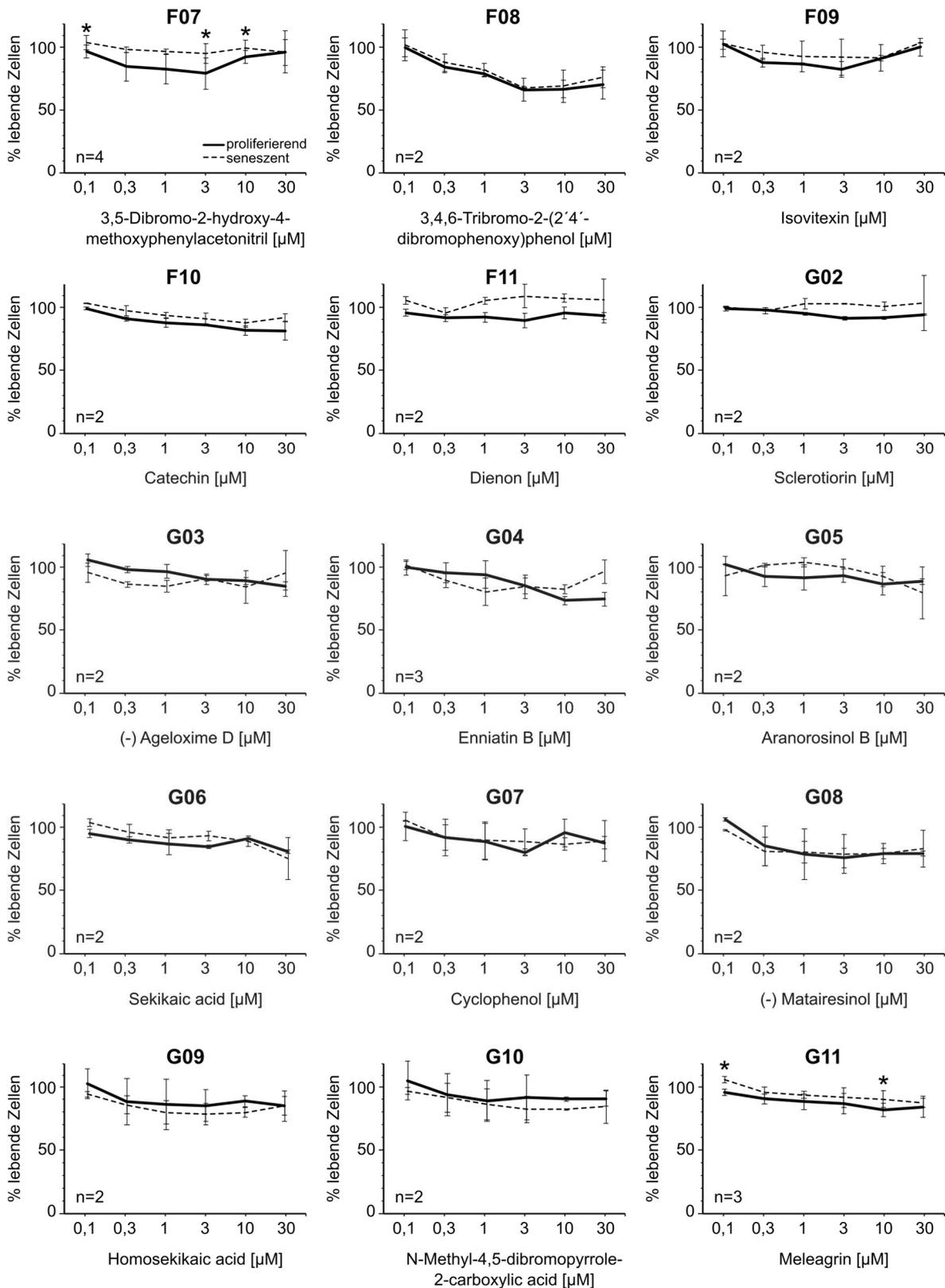
MCF-7 P01C07- P01D11



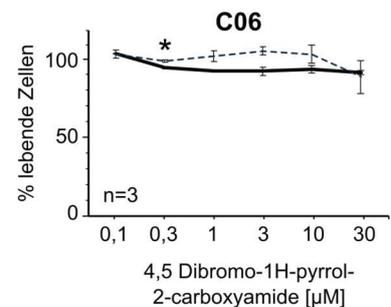
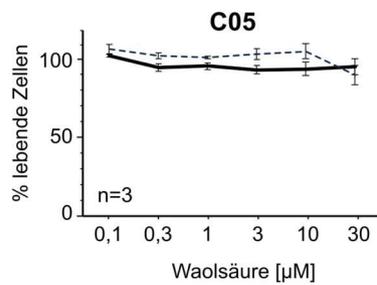
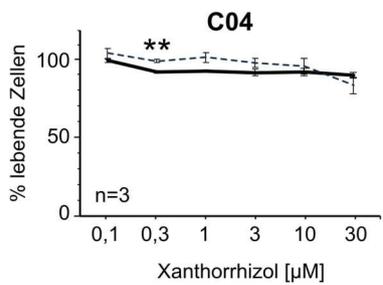
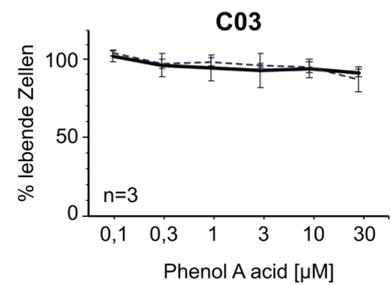
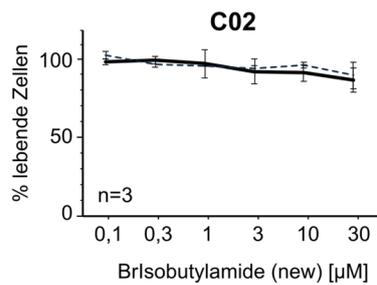
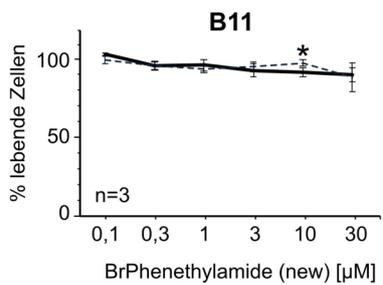
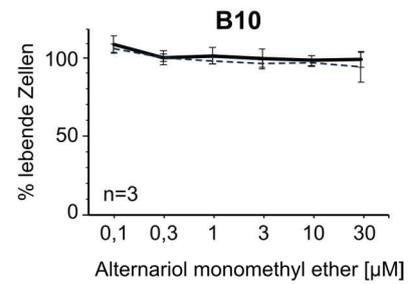
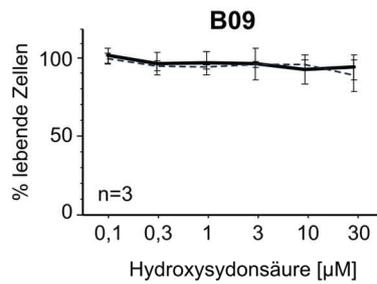
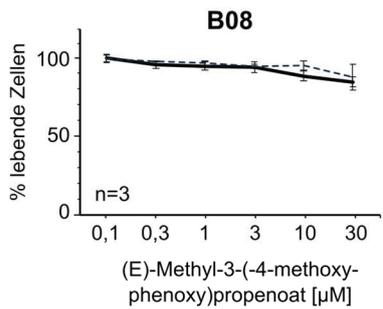
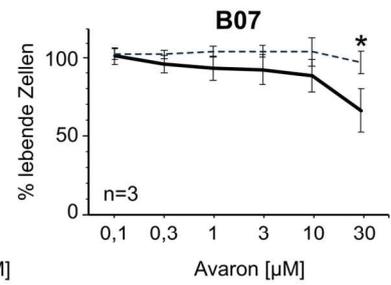
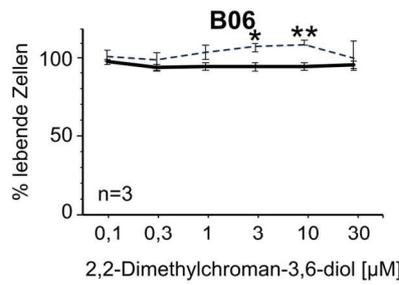
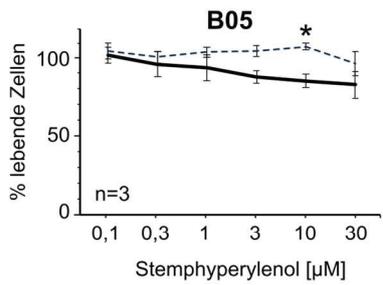
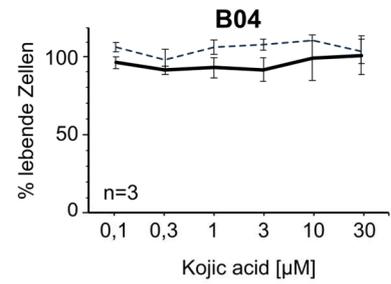
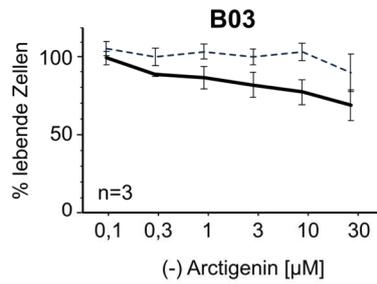
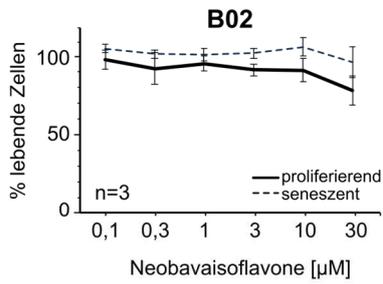
MCF-7 P01E02- P01F06



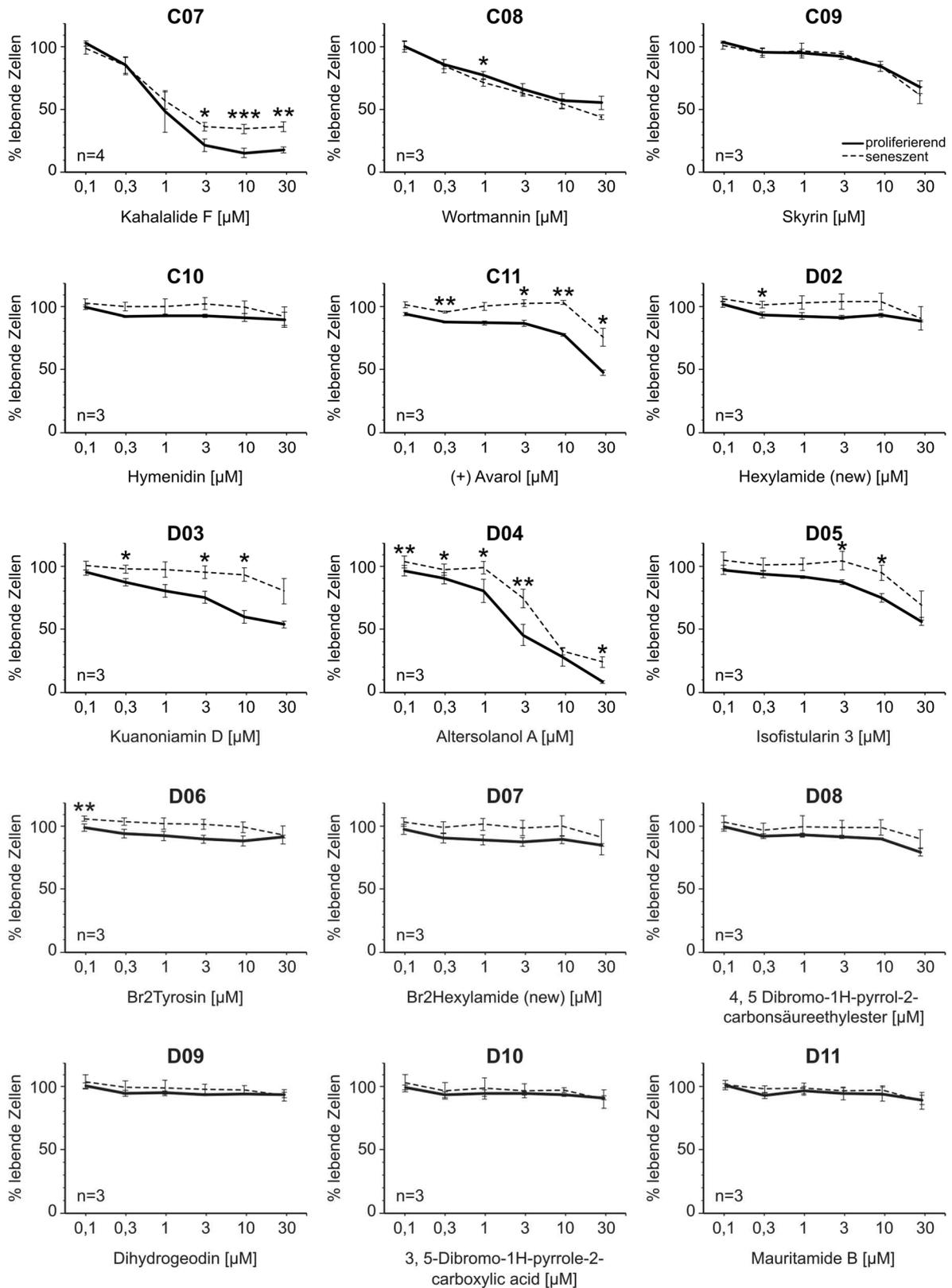
MCF-7 P01F07- P01G11



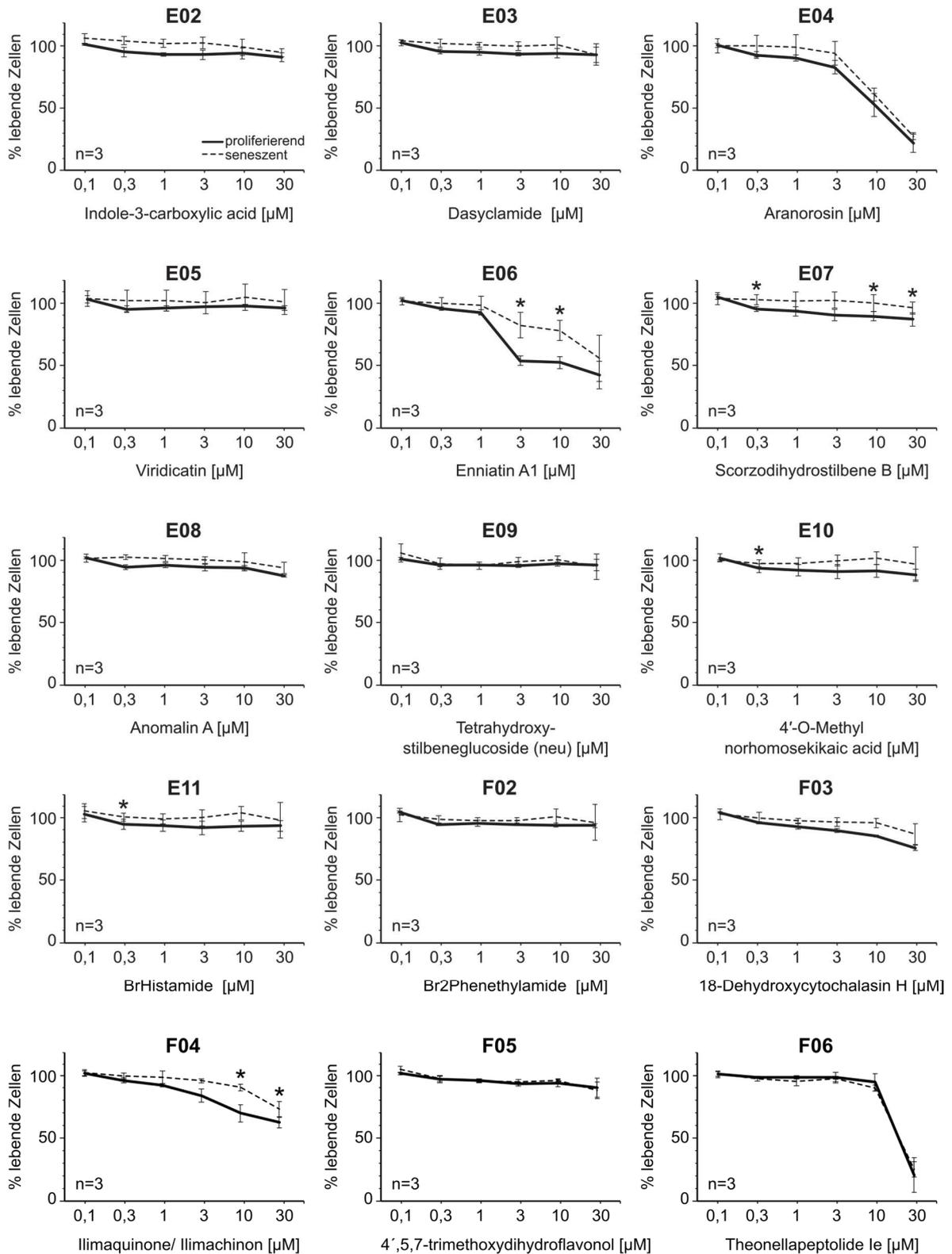
MCF-7 P02B02- P02C06



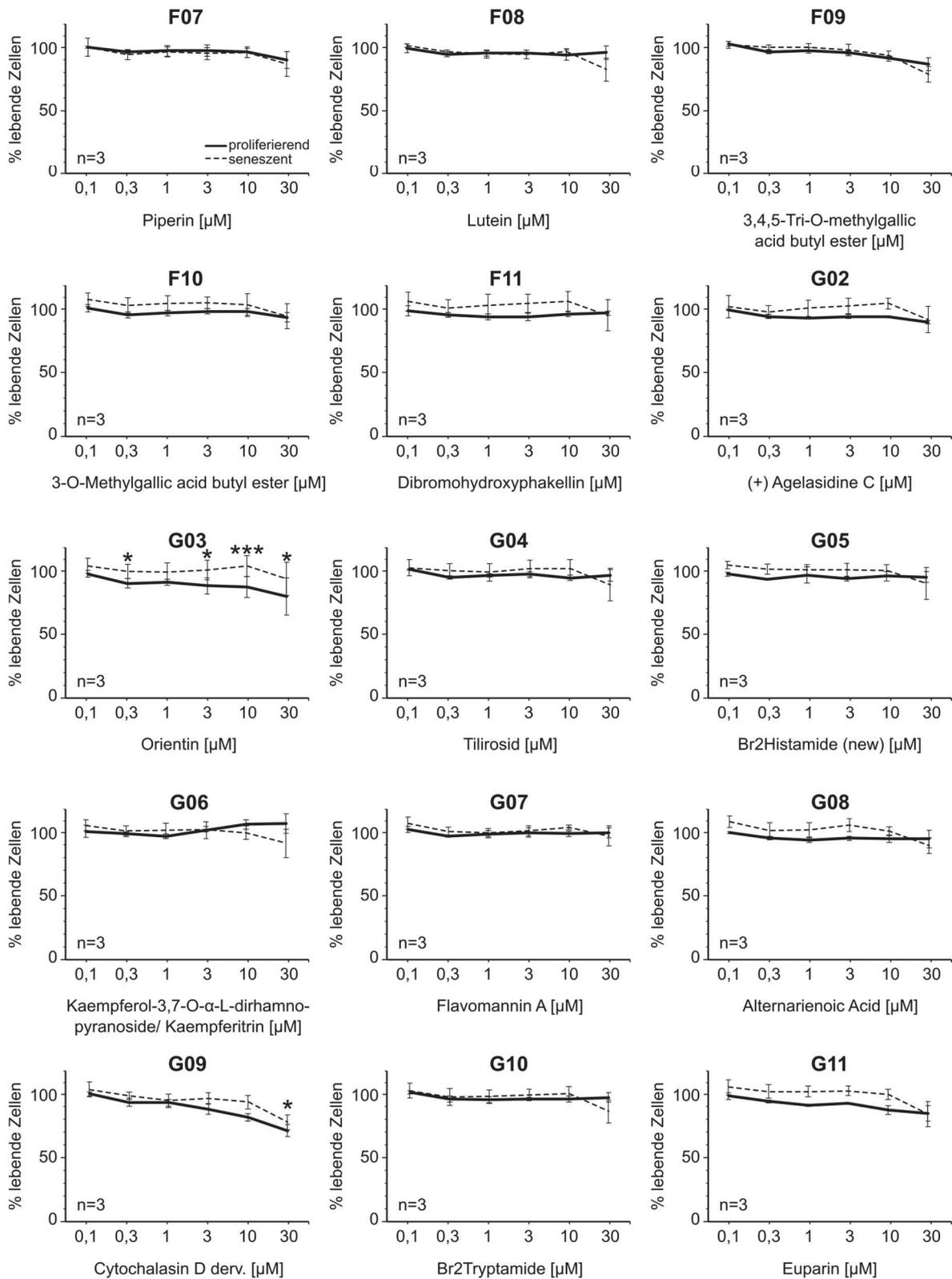
MCF-7 P02C07- P02D11



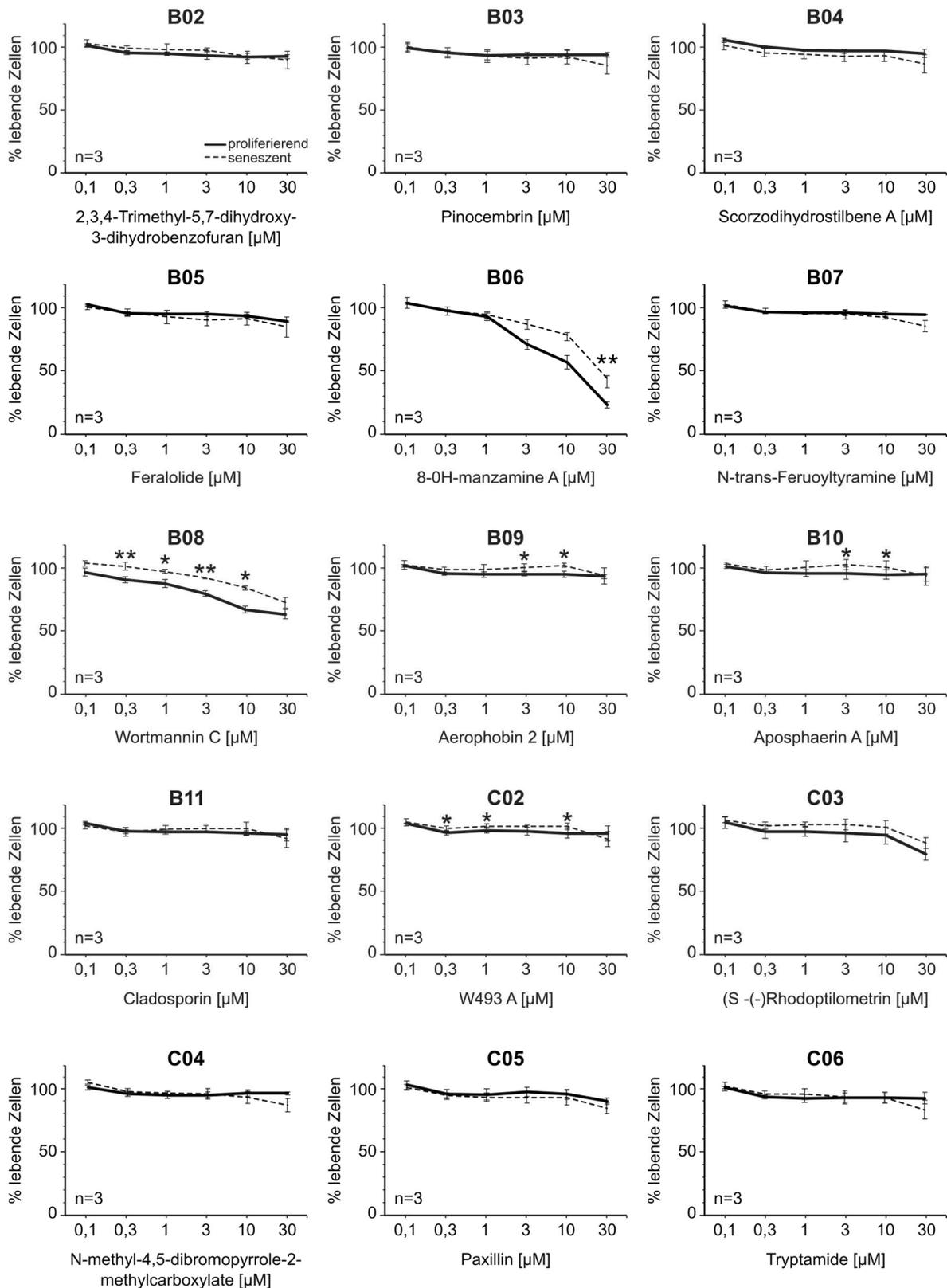
MCF-7 P02E02- P02F06



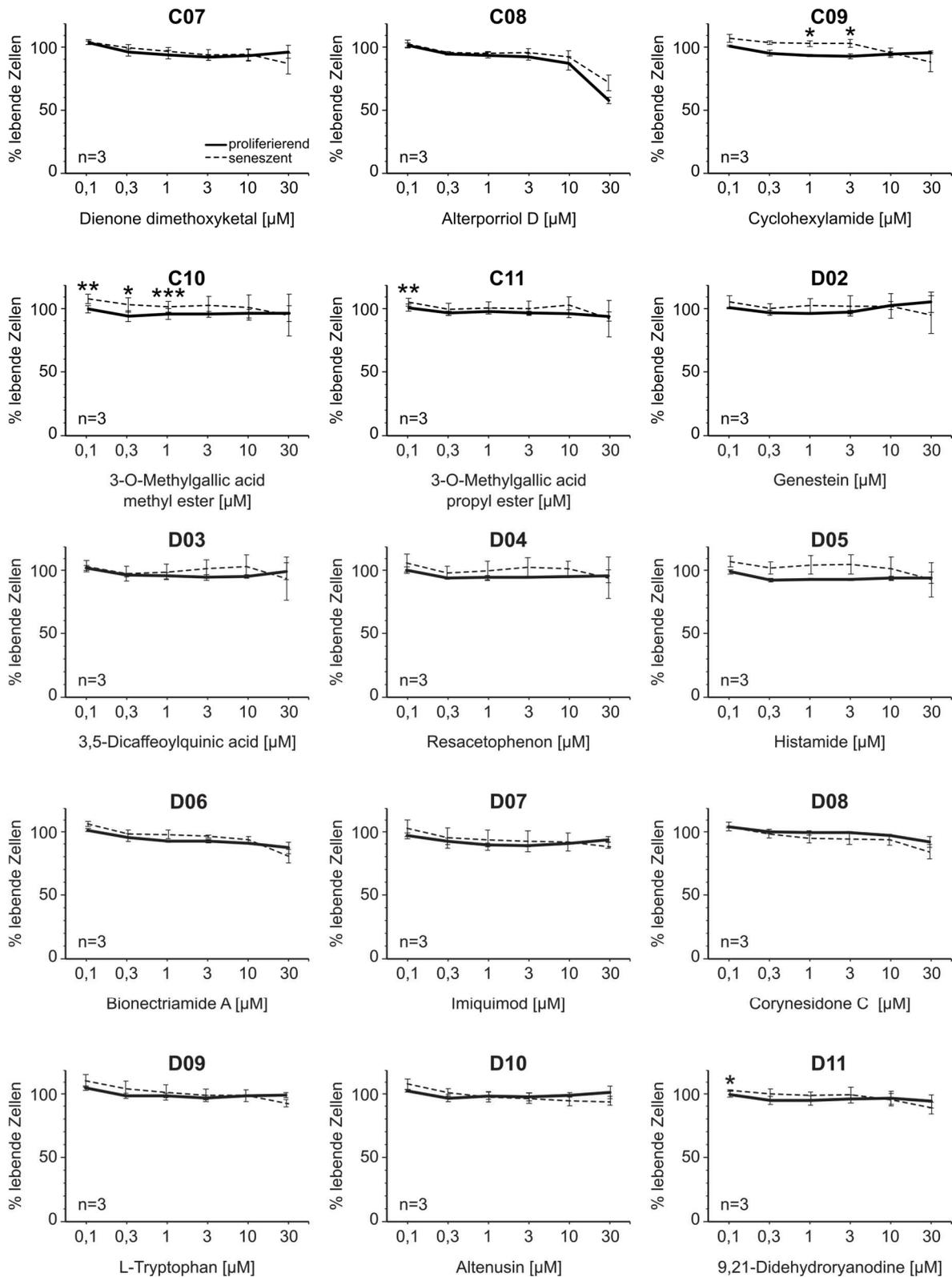
MCF-7 P02F07- P02G11



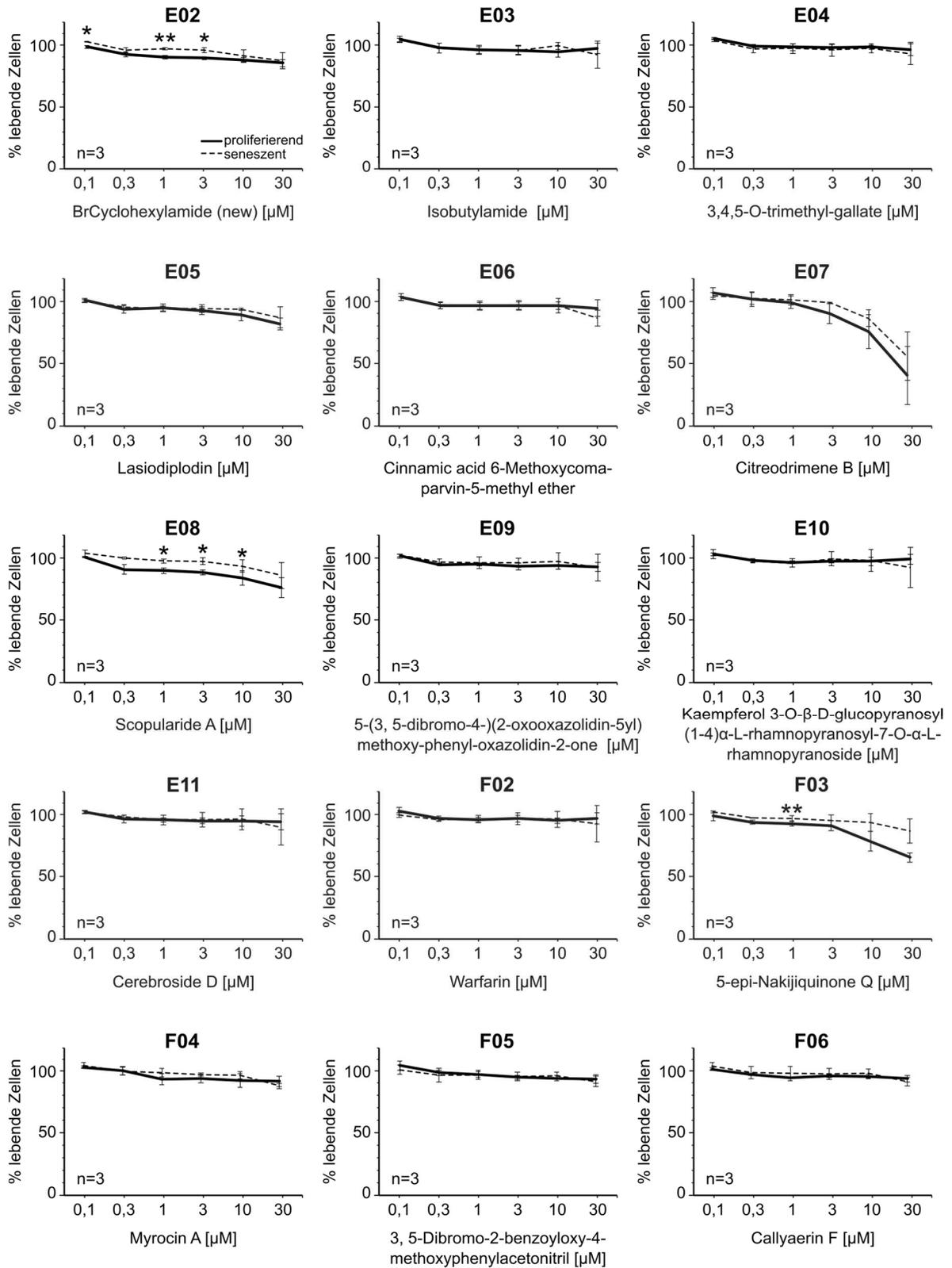
MCF-7 P03B02- P03C06



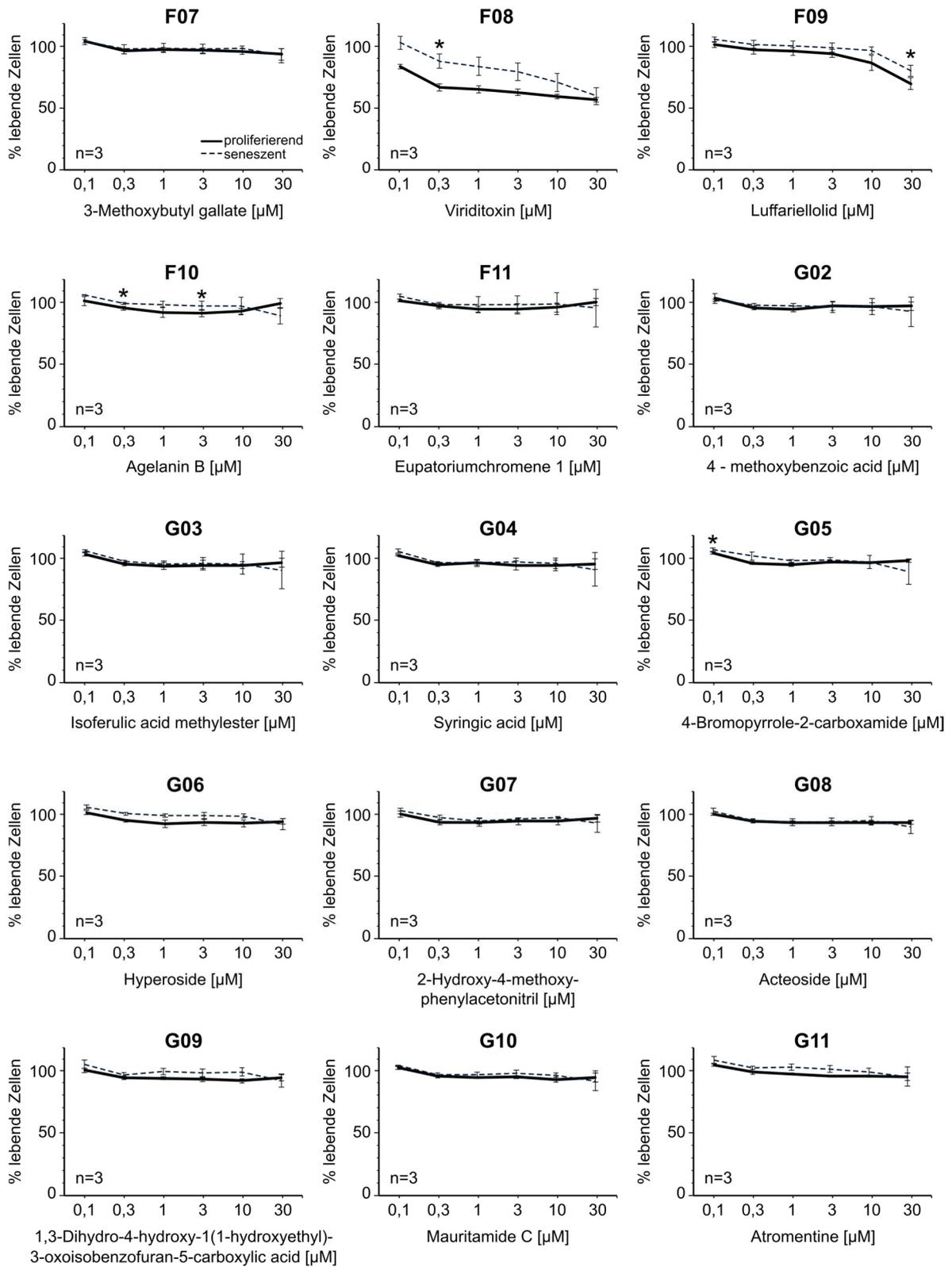
MCF-7 P03C07- P03D11



MCF-7 P03E02- P03F06



MCF-7 P03F07- P03G11



7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor R. U. Jänicke für die Übernahme der Betreuung, die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Möglichkeit, in seinem Labor für Molekulare Radioonkologie meine medizinische Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. B. Stork möchte ich mich für die Übernahme der Co-Betreuung bedanken.

Danken möchte ich außerdem Herrn Professor P. Proksch und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Naturstoffbibliothek und die Möglichkeit, sie für diese Forschungsarbeit nutzen zu dürfen.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. D. Sohn für die fachliche Unterstützung bei der Festlegung des Forschungsthemas, der Versuchsplanung und experimentellen Durchführung, der statistischen Auswertung und der Anfertigung der schriftlichen Ausarbeitung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Jana Deitersen für die inhaltliche sowie Fabian Neuwahl, Iris Paulussen und Walburga Synofzik für die sprachliche Korrektur.

Danken möchte ich auch Alina Reese, Claudia Radine, Selina Dangeleit und Christine Disselhoff für die Unterstützung im Labor, für die Beantwortung meiner Fragen rund um die Forschungsarbeit und für das angenehme Arbeitsklima.

Ich bedanke mich beim ganzen Team der molekularen Medizin für die Bereitstellung ihrer Räumlichkeiten und Geräte, sowie für die freundliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danken möchte ich in diesem Zusammenhang David Schlütermann und Herrn Prof. B. Stork für die zur Verfügung gestellten Inhibitoren und die fachliche Beratung.

Mein Dank gilt außerdem meiner Familie, die mir während der Bearbeitung meiner Dissertation Rückhalt gegeben hat.