

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Juliane Hörner-Rieber

Der PI3K-Inhibitor PX-866 als Senolytikum: Analyse der
verantwortlichen molekularen Signaltransduktionswege

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Chantal Alexandra Neumann

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. Dennis Sohn

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

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Neuwahl, J., Neumann, C.A., Fitz, A.C., Biermann, A.D., Magel, M., Friedrich, A., Sellin, L., Stork, B., Piekorz, R.P., Proksch, P., Budach, W., Jänicke, R.U. & Sohn, D., (2024), Combined inhibition of class 1-PI3K-alpha and delta isoforms causes senolysis by inducing p21^{WAF1/CIP1} proteasomal degradation in senescent cells. *Cell Death & Disease*, 15(5):373

Zusammenfassung

Seneszente Zellen sind seit der erstmaligen Beschreibung durch Hayflick und Moorhead (1961) vor allem in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Forschung gerückt. So spielen diese Zellen, die in einen terminalen und stabilen Zellzyklusarrest eintreten, bei vielen altersassoziierten Erkrankungen und Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Vor allem in Bezug auf Letztere werden seneszente Zellen häufig als zweiseitiges Schwert bezeichnet, da sie zum einen die Entstehung von Tumorzellen verhindern sowie die Eliminierung fördern, zum anderen aber die Bildung von Metastasen und Rezidiven begünstigen sowie Nebenwirkungen der Therapien verursachen. Daher beschäftigt sich die Forschung mit der Entwicklung sogenannter Senolytika: Substanzen, die gezielt seneszente Zellen abtöten sollen. In vorherigen Arbeiten konnten der PI3K-Inhibitor Wortmannin und dessen klinisches Derivat PX-866 als potentielle Senolytika identifiziert werden. Ihre genaue senolytische Wirkweise ist bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher den molekularen Wirkmechanismus von PX-866 als Vertreter dieser Substanzklasse zu untersuchen. Durch die Identifikation der beteiligten Signalwege soll es möglich werden, noch spezifischere senolytisch wirkende Substanzen zu finden oder aber die Wirkung von PX-866 durch die Koapplikation von anderen Substanzen zu verstärken. Hierfür wurde Seneszenz durch ionisierende Strahlung mit 12 Gy in den Kolon- bzw. Mammakarzinomzelllinien HCT116 sowie MCF-7 induziert.

Da PX-866 einen panPI3K-Klasse-I-Inhibitor darstellt, wurde versucht die senolytische Wirkung mit dem Einsatz von siRNAs und der daraus resultierenden Reprimierung der Proteinsynthese der PI3Ks zu replizieren. Dies gelang allerdings nicht, da siRNAs lediglich einen *Knockdown* und keinen *Knockout* der entsprechenden Proteine erreichen und ein solcher für die senolytische Wirkung nicht ausreichend ist. Daher wurde sich auf die einzelnen Proteine des PI3K-Signalwegs fokussiert. Hierfür kamen Inhibitoren mit unterschiedlichen Angriffspunkten im Signalweg zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition mehrerer Isoformen der PI3K für die senolytische Wirkung entscheidend ist. Als vielversprechend präsentieren sich der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BAY80-6946, der PI3K α -Inhibitor Byl-719 sowie die Kombination von Byl-719 und dem PI3K δ -Inhibitor CAL-101. Diese bereits anderweitig in klinischen Studien erprobten Substanzen sollen den Einsatz einer senolytischen Therapie in der Onkologie ermöglichen. Denkbar wäre eine Applikation von Senolytika nach vorheriger Strahlen- oder Chemotherapie, um die durch diese Therapie chronisch entstehenden seneszenten Zellen zu eliminieren und damit sowohl die Bildung von Metastasen und Rezidiven als auch das Auftreten von Nebenwirkungen deutlich zu reduzieren.

Abstract

Since they were first identified by Hayflick and Moorhead (1961), senescent cells have become more and more of a source of interest, especially in recent years. These cells, which enter a terminal and stable cell cycle arrest, play an important role in many age-related diseases and cancer. Especially in regard to cancer senescent cells are often called a double edged sword because on the one hand they prevent the development of tumour cells and promote their elimination but on the other hand they promote the formation of metastases and relapses and are responsible for side effects of the therapy. Research is therefore focusing on the development of so-called senolytics: Substances, which are able to specifically kill senescent cells. In previous studies the PI3K-inhibitor Wortmannin and its clinical derivate PX-866 were identified as potential senolytics. Their exact mode of senolytic action is not yet known. The aim of this thesis was therefore to investigate the molecular mechanism of action of PX-866 as a representative of senolytics. By identifying the signalling pathways involved, it should be possible to detect even more specific senolytic substances or to enhance the effect of PX-866 by co-application with other substances. For this purpose, senescence was induced by irradiation with 12 Gy in the colon- and breast cancer cell lines HCT116 and MCF-7.

As PX-866 is a panPI3K class I inhibitor, an attempt was made to replicate the senolytic effect by using siRNAs to suppress the protein synthesis of PI3Ks. This did not succeed because siRNAs cause only a knockdown and not a knockout in the relating proteins, which is not enough to achieve a senolytic effect. Therefore, the focus shifted to the individual proteins of the PI3K signalling pathway. For this purpose, inhibitors with different targets in the PI3K signalling pathway were used. It could be shown that the combined inhibition of different isoforms of the PI3K is crucial for the senolytic effect. The panPI3K class I inhibitor BAY80-6946, the PI3K α inhibitor Byl-719 and the combination of Byl-719 and the PI3K δ inhibitor CAL-101 proved to be promising. These compounds, which have already been tested in other functions, are intended to enable the use of senolytic therapy in oncology. It is conceivable to apply the senolytics after prior radiotherapy or chemotherapy in order to eliminate the senescent cells that chronically accumulate during these therapies and thus to be able to severely limit the formation of metastases and relapses as well as the induction of side effects.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Protein Kinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cm	Zentimeter
CTK	<i>cytosolic tyrosin kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ERK	<i>extracellular-signal related kinase</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK	Glykogensynthase-Kinase
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IL-6	Interleukin 6
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
Kap.	Kapitel

kV	Kilovolt
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Tween
PDK	<i>pyruvate dehydrogenase kinase</i>
PIK3CA	<i>PI3K catalytic subunit alpha</i>
PIK3CD	<i>PI3K catalytic subunit delta</i>
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prol.	Proliferierend
PtdIns	Phosphatidylinositol
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rb	Retinoblastom
RISC	<i>RNA-induced-silencing-complex</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RSK	<i>ribosomal S6 kinase</i>
RTK	Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinase
SAβ-GAL	Seneszenz-assoziierte beta-Galactosidase
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer-Phänotyp
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sen.	Seneszent
Ser	Serin
SGK	Serum-Glukokortikoid-regulierte-Kinase
siCon	Kontroll siRNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFα	<i>transforming growth factor alpha</i>
Thr	Threonin
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zelluläre Seneszenz	1
1.2	Mechanismen der Seneszenzinduktion	2
1.2.1	Die Rolle von p53 und p21	2
1.3	Positive und negative Aspekte seneszenten Zellen in der Onkologie	4
1.4	Der PI3K-Signalweg und PX-866 und Wortmannin	6
1.5	Andere Inhibitoren des PI3K Signalwegs	8
1.6	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Zellen und Zellzahlen	13
2.1.2	Inhibitoren, Antikörper, Chemikalien, Puffer und Lösungen	13
2.1.3	Geräte und Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Seneszenzinduktion und Stimulation	17
2.2.2	Kristallviolett-Zytotoxizitätstest	19
2.2.3	LDH-Zytotoxizitätstest	20
2.2.4	siRNA-Transfektion	21
2.2.5	Zellextrakt-Herstellung und Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	23
2.2.6	SDS-Gelelektrophorese	23
2.2.7	Western-Blot	24
2.2.8	Statistik und Datenaufbereitung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Wortmannin und PX-866 wirken senolytisch	26
3.2	Versuch der Reproduktion der senolytischen Wirkung mittels siRNA gesteuerten Knockdowns der PI3K	29
3.2.1	Nachweis der Wirksamkeit der siRNAs mittels Western Blot	29

3.2.2	Senolytische Wirkung von PX-866 kann durch siRNAs nicht reproduziert werden.....	32
3.3	Reproduktion der senolytischen Wirkung von PX-866 durch Inhibition verschiedener Kinasen des PI3K-Signalwegs	34
3.3.1	Die Inhibition von PI3K Effektorkinasen übt keinen senolytischen Einfluss aus	34
3.3.2	Pan-PI3K Inhibition ist für eine senolytische Wirkung entscheidend	40
3.3.3	Die gleichzeitige Inhibition der alpha und delta Isoform ist für die senolytische Wirkung ausreichend	45
4	Diskussion	48
4.1	Das senolytische Potential von PX-866 konnte verifiziert werden	48
4.1.1	Der senolytische Effekt von PX-866 beschränkt sich auf maligne Zellen	50
4.2	PX-866 führt über p21 Reduktion zur Apoptose seneszenten Zellen	51
4.3	siRNAs können die senolytische Wirkweise von PX-866 nicht replizieren.....	51
4.4	Die Inhibition verschiedener PI3K-Effektorkinasen ist nicht entscheidend für die senolytische Wirkung von PX-866	52
4.5	Die panPI3K Inhibition ist der entscheidende Faktor für die senolytische Wirkung von PX-866	55
4.5.1	Die Verwendung anderer panPI3K-Inhibitoren repliziert die senolytische Wirkung von PX-866.....	55
4.5.2	Die kombinierte Anwendung von Byl-719 und CAL-101 wirkt senolytisch ...	57
4.6	Die Verwendung von PI3K-Inhibitoren als Senolytika bietet Vorteile in der klinischen Anwendung im Vergleich zur bisherigen Verwendung	59
4.7	Ausblick und Schlussfolgerung	61
5	Literaturverzeichnis.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	13
Tabelle 2: Zellzahlen	13
Tabelle 3: Inhibitoren	13
Tabelle 4: Erstantikörper	14
Tabelle 5: Zweitantikörper	14
Tabelle 6: Chemikalien	14
Tabelle 7: siRNAs	15
Tabelle 8: Puffer/ Lösungen	15
Tabelle 9: Geräte	16
Tabelle 10: Software	17
Tabelle 11: Mengenangaben der Reaktionsgefäße für die siRNA-Transfektion	22

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des PI3K-Signalwegs.....	7
Abb. 2: Aufbau der Verdünnungsreihe auf einer 96-Proben-Platte.....	18
Abb. 3: Zeitlicher Ablauf von Aussaat bis zur Messung seneszenten und proliferierender HCT116- und MCF-7 Zellen.....	19
Abb. 4: PX-866 und Wortmannin reduzieren die Zellzahl von HCT116- und MCF-7 Zellen.	27
Abb. 5: PX-866 und Wortmannin wirken senolytisch.....	28
Abb. 6: Gegen PI3Kp110 α und PI3Kp110 δ gerichtete siRNAs reduzieren die nachgewiesene Menge an PI3Ks und phosphoryliertem AKT in seneszenten und proliferierenden HCT116-Zellen.....	30
Abb. 7: Gegen PI3Kp110 α und PI3Kp110 δ gerichtete siRNAs reduzieren die nachgewiesene Menge an PI3Ks und phosphoryliertem AKT in seneszenten und proliferierenden MCF-7 Zellen	31
Abb. 8: siRNAs erreichen die senolytische Wirkung von PX-866 nicht.....	32
Abb. 9: Gegen PI3K Isoformen gerichtete siRNAs können die senolytische Wirkung von PX-866 nicht replizieren.....	33
Abb. 10: Der PI3K-Signalweg mit Angriffspunkten der verwendeten Inhibitoren der Effektorkinasen.....	34
Abb. 11: Der AKT-Inhibitor MK-2206 erzielt keinen senolytischen Effekt	36
Abb. 12: Der SGK1-Inhibitor EMD 638683 wirkt nicht senolytisch.....	37
Abb. 13: Der PDK1-Inhibitor BX-795 wirkt nicht senolytisch.....	38
Abb. 14: Der PI3K-Klasse-III-, Vps34, Inhibitor SAR405 wirkt nicht senolytisch	39
Abb. 15: PI3K Inhibitoren reduzieren die nachgewiesene Menge von AKT-P.	41
Abb. 16: Der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BAY80-6946 wirkt senolytisch.....	42
Abb. 17: Der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BEZ-235 wirkt senolytisch.....	43
Abb. 18: Der PI3K- α Inhibitor Byl-719 wirkt senolytisch.....	44
Abb. 19: Der PI3K- δ Inhibitor CAL-101 zeigt keine senolytische Wirkung	45
Abb. 20: Die kombinierte Verwendung der beiden Isoform-spezifischen PI3K Inhibitoren, Byl-719 und CAL-101 in 10 μ M Konzentration wirkt senolytisch.....	46
Abb. 21: Byl-719 + CAL-101 induzieren ein größeres Ausmaß an Zelltod als Byl-719 alleine.	47
Abb. 22: Strukturformeln der neu identifizierten Senolytika	57

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Seneszenz

Seneszenz beschreibt einen Zustand der Zellen, bei welchem sie in einen stabilen und terminalen Zellzyklusarrest eintreten. Es gibt verschiedene Eigenschaften, die den seneszenten Phänotyp charakterisieren, wobei diese zusammengenommen Hinweise auf das Vorliegen seneszenten Zellen liefern können, aber niemals beweisend für das Vorhandensein seneszenten Zellen sind.

Senescente Zellen zeichnen sich unter anderem durch einen veränderten morphologischen Phänotyp aus. Die Zellen sind größer und flacher als vergleichbare proliferierende Zellen (Hernandez-Segura et al., 2018). Auch die Zellkerne erscheinen deutlich vergrößert und es können sich sogenannte Mikronuklei bilden (Carnero, 2013). So konnte bereits in den 1970er Jahren gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen einer Zunahme der Zellgröße und einer Abnahme der DNA-Synthese und damit der Proliferationsrate besteht (Bowman et al., 1975). Des Weiteren weisen senescente Zellen eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase (SA- β -GAL) auf (Dimri et al., 1995).

Nach Eintritt in den seneszenten Status weisen senescente Zellen eine veränderte metabolische Aktivität im Gegensatz zu proliferierenden Zellen auf. Dies unterscheidet sie beispielsweise auch von abgestorbenen, sich ebenfalls nicht mehr teilenden Zellen. Sie sezernieren verschiedene Stoffe wie Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche sowohl autokrin als auch parakrin wirken können (Coppé et al., 2006; Coppé et al., 2008; Paez-Ribes et al., 2019). Die Gesamtheit dieser freigesetzten Stoffe wird als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet (Coppé et al., 2008). Die Ausprägung dieses SASP ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So scheinen der Seneszenz-induzierende Mechanismus, der Zelltyp und die seit Seneszenzinduktion vergangene Zeit diesen zu beeinflussen (Coppé et al., 2011; Gonzalez-Meljem et al., 2018; Maciel-Barón et al., 2016).

Die Kombination dieser Merkmale ermöglicht eine relativ gute Identifizierung seneszenten Zellen, während allerdings ein Merkmal allein nicht ausreichend als Hinweis für das Vorliegen der zellulären Seneszenz ist. So gibt es Zellen, z. B. erwachsene Melanozyten, die ebenfalls eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase aufweisen, allerdings unabhängig des Vorliegens eines seneszenten Status. Des Weiteren gibt es auch senescente Zellen, die keine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase aufweisen, sodass diese allein nicht als universeller Marker für das Vorliegen zellulärer Seneszenz

genutzt werden kann (Dimri et al., 1995). Es müssen also verschiedene Eigenschaften verifiziert werden, bevor vom Vorliegen seneszenten Zellen gesprochen werden kann.

1.2 Mechanismen der Seneszenzinduktion

Erstmalig beschrieben wurde die Seneszenz durch Hayflick und Moorhead im Jahre 1961. Sie stellten fest, dass Zellen in Kultur nur eine bestimmte Anzahl an Zellzyklen durchlaufen, bevor sie in einen stabilen und terminalen Zellzyklusarrest eintreten (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). Dies beschreibt die replikativ induzierte Seneszenz. Ursächlich ist die bei jeder Zellteilung stattfindende Verkürzung der Telomere (Bodnar et al., 1998; Shay & Wright, 2005).

Davon zu unterscheiden ist die Onkogen-aktivierte Seneszenz, bei welcher die Aktivierung von Onkogenen oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen zur Seneszenzeinleitung beitragen kann (Chen et al., 2005; Serrano et al., 1997). Als dritte große Säule zählt die DNA-Schädigungs-induzierte Seneszenz. Abhängig der auf einen DNA-Schaden eingeleiteten Reparaturmaßnahmen sind Zellen in der Lage entweder Signalwege zur Apoptose- oder zur Seneszenzinduktion zu initiieren (Childs et al., 2014). Eine solche DNA-Schädigung kann z. B. durch ionisierende Röntgenstrahlung oder Chemotherapeutika ausgelöst werden (Chang et al., 1999; Di Leonardo et al., 1994). Die bei allen verschiedenen Varianten entstehenden seneszenten Zellen können wiederum über ihren SASP (Kap. 1.1) parakrin auch in benachbarten Zellen zelluläre Seneszenz auslösen (Acosta et al., 2013).

1.2.1 Die Rolle von p53 und p21

Die zelluläre Seneszenz ist eines von verschiedenen Zellschicksalen, die Zellen nach DNA Schädigung ereilen können. Kommt es durch Bestrahlung oder DNA-Schaden induzierende Chemotherapeutika zu DNA-Schäden, werden diese in der Zelle durch verschiedene Sensorproteine erkannt (Childs et al., 2014). Abhängig des Ausmaßes des DNA Schadens kommt es entweder zur Reparatur und zum Wiedereintritt in den Zellzyklus, zum terminalen Verbleib der Zelle im Zellzyklusarrest, also zur Seneszenz, oder zur Apoptose (Childs et al., 2014; Jänicke et al., 2007). Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die p53/ p21 Achse. Durch Proteine, die den DNA Schaden detektieren können, wird unter anderem p53 aktiviert. Eines der wichtigsten Zielproteine von p53 ist wiederum p21. Durch Hochregulation von p21 wird ein Zellzyklusarrest induziert, der sich abhängig vom auslösenden DNA Schaden unterscheidet. Zellen mit einem geringen Ausmaß an DNA Schäden können nach der Schadensreparatur wieder in den Zellzyklus eintreten. In Zellen,

die ein größeres Ausmaß an DNA Schäden aufweisen, kommt es zur Induktion eines permanenten Zellzyklusarrests (Childs et al., 2014). p21 führt über Phosphorylierung des Tumorsuppressors *retinoblastoma protein* (Rb) und der daraus resultierenden fehlenden Bindung von Rb an E2F zur Inhibition der E2F Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität relevant für den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus ist (Jänicke et al., 2007). Neben den beiden genannten Möglichkeiten der Zellen auf DNA Schaden zu reagieren (Reparatur und terminaler Zellzyklusarrest) steht als dritte Möglichkeit die Einleitung der Apoptose. Hier führt die DNA-schadensabhängige Aktivierung von p53 zur Induktion von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wie beispielsweise Bax, Noxa und Puma (Jänicke et al., 2007). Welches Zellschicksal letztlich eingeleitet wird, ist abhängig von der Menge der p53 Expression, der Anwesenheit verschiedener Kofaktoren sowie unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen an p53 und der auch aus letzteren resultierenden unterschiedlichen Lokalisation von p53 in der Zelle. So wirkt p53 im Zytoplasma durch direkten Einfluss auf die Mitochondrien eher apoptotisch, wohingegen sich seine Auswirkungen bei Lokalisation im Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt, davon unterscheiden. Die verschiedenen Einflüsse zusammengenommen führen zu unterschiedlichsten Kombinationsmöglichkeiten und daraus resultierenden unterschiedlichen zellulären Antwortmöglichkeiten auf zellulären Stress in Form von DNA Schaden (Murray-Zmijewski et al., 2008).

Im Fall der replikativen Seneszenz kann die Proteinkinase *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) den durch die Verkürzung der Telomere entstehenden zellulären Stress erkennen und p53 durch Phosphorylierung aktivieren und somit die Seneszenz einleiten (Childs et al., 2014). Zuletzt kann schließlich auch die Onkogen-aktivierte Seneszenz über p53 induziert werden. Onkogene entstehen aus sogenannten Protoonkogenen durch aktivierende Mutationen und kodieren häufig für Proteine, die entscheidend für Zellproliferation und Zellzyklusregulation sind (Lehman et al., 1991). Kommt es zur Aktivierung von Onkogenen, resultiert somit häufig eine unkontrollierte Proliferation und daraus resultierend eine Steigerung der Fehlerquote bei der DNA-Replikation (Di Micco et al., 2006). Die hieraus entstehenden DNA Schäden werden wiederum durch Sensorproteine erkannt und über p53 ein Zellzyklusarrest eingeleitet. Bei der Onkogen-aktivierten Form der Seneszenz spielt der Tumorsuppressor *Alternative Reading Frame* (ARF) in der Aktivierung von p53 mit eine entscheidende Rolle (Mellert et al., 2007).

1.3 Positive und negative Aspekte seneszenten Zellen in der Onkologie

Strahlen- und Chemotherapie sind heutzutage in vielen Fällen, neben der operativen Entfernung, Therapie der Wahl bei Krebserkrankungen (Kandalai et al., 2023). Ziel ist hierbei die Eliminierung der Tumorzellen, um einen Progress der Erkrankung zu verhindern bzw. eine Remission zu erreichen. Allerdings führen vor allem auf DNA-Schädigung basierende Therapien neben einer Reduktion der Tumorzelllast auch zur Entstehung seneszenten Zellen (Kap. 1.2).

Diese seneszenten Zellen werden in der Krebstherapie häufig als ein zweischneidiges Schwert bezeichnet (Gonzalez-Meljem et al., 2018; Schosserer et al., 2017). So gibt es Hinweise darauf, dass seneszente Zellen sowohl vor- als auch nachteilige Aspekte in der Tumorthherapie aufweisen (Schmitt et al., 2022).

Durch ihre Eigenschaft des Eintretens in einen stabilen und terminalen Zellzyklusarrest führen seneszente Zellen im Gegensatz zu den proliferierenden Tumorzellen zu keinem weiteren Wachstum des Tumors an sich (He & Sharpless, 2017). Aus diesem positiven Aspekt ergeben sich aber auch direkt nachteilige Effekte. Zum einen werden in seneszenten Zellen antiapoptotische Signalwege aktiviert, die wiederum dazu führen, dass Tumorzellen weiterhin vital bleiben (He & Sharpless, 2017). Des Weiteren wird durch die dauerhafte Notwendigkeit der Aufrechterhaltung der Seneszenz und damit einhergehender Transkription und Translation die Stabilität des Zellzyklusarrests riskiert. Die Zellen können diesem entkommen und neigen zur Entwicklung eines Rezidivs, wobei sie ihre im seneszenten Stadium erworbene Zelltodresistenz behalten (Schmitt et al., 2022).

Die Ausbildung eines Rezidivs wird allerdings nicht nur durch den Wiedereintritt der seneszenten Zellen in den Zellzyklus gefördert, sondern auch dadurch, dass sich um den Tumor ein entzündliches Mikromilieu ausbildet. Dieses entsteht, weil sowohl benachbarte Stromazellen durch die vorangegangene Chemo- oder Strahlentherapie seneszent werden und einen SASP ausbilden, als auch durch die seneszent gewordenen Tumorzellen und deren SASP. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nach erfolgter Chemotherapie mittels Doxorubicin die Last seneszenten Zellen zunimmt und die Elimination dieser zu einer geringeren Rate an Rezidiven und auch Metastasen führt (Demaria et al., 2017). Zur Metastasierung tragen nicht nur das entzündliche Mikromilieu, sondern auch im Sekretom enthaltene Botenstoffe wie beispielsweise IL-6 und IL-8, die die epitheliale mesenchymale Transition begünstigen, bei (Coppé et al., 2008; Gonzalez-Meljem et al., 2018).

Des Weiteren ist der SASP auch an einigen Nebenwirkungen der vorausgehenden Strahlen- und Chemotherapie beteiligt. So werden z. B. durch eine Strahlentherapie Lungenfibrosen ausgelöst (Pan et al., 2017), welche auf einem durch die im Sekretom enthaltenen proinflammatorischen und profibrotischen Zytokine ausgelöstem überschießenden Wachstum der im Rahmen der Therapie mitbestrahlten umgebenden Fibroblasten beruhen (Beach et al., 2017; Nguyen et al., 2018). Des Weiteren tragen seneszente Zellen zur Kardiotoxizität mancher Chemotherapeutika wie z. B. Doxorubicin bei (Demaria et al., 2017). Abgesehen von lokalen Effekten, sind seneszente Zellen auch an systemischen unerwünschten Nebenwirkungen der onkologischen Therapien beteiligt. So scheinen sie beispielsweise mit ursächlich an der Entstehung von Fatigue nach einer Chemotherapie zu sein (Demaria et al., 2017).

Außerdem haben die im Sekretom enthaltenen verschiedenen Zytokine und Interleukine einen Einfluss auf das Immunsystem (Gonzalez-Meljem et al., 2018; Schmitt et al., 2022). Zum einen führen sie zu einer Rekrutierung von Immunzellen und damit unter anderem zu einer Eliminierung der Tumorzellen durch eben diese Immunzellen (Iannello et al., 2013; Sagiv & Krizhanovsky, 2013). Zum anderen wird allerdings auch eine Immunsuppression erreicht, wodurch das Tumorwachstum weiter begünstigt wird, da die Immunkontrolle des Tumors unterbleibt (Eggert et al., 2016; Ruhland et al., 2016).

Als weiterer tumorfördernder Effekt sei die durch seneszente Zellen ausgelöste Angiogenese genannt (Coppé et al., 2006). Diese zählt zu den sogenannten „*Hallmarks of cancer*“ und ist damit ein wichtiger Prozess in der Tumorentstehung und -ausbreitung (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Als positiver Aspekt kann der SASP Apoptose und Nekrose der umgebenden Zellen herbeiführen, sodass therapieinduzierte Seneszenz bei der Beseitigung benachbarter Tumorzellen, welche bisher von der Therapie nicht erfasst wurden, unterstützend wirken kann (Schmitt et al., 2022). Beispielsweise löst sezerniertes TNF- α eine ROS-abhängige Apoptose aus (Kim et al., 2010).

Zusammenfassend können die Folgen abhängig von akutem Vorkommen von Seneszenz und chronischer Akkumulation seneszenten Zellen unterteilt werden. Während das akute und kurzfristige Auftreten von Seneszenz eher positive Auswirkungen zeigt, überwiegen bei chronischer Akkumulation die nachteiligen Aspekte. Daraus entstand die Idee, dass seneszente Zellen mittels sogenannter Senolytika gezielt nach erfolgter Strahlen- oder Chemotherapie eliminiert werden, um vom kurzfristigen Vorliegen zu profitieren, aber einer chronischen Akkumulation und den daraus resultierenden unerwünschten Effekten dieser Zellen entgegenzuwirken.

1.4 Der PI3K-Signalweg und PX-866 und Wortmannin

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg ist ein in Tumorzellen häufig mutierter Signalweg, der zu Proliferation, gesteigertem Zellüberleben und reduziertem Zelltod führen kann (Engelman et al., 2006; Samuels et al., 2004), sodass er zunehmend im Fokus der onkologischen Forschung steht. Im Zentrum dieses Signalwegs steht die PI3K.

Es gibt drei verschiedene Klassen mit jeweils verschiedenen Isoformen der PI3K. Säugetiere besitzen vier verschiedene Isoformen der Klasse I, die Isoformen p110 α , β , γ und δ . Diese werden codiert durch die Gene PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG und PIK3CD. Während die α und β Isoformen ubiquitär in allen Zellen vorkommen, finden sich die anderen beiden Isoformen gehäuft in Immunzellen. Des Weiteren existieren drei Isoformen der Klasse II (PI3K-2C α , β und γ) und eine der dritten Klasse zugehörige Isoform (hVPS34) (Fruman et al., 2017).

Die verschiedenen Isoformen der Klasse I katalysieren die Phosphorylierung von PtdIns-4,5-P₂ (PIP2) zu PtdIns-3,4,5-P₃ (PIP3) (Fruman et al., 2017) (Abb. 1). Dem entgegen steht der Tumorsuppressor PTEN, welcher zur Metabolisierung und damit dem Abbau des durch die Phosphorylierung entstandenen Phospholipids führt (Maehama & Dixon, 1998). PIP3 wiederum beeinflusst verschiedenste Kinasen, sodass viele unterschiedliche Signalwege aktiviert werden (Fruman et al., 2017). Es kommt beispielsweise zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT (Burgering & Coffey, 1995; Franke et al., 1995). An dieser Aktivierung ist zusätzlich die ebenfalls an der Membran befindliche Kinase PDK1 beteiligt (Alessi et al., 1997). Zudem wird auch der mTOR Komplex 2 (mTORC2) für die Phosphorylierung und die damit einhergehende Aktivierung von AKT benötigt (Fruman et al., 2017; Sarbassov et al., 2005). AKT wiederum phosphoryliert zahlreiche Substrate und ist damit für viele unterschiedliche zelluläre Vorgänge verantwortlich, die durch den PI3K Signalweg gesteuert werden beispielsweise Zellproliferation, Metabolismus oder Zellüberleben (Manning & Toker, 2017). Aktiviert wird der PI3K-Signalweg durch an der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren wie z. B. durch Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Fruman et al., 2017).

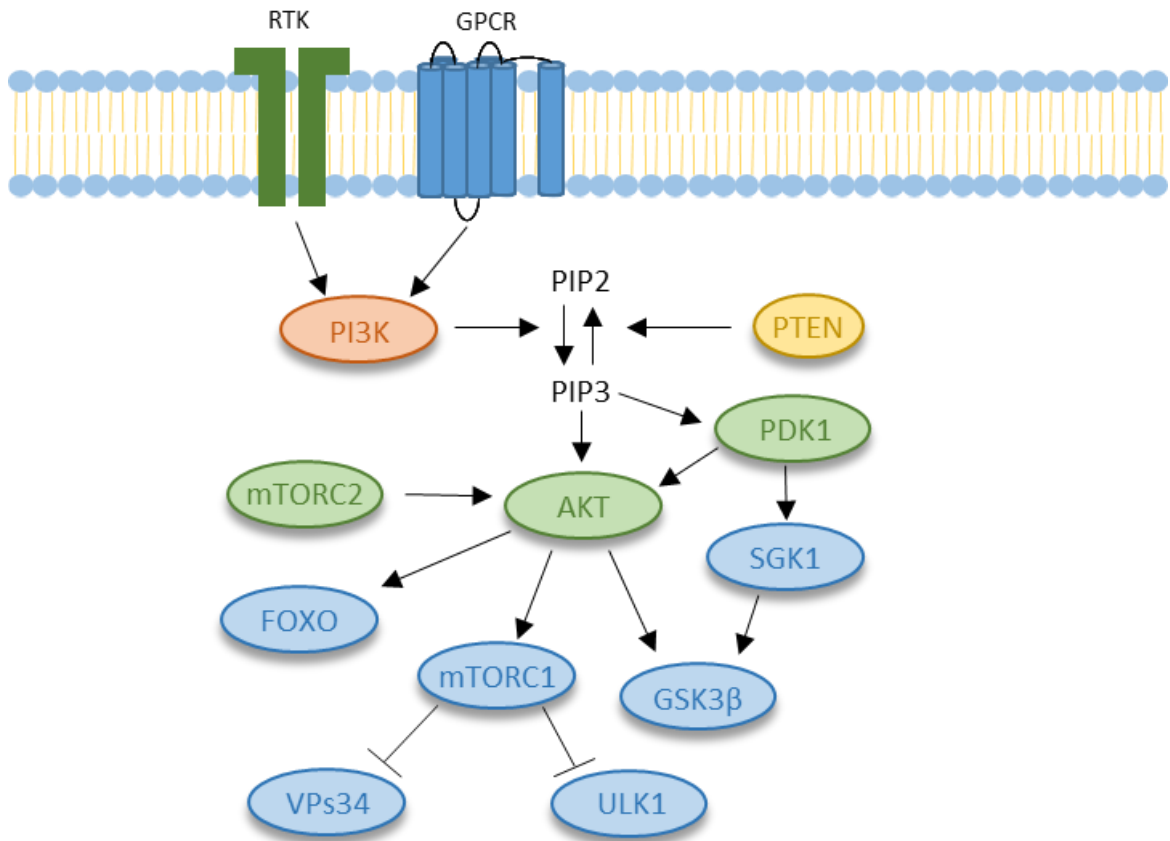


Abb. 1: Schematische Darstellung des PI3K-Signalwegs. PI3Ks können beispielsweise durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden. Die aktivierte PI3K katalysiert die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. Gegenspieler ist hierbei der Tumorsuppressor PTEN, der zum Abbau von PIP3 führt. PIP3 wiederum rekrutiert AKT und PDK1 zur Membran. Die Serin/Threonin-Kinase AKT wird letztlich durch mehrere Phosphorylierungen an unterschiedlichen Positionen aktiviert. PDK führt zur Phosphorylierung an der Position Thr308 und mTORC2 an Position Ser473. AKT wiederum phosphoryliert verschiedene Substrate, hierunter beispielsweise die GSK3beta. Diese wird aber auch durch die mithilfe der PDK1 aktivierte SGK1 phosphoryliert. Diese Abbildung stellt nur einen Ausschnitt des komplexen PI3K-Netzwerks dar. (Erstellt nach Courtney et al., 2010; Hertweck et al., 2004; Okuzumi et al., 2009; Pasquier, 2015; Xiaobo et al., 2016)

PX-866 ist ein irreversibler panPI3K-Klasse-I-Inhibitor (Wipf et al., 2004). Es handelt sich um eine Weiterentwicklung des Pilzmetaboliten Wortmannin (Wipf et al., 2004). Wortmannin hat sich in Studien als potenter PI3K-Inhibitor gezeigt (Powis et al., 1994). Es kann unter anderem aus dem Pilz *Talaromyces wortmanni* gewonnen werden (Nakanishi et al., 1992). Da Wortmannin einige Nachteile aufweist und sich aufgrund dieser nicht gut zur Verwendung in klinischen Studien eignet, wurden verschiedene Derivate erzeugt. PX-866 eignet sich z. B. besser zur klinischen Verwendung als Wortmannin, da Wortmannin in wässriger Lösung bei neutralem pH chemisch instabil ist (Wipf et al., 2004). Ein weiterer Nachteil von Wortmannin ist seine Hepatotoxizität, die bei PX-866 ebenfalls geringer ausgeprägt ist (Wipf et al., 2004). PX-866 weist zudem eine höhere Selektivität gegenüber der PI3-Kinase auf; im Gegensatz zu Wortmannin, welches auch die Kinase mTOR zu einem entscheidenden Anteil inhibiert (Wipf et al., 2004).

Da sich PX-866 im Vergleich zu Wortmannin besser für die klinische Verwendung eignete, ist es bereits in verschiedenen Phase-I und Phase-II Studien an Menschen erprobt worden (Hong et al., 2012; Jimeno et al., 2015; Pitz et al., 2015). Zwar zeigte sich PX-866 in beiden hier aufgeführten Phase-II Studien bezüglich der primären Endpunkte in Form von z. B. Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben nicht so erfolgreich wie erwartet; es konnte aber eine relativ gute Verträglichkeit nachgewiesen werden, die unter anderem auch Voraussetzung für eine weitere klinische Nutzung wäre.

Im Gegensatz zur fortschreitenden Entwicklung und Forschung neuer zielgerichteter Therapeutika, welche die Apoptose der Tumorzellen zum Ziel haben, konnte der PI3K-Inhibitor PX-866 bereits auch als vielversprechendes Senolytikum identifiziert werden (Neuwahl, 2020). Ein Senolytikum ist eine Substanz, die gezielt seneszente Zellen eliminiert, wohingegen proliferierende Zellen hiervon unbeeinträchtigt bleiben (Zhu et al., 2015). In vorangegangenen Arbeiten konnte PX-866 ein senolytischer Effekt in Kolonkarzinom- (HCT116), Mammakarzinom- (MC7) sowie Bronchialkarzinomzellen (A549) nachgewiesen werden (Neuwahl, 2020; Neuwahl et al., 2024). Über welchen Signalweg die senolytische Wirkung erfolgt, blieb bisher allerdings ungeklärt.

1.5 Andere Inhibitoren des PI3K Signalwegs

Aufgrund der wichtigen Stellung des PI3K Signalwegs gibt es bereits viele Inhibitoren, die an unterschiedlichen Stellen mit dem Signalweg interferieren; so auch einige, welche bereits in klinischen Studien erprobt wurden und bei welchen eine relativ gute klinische Verträglichkeit nachgewiesen werden konnte. Diese eignen sich in Zukunft besonders für weitere Untersuchungen und haben eine gute Aussicht auf eine reguläre klinische Anwendung im Menschen.

In dieser Arbeit verwendet wurden der AKT-Inhibitor MK-2206 (Hirai et al., 2010) und der PDK-1 Inhibitor BX-795 (Feldman et al., 2005). MK-2206 wurde bereits in klinischen Phase-I (Hudis et al., 2013; Molife et al., 2014; Yap et al., 2011) und Phase-II Studien getestet. In Letzteren zwar mit akzeptabler klinischer Verträglichkeit, aber bisher ohne den erwarteten Erfolg in Form von fehlendem klinischem Ansprechen bei kolorektalen Karzinomen und fehlender Verbesserung der Überlebensrate bei Magenkarzinomen (Do et al., 2015; Ramanathan et al., 2015), sodass hier vor allem die Möglichkeit zur weiteren Erprobung anderer Dosierungs- oder Kombinationsschemata gegeben ist. BX-795 konnte bereits als Strahlungssensibilisator (*Radiosensitizer*) in Versuchen zu oralen Plattenepithelkarzinomen oder hepatozellulären Karzinomen erfolgreich getestet werden (Bamodu et al., 2020; Pai et al., 2021).

Während AKT häufig als Haupteffektormolekül des PI3K-Signalwegs genannt wird, gibt es noch weitere Kinasen, die durch die PI3K aktiviert werden (Di Cristofano, 2017; Fruman et al., 2017). Eine der wichtigsten ist die Kinase SGK1 (Di Cristofano, 2017). Daher wurde mit EMD 638683 auch ein Inhibitor dieser Kinase (Ackermann et al., 2011) verwendet. EMD 638683 konnte bereits in einer Studie ein senolytischer Effekt im Zusammenhang mit Lungenfibrose nachgewiesen werden (Gu et al., 2023). Zur Beurteilung der dritten Klasse der PI3K wurde SAR405 als hochselektiver VPs34-Inhibitor hinzugezogen (Ronan et al., 2014). VPs34 auch als PIK3C3 bezeichnet ist ein wichtiger Bestandteil in der Regulation der Autophagie. Während der Autophagie werden Zytosol oder Zellorganellen von Doppelmembranvesikeln, den sogenannten Autophagosomen, umhüllt. Diese verschmelzen im Anschluss mit dem Lysosom, wo schließlich der Abbau der im Autophagosom enthaltenen Inhalte erfolgt. Einer der am besten charakterisierten Autophagieregulatoren ist mTORC1. Bei Aktivierung z. B. über Wachstumsfaktoren inhibiert es zwei im Signalweg folgende Proteine, die UNC-51-like-kinase 1 (ULK1) und Vps34, was schließlich Autophagie unterbindet. Wird mTORC1 gehemmt oder weniger aktiviert, ist eine gesteigerte Aktivität von Vps34 die Folge, was in gesteigerter Autophagie resultiert. SAR405 als Vps34-Inhibitor verhindert wiederum die Bildung der Autophagosomen (Ronan et al., 2014).

Neben den bereits genannten Inhibitoren, welche verschiedene mit dem PI3K-Signalweg interagierende Proteine hemmen, wurden auch weitere Inhibitoren der PI3K eingesetzt. So wurde BAY80-6946 als zweiter pan-PI3K-Inhibitor herangezogen. BAY80-6946, auch bezeichnet als Copanlisib, inhibiert bevorzugt die α - und δ -Isoform der PI3K, weist aber auch Aktivität gegenüber den beiden verbliebenen Isoformen auf. Mit deutlich schwächerer und damit nicht signifikanter Intensität ist es zusätzlich ein Inhibitor der Kinase mTOR (Liu et al., 2013). Copanlisib wurde bereits in mehreren klinischen Studien erprobt und erstmalig 2017 in den USA durch die FDA zugelassen. In diesem Fall zur Behandlung von Erwachsenen mit Rezidiv eines follikulären Lymphoms, welche bereits zwei systemische Therapien erhalten haben (Markham, 2017). BAY80-6946 wurde bereits in Studien sowohl mit hämatologischen als auch verschiedenen soliden Tumoren getestet (Patnaik et al., 2016). Zuletzt wurde es bereits in Phase-III Studien mit auch guter klinischer Verträglichkeit als Voraussetzung für die weitere klinische Nutzung erfolgreich getestet (Matasar et al., 2021). Ein weiterer klinischer Vorteil besteht darin, dass die Pharmakokinetik von BAY80-6946 weder durch das Alter noch durch das Geschlecht, den Raucherstatus, das Gewicht oder die Leber- bzw. Nierenfunktion beeinflusst wird (Curigliano & Shah, 2019). In den bisher durchgeführten Studien wurde BAY80-694 entweder alleine oder in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika oder zielgerichteten Therapeutika verwendet (Dreyling et

al., 2013; Keegan et al., 2021; Markham, 2017). Bisher noch nicht getestet worden ist BAY80-6946 auf eine potentiell senolytische Aktivität nach vorher eingesetzter Strahlen- oder Chemotherapie.

Im Gegensatz zu BAY80-6946 ist BEZ-235 ein panPI3K-Inhibitor, der zusätzlich in größerem Ausmaße die Kinase mTOR inhibiert (Maira et al., 2008). BEZ-235, auch bezeichnet als Dactolisib, war bereits in klinischen Studien der Phase I und II. Viele mussten allerdings aufgrund einer erhöhten Toxizität, am ehesten bedingt durch die kombinierte Inhibition der Kinasen PI3K und mTOR, vorzeitig beendet werden. So wurde z. B. eine Phase-Ib Studie zum Einsatz von Dactolisib bei Patienten mit Nierenzellkarzinom vorzeitig beendet; eine geplante Phase-II Studie wurde nicht mehr durchgeführt (Carlo et al., 2016). Ähnlich verhielt es sich bei einer Phase-II Studie in Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Aufgrund der schlechten Verträglichkeit wurde auch hier auf eine Fortführung verzichtet (Fazio et al., 2016). Eine weitere Phase-II Studie, ebenfalls in Patienten mit pankreatischen neuroendokrinen Tumoren, zeigte ähnlich enttäuschende Ergebnisse bezüglich der Verträglichkeit und wurde auch vorzeitig beendet (Salazar et al., 2018). Demgegenüber stehen allerdings auch Phase-I Studien, die lediglich von ähnlichen Nebenwirkungen, wie sie bei anderen Inhibitoren des PI3K Signalwegs auftreten, berichten. Beispielsweise eine Studie, die sich mit der Dosisfindung bei verschiedenen soliden Tumoren beschäftigte (Bendell et al., 2015).

Als weitere spezifische Inhibitoren verschiedener Isoformen der PI3K wurden BYL-719 sowie CAL-101 verwendet. Byl-719, auch bezeichnet als Alpelisib, als oral bioverfügbarer isolierter Inhibitor der α -Isoform der Klasse I der PI3K (Furet et al., 2013) wurde ebenfalls bereits in verschiedenen klinischen Studien getestet (Jain et al., 2018; Juric et al., 2019; Juric et al., 2018; Mayer et al., 2017; Savas et al., 2022). Im Mai 2019 wurde Alpelisib erstmalig durch die FDA in Kombination mit Fulvestrant zur Therapie von metastasiertem Hormonrezeptor-positivem/HER2 negativem Brustkrebs mit PIK3CA Mutation zugelassen, sofern dieser unter endokriner Therapie progressiv war (Markham, 2019). Basis war eine Phase-III Studie, in welcher Alpelisib plus Fulvestrant verglichen wurden mit der Verwendung eines Placebos plus Fulvestrant. Hier zeigte sich ein Unterschied im progressionsfreien Überleben von 11 Monaten in der Alpelisib-Gruppe gegenüber 5,7 Monaten in der Placebo-Gruppe. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Hyperglykämie, Ausschlag und Diarrhö (André et al., 2019). 2020 folgte die Zulassung durch die EMA (Royer et al., 2023). Byl-719 wurde bisher allerdings nur entweder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder Radiotherapie bzw. als *Radiosensitizer* getestet und noch nicht nach zuvor erfolgter Radiatio (Chuang et al., 2021; Day et al., 2020).

Zuletzt stellt CAL-101 einen Inhibitor der δ -Isoform dar (Lannutti et al., 2011). CAL-101, auch bezeichnet als Idelalisib, erhielt im Juli 2014 seine erstmalige Zulassung durch die FDA zur Behandlung von Rezidiven der chronisch lymphatischen Leukämie, des folliculären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms sowie des kleinzelligen lymphozytischen Lymphoms (Markham, 2014). Zuvor und danach wurde CAL-101 auch in verschiedenen Studien erprobt. So beispielsweise in Phase-II Studien mit dem Einsatz bei niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen (Gopal et al., 2014) sowie bei klassischen Hodgkin-Lymphomen (Gopal et al., 2017) und in Phase-II Studien zur chronisch lymphatischen Leukämie (O'Brien et al., 2015). Ausgeweitet wurde die Forschung dann in verschiedenen Phase-III Studien (Furman et al., 2014; Jones et al., 2017), in welchen beispielsweise die Wirkung von Rituximab plus Idelalisib im Vergleich zu Rituximab plus Placebo in Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie erfolgreich betrachtet wurde (Furman et al., 2014).

1.6 Ziele der Arbeit

Die bisherigen Möglichkeiten der Tumorthherapie lassen sich in drei große Säulen unterteilen: die operative Entfernung des Tumors, die Durchführung einer Chemotherapie oder die Bestrahlung des Tumors. Insbesondere die beiden zuletzt genannten können Nebenwirkungen auslösen, welche auf der Entstehung seneszenten Zellen beruhen. Mit sogenannten Senolytika sollen diese Zellen gezielt eliminiert werden, um Nebenwirkungen sowie die Bildung von Rezidiven und Metastasen zu reduzieren. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits eine solche senolytische Wirkung von PX-866 nachgewiesen werden.

PX-866 ist ein pan-PI3K-Klasse-I-Inhibitor. Dieser Signalweg ist sehr komplex und weit vernetzt. Während für PX-866 bisher zwar eine senolytische Wirkweise vermutet werden konnte, blieb der genaue Wirkmechanismus, insbesondere die Bedeutung der PI3K für die senolytische Wirkung unklar. Es war daher Ziel dieser Arbeit die senolytische Wirkung von PX-866 zum einen zu verifizieren und zum anderen mehr über dessen Wirkweise herauszufinden bzw. den genauen Wirkmechanismus zu identifizieren.

Hierfür wurden HCT116- (Kolonkarzinom) und MCF-7 Zellen (Mammakarzinom) verwendet. Nach Induktion des seneszenten Phänotyps mittels Bestrahlung wurden die Zellen mit siRNAs transfiziert bzw. mit Inhibitoren stimuliert und anschließend der induzierte Zelltod gemessen. Da PX-866 als pan-PI3K-Klasse-I-Inhibitor mit den zahlreichen verschiedenen Armen des PI3K Signalwegs interagiert, sollte insbesondere durch die Verwendung der verschiedenen Inhibitoren detektiert werden, welcher Arm des PI3K-Signalwegs entscheidend ist. Hierfür wurden isoformspezifische- und panPI3K-Inhibitoren verwendet sowie Inhibitoren verschiedener Effektorinasen des PI3K-Signalwegs. Mit der

Kenntnis dieses entscheidenden Angriffspunktes im PI3K-Signalweg sollten zudem weitere Senolytika identifiziert werden. Der genaue Fokus lag hierbei insbesondere auf bereits in klinischen Studien verwendeten Inhibitoren, welche bisher allerdings lediglich im Hinblick auf andere primäre Endpunkte hin untersucht worden waren und noch nicht auf eine mögliche senolytische Wirkung hin getestet worden waren.

Langfristig soll durch die Identifikation neuer Senolytika in diesem Forschungsprojekt dazu beigetragen werden, den chemo- und radiotherapeutischen Ansatz in der Krebstherapie zu unterstützen, mit dem Ziel, durch den Einsatz von Senolytika die Nebenwirkungen zu reduzieren, aber auch die Dosis einer Chemo- oder Strahlentherapie reduzieren zu können, um allein das Ziel zu verfolgen, Seneszenz in den malignen Zellen zu induzieren und diese dann durch den Einsatz eines Senolytikums eliminieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Zellzahlen

Tabelle 1: Zelllinien

Name	Zellart	Bezugsquelle	Medium
HCT116	Humane Kolonkarzinomzellen	B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA (Bunz et al., 1999)	McCoy's 5A (Tab. 8)
MCF-7	Humane Mammakarzinomzellen	R.U. Jänicke (Jänicke et al., 1998)	RPMI 1640 (Tab. 8)

Tabelle 2: Zellzahlen

Zelllinien	Platte	Zellzahl pro Vertiefung
HCT116 Prol.	96-Proben-Platte	2x10 ⁴ /200 µL 5x10 ³ /200 µL
HCT116 Sen.		8x10 ³ /200 µL
HCT116 Prol.	6-Proben-Platte	4x10 ⁵ /1500 µL
HCT116 Sen.		3x10 ⁵ /1500 µL
HCT116 Prol.	6 cm Schale	12x10 ⁵ /2500 µL
MCF-7 Prol.	96-Proben-Platte	2x10 ⁴ /200 µL 5x10 ³ /200 µL
MCF-7 Sen.		8x10 ³ /200 µL
MCF-7 Prol.	6-Proben-Platte	4x10 ⁵ /1500 µL
MCF-7 Sen.		3x10 ⁵ /1500 µL
MCF-7 Prol.	6 cm Schale	12x10 ⁵ /2500 µL

2.1.2 Inhibitoren, Antikörper, Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Inhibitoren

Inhibitor	Zielprotein	Bezugsquelle	Stock-Konzentration (gelöst in)
Bay 80-6946 (Copanlisib)	pan PI3K Klasse I (bevorzugt α und δ)	LKT-Laboratories (Minnesota, USA)	30 mM (Wasser)
Bez-235 (Dactolisib)	pan PI3K Klasse I und mTOR	LC Laboratories (Woburn, USA)	2,5 mM (DMSO)
BX-795	PDK1	Cayman Chemical (Michigan, USA)	10 mM (DMSO)
Byl-719 (Alpelisib)	PI3Kα	LC Laboratories	10 mM (DMSO)
CAL-101 (Idelalisib)	PI3Kδ	Cayman Chemical	30 mM (DMSO)
EMD 638683	SGK1	Cayman Chemical	30 mM (DMSO)

MK-2206 (hydrochloride)	AKT	Cayman Chemical	10 mM (DMSO)
PX-866 (Sonolisib)	pan PI3K Klasse I	LC Laboratories/ Cayman Chemical	10 mM (DMSO)
SAR405	PI3K Klasse III (Vps34)	Cayman Chemical	10 mM (DMSO)
Wortmannin	pan PI3K Klasse I	LC Laboratories	10 mM (DMSO)

Tabelle 4: Erstantikörper

Zielprotein	Klon	Bezugsquelle	Spezies/Subtyp	Verdünnung	Katalognummer
Akt	-	CellSignaling (Danvers, USA)	Rabbit	1:1000	9272
AKT-P (Ser473)	D9E XP	Cell Signaling	Rabbit	1:2000	4060
Aktin	AC-74	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	Mouse IgG2a	1:5000	A5316
GSK3β	27C10	CellSignaling	Rabbit mAb	1:1000	9315
GSK3β-P (Ser9)	-	CellSignaling	Rabbit	1:1000	9336
PI3 Kinase p110 α	C73F8	CellSignaling	Rabbit	1:1000	-
PI3 Kinase p110 δ	D1Q7R	CellSignaling	Rabbit	1:1000	-
p21	12D1	CellSignaling	Rabbit	1:1000	2947S
p53 (Ab-6)	DO-1	Merck (Darmstadt)	Mouse IgG2a	1:1000	OP43
p53	-	CellSignaling	Rabbit	1:1000	9282
Rb	IF8	Santa Cruz (Dallas, USA)	Mouse IgG1	1:1000	sc-102
RSK2	-	CellSignaling	Rabbit	1:1000	9340
RSK-P (S380)	-	R&D Systems (Minneapolis, USA)	Rabbit	1:5000	AF889

Tabelle 5: Zweitantikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Bezugsquelle	Verdünnung
IRDye 680 RD	Ziege	Maus IgG (H+L)	LI-COR (Lincoln, USA)	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
IRDye 680 RD	Ziege	Kaninchen IgG (H+L)	LI-COR	1:30.000

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid	Bio RAD (Hercules, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
DharmaFECT1	Horizon Discovery (Lafayette, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethanol (100 %)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech (Aidenbach)
Glycerin/ Glycerol	VWR (Radnor, USA)
Glycin	VWR
IGEPAL CA-630 (NP40)	Sigma Aldrich
Kristallviolett	Merck
Leupeptin	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	VWR
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
OptiMEM Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/ Streptomycin	Sigma Aldrich
Pepstatin A	Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (verdünnt im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser)	Bio RAD
Salzsäure (37 %)	VWR
siRNA-Buffer	Horizon Discovery
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific
Tween20	Merck

Tabelle 7: siRNAs

siRNAs	Bezugsquelle
siCon	Horizon Discovery
siPIK3CA	Horizon Discovery
siPIK3CD	Horizon Discovery
siip21	Horizon Discovery

Tabelle 8: Puffer/ Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
McCoy's Medium 5A (1x) + GlutaMAX (Gibco)	+ 10 % fetal calf serum/FCS hitzeinaktiviert + 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin/10.000 µg/ml Streptomycin)
RPMI Medium 1640 (1x) + L-Glutamine (Gibco)	+ 10 % fetal calf serum/FCS hitzeinaktiviert + 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin/10.000 µg/ml Streptomycin)
Kristallviolett-Lösung	20 % Methanol 0,5 % Kristallviolett
33 % Essigsäure	67 % Aqua bidest. 33 % Essigsäure
Polyacrylamid Trenngel (12,5%)	12,5 % Acrylamid-Bisacrylamid 0,1 % SDS (10 %) 375 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl pH 8,8 0,075 % Ammoniumperoxodisulfat 0,05 % Tetramethylethyldiamin
Polyacrylamid Trenngel (7,5%)	7,5 % Acrylamid-Bisacrylamid 0,1 % SDS (10 %)

	375 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ HCl pH 8,8 0,075% Ammoniumperoxodisulfat 0,05 % Tetramethylethyldiamin
Polyacrylamid Sammelgel	3,75 % Acrylamid-Bisacrylamid 0,1 % SDS 125 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ HCl pH 6,8 0,075 % Ammoniumperoxodisulfat 0,075 % Tetramethylethyldiamin
SDS-Gelelektrophorese-Puffer	0,025 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,192 M Glycin 0,0035 M SDS
Western-Blot-Puffer	0,025 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,192 M Glycin
NP40-Lysepuffer	50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 150 mM NaCl 1 % Octylphenoxy-poly(ethylenoxy)ethanol (IGEPAL CA 630) / NP40
	Frisch hinzugefügt werden: 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM Natriumpyrophosphat 1 mM PMSF 10 µg/ml (0,146 mM) Pepstatin 10 µg/ml (0,234 mM) Leupeptin 10 µg/ml (0,015 mM) Aprotinin 1 mM DTT
SDS-Probenpuffer	6,25 % Tris(hydroxymethyl)aminomethan 2 % SDS 3 % β-Mercaptoethanol 10 % Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau
PBS-Tween (PBS-T)	0,2 % Polysorbat (Tween20) 99,8 % PBS
Blockierungslösung	4 % entfettetes Milchpulver in PBS-T
Erstantikörperlösung	5 % Bovines-Serum-Albumin (BSA) in PBS-T 0,1 % Natriumazid Verdünnung Antikörperspezifisch (Tab. 4)
Zweitantikörperlösung	0,02 % SDS in 20 ml PBS-T Verdünnung Antikörperspezifisch (Tab. 5)

2.1.3 Geräte und Software

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bestrahlungsgerät	Gulmay Medical RS225	XStrahl (Camberley, UK)
Durchleuchtungsgerät	UVstar	Biometra (Göttingen)
Feinwaage	Practum	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzscanner	Odyssey FC Imaging System	LI-COR Biosciences
Horizontalschüttler	VWR Typ 3006	Kisker Biotech (Steinfurt)
Inkubator	CO ₂ Incubator MCO-20AIC	Sanyo Electric Co. (Moriguchi, Japan)
Mikroplattenleser	Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Mikroskop	Eclipse TS100	Nikon (Tokio, Japan)
Photometer	BioPhotometer D30	Eppendorf (Hamburg)

Sterilwerkbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific
Tiefkühlschrank -80 °C	HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific
Waage	440-47	KERN (Balingen-Frommern)
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R Rotor F-45-30-11 (r=9,5 cm)	Eppendorf

Tabelle 10: Software

Verwendung	Software	Version
Bildbearbeitung	GNU Image Manipulation Program (GIMP)	2.10.24
Grafikerstellung	Inkscape PowerPoint	1.1 15.0.5603.1000
Mikroplattenleser	i-control	1.5
Versuchsauswertungen	Microsoft Excel	15.0.5603.1000
Western Blot Scanners	Image Studio	5.2.5
Signifikanzberechnung	GraphPad Prism	8.0.2

2.2 Methoden

2.2.1 Seneszenzinduktion und Stimulation

Zur Induktion der Seneszenz wurde im Folgenden immer die gleiche Methodik angewandt.

Adhärenz wachsende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden in einer 96-Proben-Platte ausgesät (Tab. 2). Am darauffolgenden Tag wurden sie einem Seneszenz-induzierenden Stimulus mittels ionisierender Röntgenstrahlung ausgesetzt (Di Leonardo et al., 1994). Hierbei erfolgte die Applikation einer einmaligen Dosis von 12 Gy (Gulmay Medical RS225, 175 kV, 15 mA, 0,2 mm Kupferfilter). Diese Dosis ist ausreichend, um in allen Zellen Seneszenz zu induzieren und korreliert annähernd mit in der Klinik bei Patienten verwendeten Strahlungsdosen. Bei diesen wird beispielsweise an 5 Tagen eine Dosis von 2 Gy appliziert, um eine Gesamtdosis von 10 Gy zu erreichen.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für insgesamt 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sie den seneszenten Phänotyp ausbildeten. Dabei wurde an Tag 3 nach Bestrahlung ein Mediumwechsel durchgeführt.

An Tag 7 erfolgte die Aussaat unbestrahlter Kontrollzellen in einer weiteren 96-Proben-Platte (für entsprechende Zellzahlen Tab. 2). Da diese unbestrahlten Zellen im Gegensatz zu den bestrahlten weiterhin proliferieren, war eine zeitgleiche Aussaat der beiden Platten nicht möglich, weil ansonsten eine zu hohe Zelldichte erreicht werden würde, welche die Ergebnisse durch Kontaktinhibition der Zellen beeinflussen könnte.

An Tag 8 fand die Behandlung der seneszenten sowie unbestrahlten proliferierenden Zellen mit den Inhibitoren statt (Tab. 3). Für jeden Inhibitor wurden Doppelwerte angelegt. Da fast alle Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen, welches in hohen Konzentrationen eine eigene

zytotoxische Wirkung entfalten kann, wurden zwei Spalten zur Kontrolle ausschließlich mit DMSO behandelt. In den untersten beiden Reihen der jeweiligen 96-Proben-Platte erfolgte lediglich ein Mediumwechsel ohne Hinzugabe von Inhibitoren, um unbehandelte Zellen als Kontrollen zu erhalten (Abb. 2 und Abb. 3). Für die Zugabe der Inhibitoren wurde das Medium aus den restlichen Vertiefungen abgesaugt. Den Reihen B - F wurden 200 μL frisches Medium hinzugegeben. Schließlich wurden 300 μL der Inhibitoren in 30 μM Konzentration in die oberste Zeile der 96-Proben-Platte hinzugegeben. Für die weiteren Zeilen wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:3 angesetzt. Dies bedeutet, dass 100 μL aus der obersten Reihe abgenommen und der zweiten Reihe hinzu pipettiert wurden. Aus dieser Reihe wurden erneut 100 μL in die darunter liegende Reihe pipettiert. In Reihe F wurden schließlich 300 μL belassen mit 0,1 μM Konzentration der Inhibitoren.

	DMSO		Inhibitor A		Inhibitor B		Inhibitor C		Inhibitor D		Inhibitor E		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	30 μM
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	10 μM
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3 μM
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1 μM
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0,3 μM
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0,1 μM
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0 μM
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0 μM

Abb. 2: Aufbau der Verdünnungsreihe auf einer 96-Proben-Platte. Zur Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren wurden für jeden Inhibitor Doppelwerte angelegt. Den untersten beiden Reihen (G und H) der 96-Proben-Platte wurde kein Inhibitor hinzugefügt, sondern lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Anschluss wurde das Medium aus den restlichen Vertiefungen der Platte abgesaugt. Den Reihen B - F wurden 200 μL frisches Medium hinzugegeben. Anschließend wurden 300 μL der Inhibitoren in 30 μM Konzentration in die oberste Zeile der 96-Proben-Platte hinzugegeben. Aus der obersten Reihe wurden nun 100 μL abgenommen und der zweiten Reihe hinzu pipettiert. Aus dieser Reihe wurden erneut 100 μL in die darunter liegende Reihe pipettiert. So entstand schließlich eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:3 mit oben gezeigten Konzentrationen.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Wirkung der jeweiligen Inhibitoren analysiert (Kap. 2.2.2 und Kap. 2.2.3).

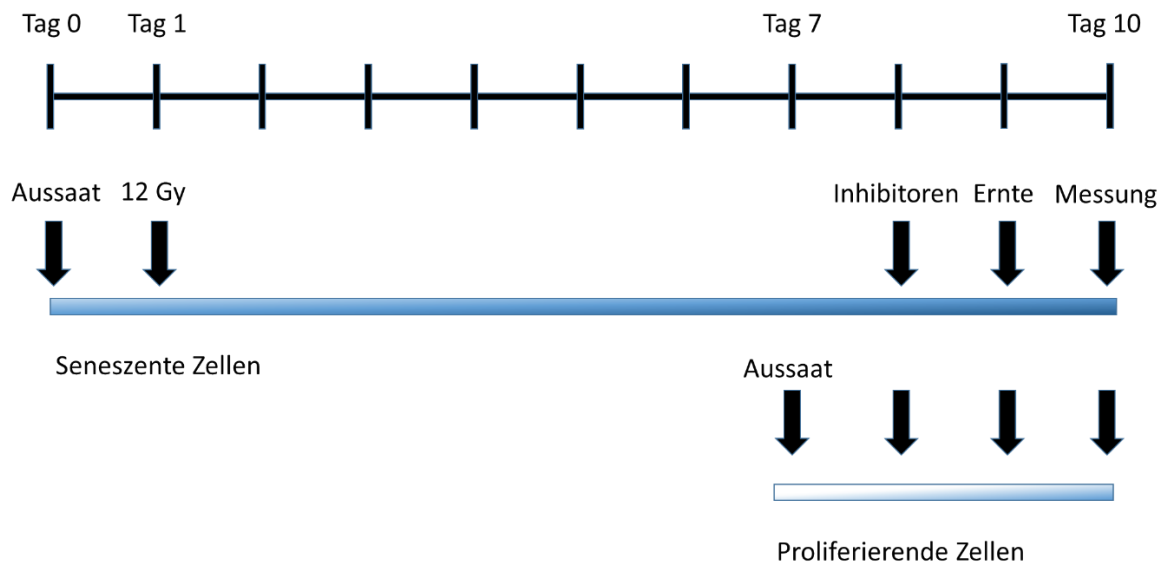


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf von Aussaat bis zur Messung seneszenten und proliferierender HCT116- und MCF-7 Zellen. Adhärenz wachsende HCT116- bzw. MCF-7 Zellen wurden an Tag 0 in einer Proben-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Bestrahlung mittels 12 Gy zur Induktion des seneszenten Phänotyps. An Tag 7 wurden proliferierende Zellen zum Vergleich ausgesät. Zu diesen und zu den seneszenten Zellen wurden an Tag 8 die entsprechenden Inhibitoren hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Ernte der Zellen, welche daraufhin den beiden Zytotoxizitätstesten (Kap. 2.2.2 und 2.2.3) zugeführt wurden. An Tag 10 konnte die Messung der Zahl vitaler Zellen bzw. des induzierten Zelltods erfolgen.

2.2.2 Kristallviolett-Zytotoxizitätstest

Der Kristallviolett-Zytotoxizitätstest dient der Quantifizierung der in den einzelnen Vertiefungen der 96-Proben-Platte vorhandenen vitalen Zellen. Er beruht darauf, dass mithilfe der verwendeten Kristallviolettlösung lediglich am Boden befindliche adhärenz Zellen angefärbt werden, während abgestorbene, sich abgelöste Zellen zuvor entfernt werden (Feoktistova et al., 2016).

Zur Durchführung dieses Testes wurde der Mediumüberstand und damit die abgelösten toten Zellen aus den Platten entfernt und daraufhin 50 µL der Kristallviolettlösung (Tab. 8) in jede Vertiefung hinzugegeben. Durch das in dieser Lösung enthaltene Methanol werden die verbliebenen vitalen Zellen fixiert und durch das enthaltene Kristallviolett angefärbt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (Geschwindigkeit 50/min). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen vorsichtig mit viel demineralisiertem Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Lösung der angefärbten Zellen mittels je 200 µL 33 %iger Essigsäure (Jänicke et al., 1994) und einer Inkubation von ca. 45 Minuten auf dem Horizontalschüttler (Geschwindigkeit 50/min) bei Raumtemperatur. Durch zwischenzeitliches vorsichtiges Klopfen wurden auch letzte Reste der Zellen gelöst bis sich eine einfarbige homogene

Lösung ergab. Daraufhin wurde die Lichtextinktion bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen. Diese ist nahe am Extinktionsmaximum von Kristallviolett bei 550 nm und hatte sich in vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe als gut geeignet gezeigt.

Sowohl bei den seneszenten als auch bei den proliferierenden Zellen wurde der in den unbehandelten Kontrollreihen der 96-Proben-Platte (Kap. 2.2.1) erzielte Wert zur Auswertung einer Zellzahl von 100 % gleichgesetzt. Aus den optischen Dichten der als Doppelwerte angelegten Vertiefungen eines Inhibitors wurden Mittelwerte gebildet. Die so ermittelten Extinktionswerte der mit Inhibitoren behandelten Proben wurden relativ zu den unbehandelten Kontrollen bezogen. Der so errechnete Zahlenwert in Prozent ergibt einen Wert für die Anzahl der überlebenden Zellen. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet.

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

bzw.

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

Hiermit konnte auch die durch einen Inhibitor ausgelöste Zelltodinduktion abgeschätzt werden. Da der induzierte Zelltod so aber nur indirekt bestimmt wurde, ist eine genaue Aussage über diesen nicht möglich. Auch Inhibitoren, die lediglich eine Proliferationshemmung der unbestrahlten Zellen bewirkten, führten im Kristallviolett-Test zu einer Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, ohne aber Zelltod zu induzieren. Im Gegensatz dazu war bei einer Zellzahlreduktion der seneszenten Zellen von einer Zelltodinduktion auszugehen, da bei diesen, sich nicht mehr teilenden Zellen, eine Proliferationshemmung nicht die Ursache einer verminderten Zellzahl und eines schwächeren Signals in diesem Test gewesen sein kann.

2.2.3 LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Zytotoxizitätstest wurde zur Quantifizierung des Zelltods durchgeführt. Er beruht darauf, dass tote Zellen ihre Membranintegrität verlieren und dadurch das natürlich im Zytosol vorkommende Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellkultur-Überstand gelangt (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Anhand der im Medium vorhandenen LDH-

Aktivität wird die Zahl der abgestorbenen Zellen bestimmt. Je höher die LDH-Aktivität, desto mehr Zelltod wurde durch den entsprechenden Inhibitor induziert.

Um die LDH-Aktivität zu quantifizieren wurde auf das Testkit von Roche (Cytotoxicity Detection Kit (LDH)) zurückgegriffen. Dieses enthält einen Katalysator, bestehend aus Diaphorase und NAD^+ , und eine Farbstofflösung, bestehend aus Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) und Natriumlactat. Der Katalysator und die Farbstofflösung werden kurz vor Verwendung im Verhältnis 1:46 gemischt. Bei vorhandener LDH im Überstand katalysiert dieses Enzym die Reaktion von Laktat zu Pyruvat. Dabei wird NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert. Durch den Katalysator (Diaphorase) werden die Protonen des $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das INT übertragen. Das entstehende Produkt färbt den Überstand rot. Mittels Mikroplattenleser wird die Lichtextinktion dann bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt. Die Referenzwellenlänge dient dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse bei der Messung der LDH-Aktivität, wie sie beispielsweise durch Luftblasen oder Präzipitate erzeugt werden. Die entsprechenden Vertiefungen der 96-Proben-Platte würden sowohl bei 490 nm als auch bei einer Wellenlänge von 690 nm eine vermeintlich hohe LDH-Aktivität aufweisen und können so bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt werden. Durch diesen Test kann die im Überstand vorhandene LDH-Aktivität quantifiziert werden (Decker & Lohmann-Matthes, 1988).

Hierfür wurden 100 μL Mediumüberstand aus jeder Vertiefung der 96-Proben-Platte entnommen und in eine neue 96-Proben-Platte überführt. Die Platten wurden bis zur Messung am nächsten Tag luftdicht verschlossen bei $+4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Anschließend wurden in jede Vertiefung 100 μL der Reaktionslösung hinzugeben und die Lichtextinktion mittels Mikroplattenleser bei Raumtemperatur in zeitlichen Abständen von 3 Minuten gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundfärbung des Mediums wurden zwei Vertiefungen der Platte lediglich mit Medium gefüllt. Die dort gemessene Grundaktivität wurde bei der Auswertung von den anderen Werten subtrahiert. Aus den resultierenden Werten konnte somit der in der Probe stattgefundenen Zelltod gemessen und berechnet werden. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO verwendet.

2.2.4 siRNA-Transfektion

Small Interfering RNAs (siRNAs) sind kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, mit einer Länge von ca. 21 - 25 Nukleotiden, welche an komplementäre mRNA-Moleküle binden und somit das Ablesen dieser und damit indirekt deren Funktion unterbinden können (Caplen et al., 2001). Durch Bildung eines *RNA-induced silencing complexes* (RISC) kann so mRNA

gebunden werden und die nach Transkription folgende Translation durch Degradation der mRNA unterbunden werden (Jinek & Doudna, 2009). Mit dem Einsatz von siRNAs sollte in dieser Arbeit spezifisch die Synthese der verschiedenen PI3K Isoformen verhindert werden.

Seneszenz und proliferierende Zellen wurden in 6-Proben-Platten mit siRNAs transfiziert (für entsprechende Zellzahlen Tab. 2). Proliferierende Zellen wurden dafür zuerst in 6 cm Schalen ausgesät und vor Transfektion auf die entsprechenden 6-Proben-Platten aufgeteilt.

Für die Transfektion wurden zwei Reaktionsgefäße angesetzt (Tab. 11) und nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur der Inhalt des zweiten Reaktionsgefäßes dem des ersten hinzugefügt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden pro Vertiefung einer 6-Proben-Platte 1,6 ml den Zellen entsprechendes Antibiotika-freies Medium hinzugegeben (Tab. 1), sodass sich ein Endvolumen von 2 ml pro Vertiefung ergab. Der Mediumüberstand der Zellen wurde entfernt und das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben. Nach 7,5 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, bei welchem das Transfektionsgemisch von den Zellen entfernt wurde. Die Zellen wurden nach 24 bis 120 stündiger Inkubation entsprechend des jeweiligen Versuchsaufbaus weiter verwendet. Es erfolgte die Ernte mittels Zellschaber im Zellmedium zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese und des Western-Blots.

Tabelle 11: Mengenangaben der Reaktionsgefäße für die siRNA-Transfektion (Alle Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung einer 6- bzw. 96-Proben-Platte.)

Platte	Reaktionsgefäß 1	Reaktionsgefäß 2	Antibiotika-freies Medium	Endvolumen
6-Proben-Platte	97 µL siRNA-Buffer 3 µL siRNA (20 µM Stock) 100 µL OptiMEM	196 µL OptiMEM 4 µL DharmaFECT 1	1,6 ml	2 ml
96-Proben-Platte	4,85 µL siRNA-Buffer 0,15 µL siRNA (20 µM Stock) 5 µL OptiMEM	9,8 µL OptiMEM 0,2 µL DharmaFECT	80 µL	100 µL

Um die Zellen nach Transfektion den zwei Methoden der Zelltodquantifizierung (Kristallviolett- und LDH-Zytotoxizitätstest) zuführen zu können, erfolgte die Aussaat der Zellen in einer 96-Proben-Platte. Dementsprechend wurden die verwendeten Mengenangaben pro Vertiefung für die beiden Reaktionsgefäße angepasst (Tab. 11). Nach den oben genannten Inkubationsschritten wurden lediglich 80 µL des entsprechenden Antibiotika-freien Mediums (Tab. 1) hinzugefügt. Nach 7,5 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, um das Transfektionsgemisch von den Zellen zu entfernen. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen den entsprechenden Methoden der Zelltodquantifizierung zugeführt.

2.2.5 Zellextrakt-Herstellung und Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Als Vorbereitung auf die SDS-Gelelektrophorese und die Western-Blots wurden die Zellen in 6-Proben-Platten ausgesät und entweder mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt oder mit siRNAs transfiziert (Kap. 2.2.1 und Kap. 2.2.4). Die Zellen wurden mittels Zellschaber im Zellmedium geerntet und bei +4 °C bei 5.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt werden. Daraufhin wurden die Zellen durch die Zugabe von 1 ml PBS gewaschen. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei +4 °C und 5.000 g für weitere 5 Minuten, sodass auch übriggebliebene Mediumreste durch Absaugen entfernt werden konnten. Die verbliebenen präzipitierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Lyse erfolgte durch Hinzugabe von 60 µL NP40-Lysepuffer zu den Zellpellets und anschließender Resuspension sowie Inkubation für 30 Minuten bei +4 °C. Daraufhin wurden die Zellen bei +4 °C bei 17.000 g für weitere 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte nach der Methode nach Bradford. Im entsprechenden Reagenz der Firma BIORAD ist der Farbstoff Triphenylmethan Coomassie-Brillant-Blau enthalten. Dieser bildet unspezifisch Komplexe an unpolaren Seitenketten von Proteinen, sodass sich dessen Absorptionsmaximum in den blauen Wellenlängenbereich bei 595 nm verschiebt. Die bei dieser Wellenlänge gemessenen Extinktionswerte stellen somit ein Maß für die enthaltene Proteinmenge dar (Bradford, 1976). 1 ml des verdünnten Proteinassay-Reagenzes wurde in eine lichtdurchlässige Küvette überführt. Dem Ganzen wurden dann 2 µL des Lysats hinzugefügt. Zur Bestimmung eines Leerwertes dienten 2 µL des NP40-Lysepuffers als Referenz mit einer Extinktion gleich Null. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktionswerte jeder einzelnen Probe.

2.2.6 SDS-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden mittels einer Eichgerade 30 µg Protein (entspricht ca. 1,5 OD der Bradford-Messung) mit SDS-Probenpuffer auf ein Volumen von 25 µL aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Anschließen wurden sie nach kurzer Inkubation auf Eis entweder direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um die Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden die Gele gegossen (Tab. 8), in die Gelelektrophoresekammer mit SDS-Gelelektrophoresepuffer (Tab. 8) eingesetzt und mit den Proben beladen. Als Längenstandard diente ein vorgefärbter Proteinlängenstandard der Firma Thermo Scientific. Die Auftrennung der Proteine erfolgte schließlich bei einer Stromstärke von 40 mA bei einem verwendeten Gel bzw. 60 mA bei zwei gleichzeitig verwendeten Gelen.

2.2.7 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe sollten diese nach Übertragung auf eine Membran mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Hierfür mussten die Membranen (Immobilon-FL PVDF Membranen von Merck) in Methanol aktiviert und anschließend in demineralisiertem Wasser gewaschen werden. Das Polyacrylamidgel aus der SDS-Gelelektrophorese wurde ebenfalls nach Auftrennung der Proteine kurz in demineralisiertem Wasser gespült. Das Sammelgel wurde vorsichtig vom Trenngel entfernt. Anschließend wurden die Membran und das Trenngel jeweils in Westernblot-Puffer (Tab. 8) für 15 Minuten äquilibriert. Hiernach wurde das Tankblotsystem von Bio RAD zusammengebaut. Über einen Zeitraum von zwei Stunden erfolgte unter Anlegen einer konstanten Stromstärke von 150 mA das Übertragen der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Membran. Daraufhin wurden die Membranen für weitere zwei Stunden in Blockierungslösung (Tab. 8) inkubiert.

Über Nacht wurden die Membranen bei +4 °C mit der Erstantikörperlösung versetzt inkubiert. Der verwendete Erstantikörper war gegen das entsprechende Protein gerichtet, welches detektiert werden sollte. Es folgten mehrere Waschschrte in Form einer Inkubation von 5 Minuten in PBS-T, 15 Minuten in Blockierungslösung und erneut zweimal 10 Minuten in PBS-T. Anschließend wurde die Zweitantikörperlösung hinzugegeben. Es folgte ein erneuter Inkubationsschritt abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zweitantikörper binden hierbei an den Fc-Teil der Erstantikörper. Dieses macht man sich in der anschließenden Messung zu Nutze, um die gebundenen Erstantikörper und damit die Proteine, an welche diese gebunden haben, detektierbar zu machen. Nach Hinzugabe der Zweitantikörperlösung folgten erneute Waschschrte in Form von dreimaliger Inkubation in PBS-T für jeweils 10 Minuten. Daraufhin wurden die Membranen für eine weitere Stunde verdunkelt getrocknet. Bis zur Messung konnten die Membranen verdunkelt bei +4 °C aufbewahrt werden.

Die Detektion der Fluoreszenz-Signale der Zweitantikörper erfolgte mittels eines Membran-Scanners (Odyssey FC Imaging System, LI-COR), die anschließende Auswertung mittels

der Software Image Studio Version 5.2.5. Wurden Antikörper von zwei verschiedenen Spezies verwendet, erfolgte die Detektion mittels Zweitantikörpern in unterschiedlichen Verdünnungen, die gegen die unterschiedlichen Fc-Teile der beiden Spezies gerichtet sind, sodass zwei verschiedene Fluoreszenzfarben erreicht werden konnten.

2.2.8 Statistik und Datenaufbereitung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mittels Microsoft Excel. Es wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens $n=3$ unabhängigen Experimenten dargestellt. Für die Signifikanzanalysen wurde GraphPad Prism verwendet. Zur Auswertung der Unterschiede wurde eine ordinäre einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Tukey Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Hierbei wurden Unterschiede als signifikant (* = $p < 0,05$), sehr signifikant (** = $p < 0,01$) oder hoch signifikant (***) = $p < 0,001$) gewertet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei Western Blots $n=3$ unabhängige Experimente durchgeführt und eine repräsentative Abbildung gezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Wortmannin und PX-866 wirken senolytisch

Für den Nachweis der senolytischen Aktivität von Wortmannin und seinem klinischen Derivat PX-866 wurde in HCT116- und MCF-7 Tumorzellen Seneszenz durch ionisierende Strahlung induziert (Kap. 2.2.1). Die verwendete Bestrahlungs-Dosis betrug 12 Gy, eine mit dem klinischen Alltag vergleichbare Dosis. Viele Tumorpatienten erhalten kumulativ innerhalb einer Woche ebenfalls eine Dosis von 10 Gy appliziert, wenn auch nicht in einer Sitzung, wie in dieser Arbeit angewandt, sodass sich die verwendete Dosis aber dennoch in einer klinisch sinnvollen Größenordnung befindet.

Die erfolgte Seneszenzinduktion konnte mikroskopisch anhand der veränderten Morphologie der Zellen überprüft werden (Hernandez-Segura et al., 2018; Neuwahl et al., 2024; Sohn et al., 2006). Des Weiteren konnte im Folgenden die Seneszenzinduktion durch Einsatz von Western Blots und Antikörpern gegen p53 und p21 verifiziert werden. Die verwendeten Tumorzellen exprimieren kein funktionsfähiges p16 (Chakradeo et al., 2016; Todd et al., 2017), sondern lediglich die Wildtyp-Form von p53, sodass sie über die p53-p21 Achse Seneszenz einleiten (Abbas & Dutta, 2009; Jänicke et al., 2008; Sohn et al., 2006). In den Western Blots konnte in den bestrahlten Zellen eine deutlich größere Proteinmenge an p53 und p21 detektiert werden, als es bei den proliferierenden Zellen der Fall war (Abb. 13A und Abb. 15), was auf die Einleitung des Seneszenzprogramms über die p53-p21 Achse hindeutet. Auf weitere Nachweismethoden wurde in dieser Arbeit verzichtet, da diese Bedingungen in der Arbeitsgruppe sehr gut etabliert sind und regelmäßig überprüft werden. So erfolgte bereits der Nachweis der Seneszenzinduktion durch ionisierende Strahlung mittels Messung der SA- β -Gal-Aktivität (Neuwahl, 2020; Neuwahl et al., 2024). Zusammengenommen ergeben sich durch die drei genannten Nachweismethoden Morphologie, erhöhte p53/p21 Expression und gesteigerte SA- β -Gal-Aktivität starke Hinweise auf das Vorliegen seneszenten Zellen.

Eine Woche nach Bestrahlung wurden die Zellen mit den senolytischen Substanzen Wortmannin und PX-866 behandelt. Einen Tag vor Hinzugabe der Inhibitoren erfolgte zudem die Aussaat von proliferierenden Zellen als Kontrolle. Am darauffolgenden Tag wurde der Zelltod mittels eines Kristallviolett- und LDH-Zytotoxizitätstestes (Kap. 2.2.2 und 2.2.3) quantifiziert.

Sowohl in den HCT116- als auch in den MCF-7 Zellen zeigte sich im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest eine deutliche Reduktion der Zellzahl durch Wortmannin und durch PX-866, scheinbar also eine Auslösung des Zelltods bei seneszenten als auch bei proliferierenden Zellen. Die Zellzahlreduktion war bei den bestrahlten Zellen allerdings

jeweils etwas ausgeprägter als bei den proliferierenden Zellen (Abb. 4). Dennoch ist es im Kristallviolett-Test so, dass auch in den proliferierenden Zellen die Zahl vitaler Zellen reduziert wird.

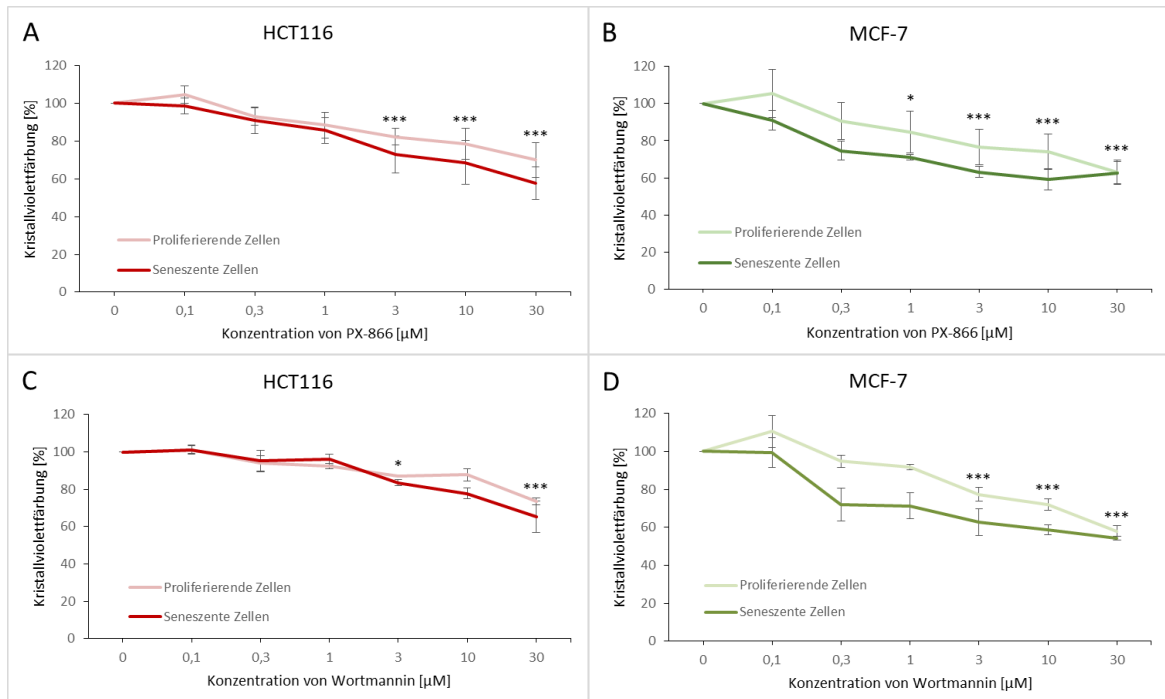


Abb. 4: PX-866 und Wortmannin reduzieren die Zellzahl von HCT116- und MCF-7 Zellen. Senescente (sen.) und proliferierende (prol.) HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von PX-866 (A, B) oder Wortmannin (C, D) inkubiert. Anschließend wurde die Zahl lebender Zellen mittels Kristallviolett-Zytotoxizitätstest gemessen. Die Absorptionswerte von unbehandelten Kontrollzellen wurden als 100 % definiert. Sowohl in HCT116- als auch in MCF-7 Zellen findet eine Reduktion der Zahl lebender Zellen sowohl in den proliferierenden als auch in den seneszenten Zellen statt, wobei diese in den seneszenten Zellen deutlicher ausfällt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs (A, B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten. Die mit Sternchen dargestellten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in proliferierenden bzw. seneszenten Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μ M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p > 0,001$.

Um die Ergebnisse des Kristallviolett-Testes genauer zu analysieren, wurde ein spezifischer Zytotoxizitätstest in Form des LDH-Testes angewandt. Während der Kristallviolett-Test lediglich die Zahl lebender Zellen quantifizieren kann, kann durch den LDH-Test über die Detektion der im Rahmen des Zelluntergangs freigesetzten Menge an LDH direkt der Zelltod gemessen werden. In diesem LDH-Zytotoxizitätstest kann ein deutlich größerer Unterschied erkannt werden. Sowohl PX-866 als auch Wortmannin steigern signifikant die LDH-Aktivität in den Platten mit bestrahlten Zellen, während dies in proliferierenden Zellen nur schwach der Fall ist (Abb. 5). Dosisabhängig wurde in einem Bereich von 3 - 30 μ M Wortmannin vermehrt extrazelluläre LDH-Aktivität detektiert, was auf einen vermehrten Zelltod hinweist (Abb. 5C und 5D).

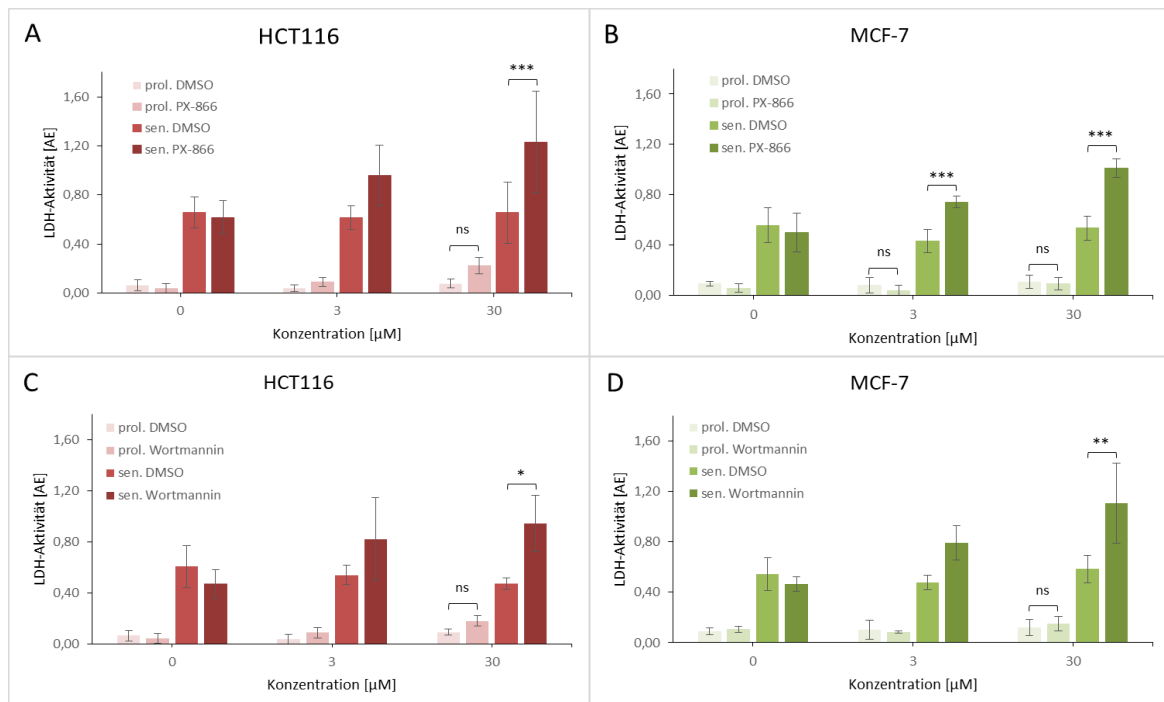


Abb. 5: PX-866 und Wortmannin wirken senolytisch. Seneszenzente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von PX-866 (A, B) oder Wortmannin (C, D) inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels LDH-Zytotoxizitätstest quantifiziert. Sowohl in HCT116- als auch in MCF-7 Zellen ist ein Anstieg der LDH-Aktivität in den seneszenten Zellen nach Inkubation mit PX-866 oder Wortmannin zu messen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus sechs (A, B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten. ns nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der Unterschied in den Ergebnissen der beiden Nachweismethoden für Zelltod lässt sich daraus erklären, dass Wortmannin und sein Derivat PX-866 in proliferierenden Zellen einen Zellzyklusarrest auslösen (Akter et al., 2012; Courtney et al., 2010; Howes et al., 2007; Neuwahl et al., 2024). Daraus resultiert zwar eine gemessene Reduktion der Zellzahl der proliferierenden Zellen im Kristallviolett-Test ohne allerdings eine Erhöhung der Zelltodesrate. Die proliferierenden Zellen werden in ihrer Zellteilung durch die beiden Inhibitoren behindert, sodass im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO eine reduzierte Zahl vitaler Zellen detektiert wird. Der induzierte Zelltod wird hingegen im LDH-Zytotoxizitätstest durch die LDH-Aktivität verlässlich abgebildet. In den Platten mit den proliferierenden Zellen blieb die gemessene LDH-Aktivität gering. Hieraus lässt sich ableiten, dass in den proliferierenden Zellen kein Zelltod induziert wird. Die Zellzahlreduktion, die bei seneszenten Zellen im Kristallviolett-Test gemessen wird, ist hingegen tatsächlich auf induzierten Zelltod zurückzuführen. Seneszenzente Zellen befinden sich in einem Zellzyklusarrest (Hayflick, 1965), sodass die Reduktion der Zahl vitaler Zellen nicht auf eine weitere Zellzyklusinhibition durch die Inhibitoren zurückgeführt werden kann. Dies wird im LDH-Zytotoxizitätstest durch den deutlichen Anstieg der LDH-Aktivität als Marker für den stattgehabten Zelltod bestätigt. Das als Negativkontrolle verwendete DMSO löste weder in seneszenten noch in proliferierenden Zellen Zelltod aus. Demnach werden also gezielt

seneszenten Zellen durch Wortmannin und PX-866 eliminiert. Da eine Substanz als senolytisch gilt, in dem Moment, in dem sie lediglich in seneszenten aber nicht in proliferierenden Zellen Zelltod auslöst, lässt sich abschließend sagen, dass eine senolytische Wirkung von Wortmannin und PX-866 gezeigt werden konnte.

3.2 Versuch der Reproduktion der senolytischen Wirkung mittels siRNA gesteuerten Knockdowns der PI3K

PX-866 und Wortmannin wirken beide als panPI3K-Klasse-I-Inhibitoren (Powis et al., 1994; Wipf et al., 2004). Daher wurde versucht diese Wirkung mittels gegen PI3K Klasse-I Isoformen gerichteter siRNAs zu replizieren. Würden diese siRNAs ebenfalls eine senolytische Wirkung zeigen, verifiziert das die direkte PI3K-Inhibition und spricht gegen potentielle *off target* Effekte als Ursache für die senolytische Wirksamkeit von PX-866 und Wortmannin. Von vier bekannten PI3K Isoformen (α - δ) wurde sich auf zwei fokussiert: die α und die δ Isoform. Die vier Isoformen können grob anhand ihres Vorkommens unterteilt werden. Während die α und die β Isoform ubiquitär vorkommen, werden die anderen beiden Isoformen, γ und δ , gesteigert in Immunzellen exprimiert (Fruman et al., 2017). Die α Isoform ist die am stärksten exprimierte und beispielsweise auch am häufigsten in Tumorzellen mutierte Form (Fruman et al., 2017).

3.2.1 Nachweis der Wirksamkeit der siRNAs mittels Western Blot

Zum Nachweis, dass die verwendeten siRNAs die Synthese der entsprechenden PI3K-Isoformen inhibieren, diente die Messung der jeweiligen Proteinexpression mittels Western Blots. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach siRNA Transfektion durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt mit der größten Reduktion der Proteinmenge herauszufinden.

Hierfür wurden HCT116 Zellen ausgesät und bestrahlt, um den seneszenten Phänotyp zu induzieren. Zum Vergleich wurden einen Tag vor Transfektion proliferierende Zellen ausgesät. Die jeweiligen Zellen wurden mit siRNAs gegen PIK3CA (p110alpha) und PIK3CD (p110delta) transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mittels siCon, einer Kontroll-siRNA, die gegen keine komplementäre mRNA in der Zelle gerichtet ist. Der Einsatz dieser Kontroll-siRNA ist wichtig, um ausschließen zu können, dass gemessener Zelltod alleine durch den Transfektionsvorgang induziert wurde. Befindet sich zu viel RNA in einer Zelle, ist dies für die Zelle gleichbedeutend mit einer Virusinfektion, wodurch ein Zelltodprogramm eingeleitet werden kann (Gil & Esteban, 2000). sip21 diente als weitere Negativkontrolle, um zu zeigen, dass durch Transfektion mit einer siRNA, die gegen eine

mRNA in der Zelle gerichtet ist, keine Auswirkung auf die Expression der PI3K erreicht wird und kein Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung besteht.

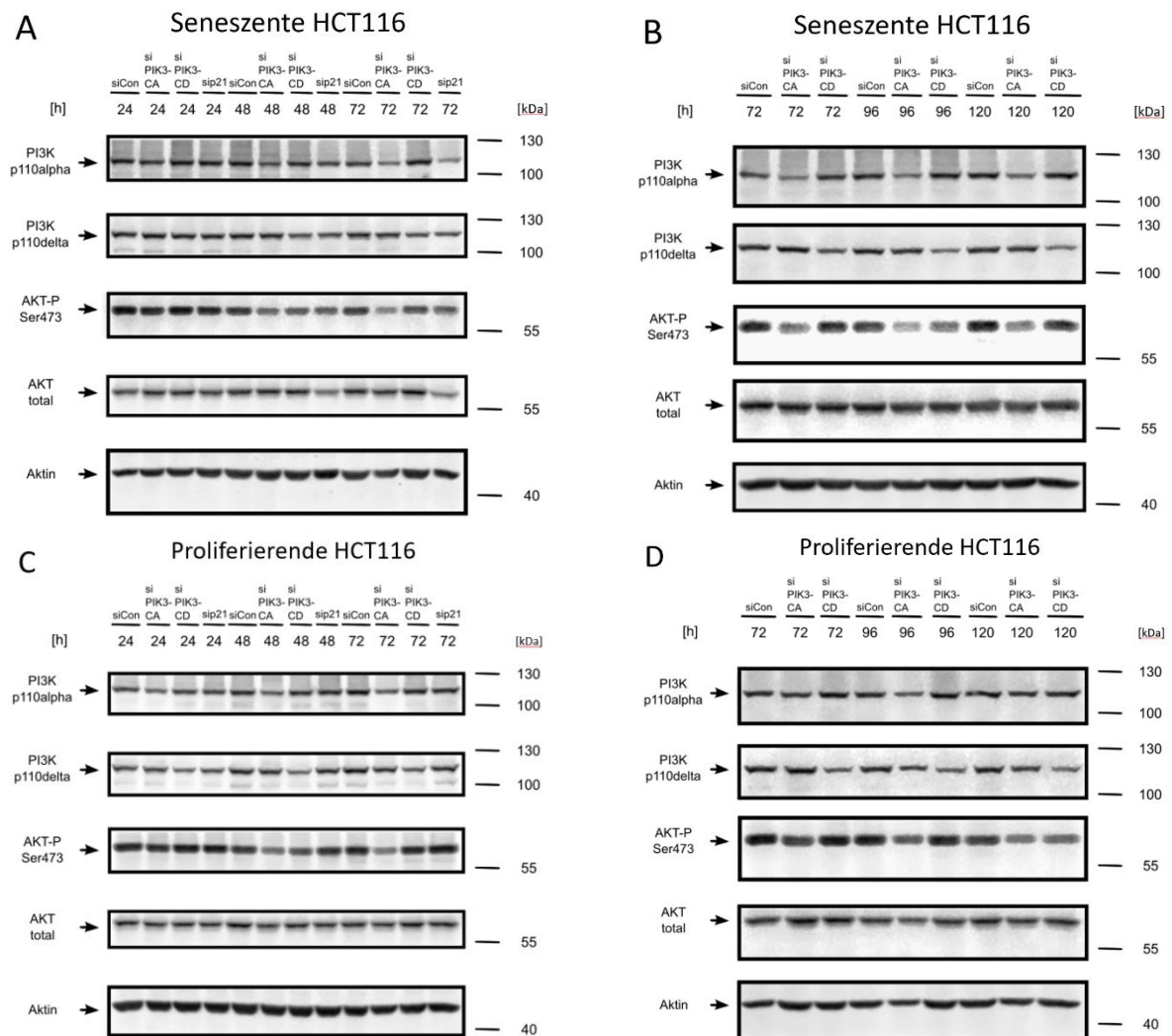


Abb. 6: Gegen PI3Kp110 α und PI3Kp110 δ gerichtete siRNAs reduzieren die nachgewiesene Menge an PI3Ks und phosphoryliertem AKT in seneszenten und proliferierenden HCT116-Zellen. Senescente (A, B) und proliferierende (C, D) HCT116-Zellen wurden mit siRNAs gegen die PI3Kp110alpha- und PI3Kp110delta-Isoform transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mittels siCon und sip21. Die Zellen wurden in einem Zeitraum von 1-5 Tagen nach Transfektion in einem 24 h Rhythmus geerntet, um den optimalen Zeitpunkt nach Transfektion mit Reduktion der größten Proteinmenge zu identifizieren. Zur Analyse, ob die siRNAs auch eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT als Hauptzielprotein des PI3K-Signalwegs erreichen, wurden im Western Blot ebenfalls Antikörper gegen AKT und AKT-P verwendet. Antikörper gegen Aktin dienten als Ladekontrolle. In den seneszenten Zellen lag der optimale Zeitpunkt bei 120 h nach Transfektion, während er bei proliferierenden Zellen im Zeitraum zwischen 72 - 96 h liegt. Die dargestellten Western Blots sind jeweils repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Ernte der Zellen erfolgte alle 24 Stunden von Tag 1 bis Tag 5 nach Transfektion. Um zu analysieren, ob die siRNAs auch eine Reduktion der Phosphorylierung von Akt, dem Hauptzielprotein der PI3Ks erreichen, kamen ebenfalls Antikörper gegen Akt und phosphoryliertes Akt zur Anwendung. Die gegen PIK3CA gerichtete siRNA führte zu einer

geringfügigen Reduktion der Proteinmenge nach 48 Stunden und einer ausgeprägteren Reduktion nach 72 Stunden (Abb. 6A und 6C). Die gegen PIK3CD verwendete siRNA zeigte ein ähnliches Ergebnis mit allerdings insgesamt geringfügigerer Reduktion der nachgewiesenen Proteinmenge. Analog zur Reduktion der Menge an nachgewiesenen PI3Ks konnte eine Reduktion der Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden. Diese war ausgeprägter bei der Reduktion der ubiquitär vorkommenden Hauptisoform PI3Kalpha im Gegensatz zu PI3Kdelta. Zur Evaluation einer möglichen weiteren Reduktion der Enzymmenge, wurde der Zeitraum auf 96 und 120 Stunden erweitert. Hier zeigte sich eine zunehmende Reduktion in den seneszenten Zellen (Abb. 6B). Deshalb wurde für die Experimente eine Inkubationszeit von 120 h als Zeitpunkt ausgewählt. Im Gegensatz zu den seneszenten Zellen liegt der optimale Zeitpunkt in den proliferierenden Zellen hingegen bei 72 - 96 h (Abb. 6C und 6D).

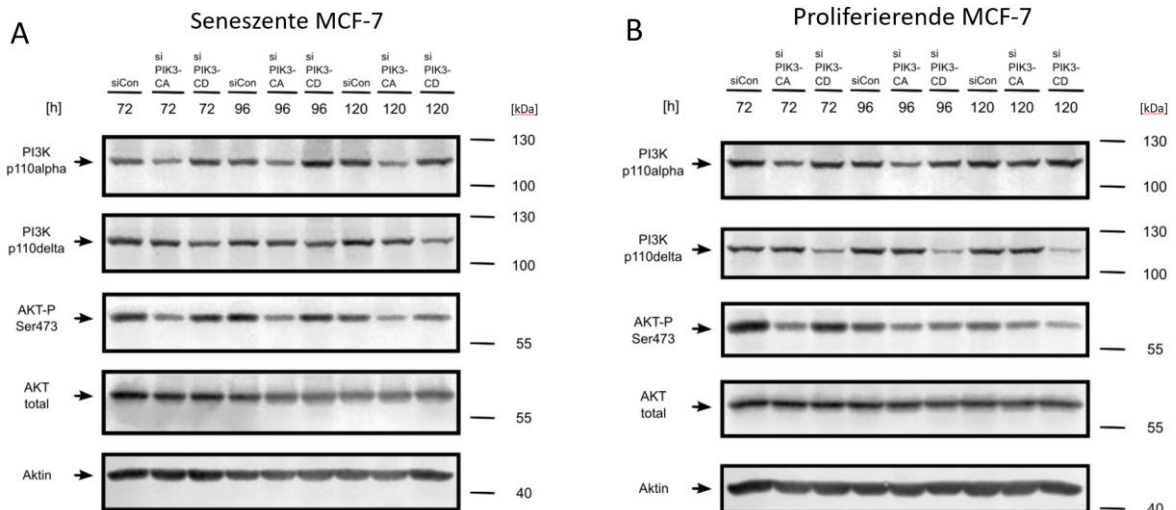


Abb. 7: Gegen PI3Kp110 α und PI3Kp110 δ gerichtete siRNAs reduzieren die nachgewiesene Menge an PI3Ks und phosphoryliertem AKT in seneszenten und proliferierenden MCF-7 Zellen. Senescente (A) und proliferierende (B) MCF-7 Zellen wurden mit siRNAs gegen die PI3Kp110alpha- und PI3Kp110delta-Isoform transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mittels siCon. Da bereits in HCT116 Zellen ein optimaler Zeitpunkt nach Transfektion im Bereich zwischen 72 – 120 h identifiziert worden war, wurden die MCF-7 Zellen lediglich in diesem Zeitfenster in einem 24 h Rhythmus geerntet. Zur Analyse, ob die siRNAs auch eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT als Hauptzielprotein des PI3K-Signalwegs erreichen, wurden im Western Blot ebenfalls Antikörper gegen AKT und AKT-P verwendet. Antikörper gegen Aktin dienten als Ladekontrolle. In den seneszenten Zellen lag der optimale Zeitpunkt bei 120 h nach Transfektion, während er bei proliferierenden Zellen im Zeitraum zwischen 72 - 96 h liegt. Die dargestellten Western Blots sind jeweils repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Experimente.

In MCF-7 Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild mit identischen siRNA Inkubationszeiten für das Erreichen eines effizienten *Knockdowns* (Abb. 7). Auch in MCF-7 Zellen zeigte sich wie in HCT116-Zellen eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von Akt, vor allem nach Einsatz der siRNA gegen die α -Isoform der PI3K.

Somit konnte sowohl in HCT116-Zellen als auch in MCF-7 Zellen die Wirksamkeit der verwendeten siRNAs und deren molekulare Auswirkungen auf die Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei allerdings lediglich um einen partiellen *Knockdown* und keinen vollständigen *Knockout*, sodass zu detektierende Restproteinmengen von PI3K und AKT-P verbleiben.

3.2.2 Senolytische Wirkung von PX-866 kann durch siRNAs nicht reproduziert werden

Zur Überprüfung, inwiefern die siRNAs den gleichen Effekt wie PX-866 erreichen können, wurden erneut die bereits vorher verwendeten Zytotoxizitätsteste durchgeführt. Hierfür wurden bestrahlte Zellen mit siRNAs gegen PIK3CA und PIK3CD behandelt und der 120 h nach Transfektion so induzierte Zelltod mit dem durch PX-866 induzierten Zelltod verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten erfolgte zusätzlich zur Behandlung mit PX-866 die Transfektion der Zellen mit der Kontroll-siRNA, sodass auch diese Zellen einen Transfektionsvorgang durchlaufen hatten. Da PX-866 ein panPI3K-Klasse-I-Inhibitor ist, wurde ebenfalls der Effekt der gleichzeitigen Kombination von siPIK3CA + siPIK3CD untersucht.

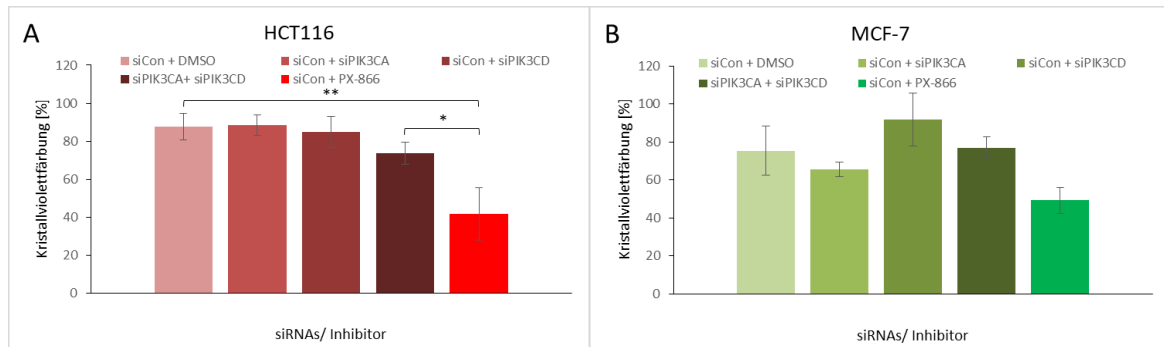


Abb. 8: siRNAs erreichen die senolytische Wirkung von PX-866 nicht. Senescente HCT116- (A) und MCF-7 (B) Zellen wurden mit siRNAs gegen PIK3CA, PIK3CD und der Kombination beider siRNAs transfiziert und nach 120 h geerntet. Zur Vergleichbarkeit des senolytischen Effektes dienten die Transfektion mittels siCon und eine folgende 24-stündige Inkubation mit PX-866. Anschließend wurde die Zahl vitaler Zellen mittels Kristallviolett-Zytotoxizitätstest quantifiziert. 10 μ M PX erreichen in beiden Zelllinien eine deutliche Zellzahlreduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Transfektion mit den verschiedenen siRNAs kann diesen Effekt nicht replizieren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Im Kristallviolett-Test zeigte sich nach Behandlung mit 10 μ M PX-866 sowohl in HCT116-Zellen als auch in MCF-7 Zellen eine deutliche Zellzahlreduktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Dieser Effekt konnte durch die siRNA Transfektion nicht wie erhofft repliziert werden. In HCT116-Zellen konnte lediglich eine schwache Zellzahlreduktion nach kombinierter Transfektion von siPIK3CA + siPIK3CD erreicht

werden, welche nicht an das Resultat von PX-866 heranreichte. Im Gegensatz hierzu präsentierte sich in MCF-7 Zellen eine deutlichere Zellzahlreduktion nach alleiniger Transfektion mit siPIK3CA, welche allerdings ebenfalls nicht der Ausprägung der durch PX-866 induzierten Reduktion entsprach (Abb. 8).

Aus der Messung des Zelltodes mittels der Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität ergaben sich ähnliche Schlussfolgerungen. In HCT116-Zellen zeigten die mit PX-866 behandelten Zellen eine deutliche LDH-Aktivität. Zwischen den mit siCon transfizierten und mit DMSO inkubierten Zellen und denen mit spezifischen siRNAs transfizierten Zellen ist kein nennenswerter Unterschied zu verzeichnen. Alle erreichen eine deutlich geringere LDH-Aktivität als PX-866 (Abb. 9A). Es ist davon auszugehen, dass PX-866 wie bereits zuvor gezeigt in den seneszenten Zellen senolytisch wirkt; die siRNAs diese Wirkung allerdings nicht replizieren können. Eine ähnliche Verteilung der LDH-Aktivitäten, wenn auch in geringerem Gesamtausmaß, fand sich in den verwendeten MCF-7 Zellen. Auch hier zeigten die mit den jeweiligen gezielten siRNAs transfizierten Zellen ähnliche LDH-Aktivitäten wie die mit der Negativkontrolle siCon transfizierten Zellen (Abb. 9B).

Es war also sowohl in HCT116 als auch in MCF-7 Zellen nicht möglich die senolytische Aktivität von PX-866 mit Hilfe von siRNAs zu replizieren. Weder die Verwendung einer gegen die α -Isoform noch einer gegen die δ -Isoform gerichteten siRNA noch die kombinierte Verwendung beider siRNAs, erreichten eine senolytische Aktivität annähernd dem Ausmaß, welches der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor PX-866 erzielt.

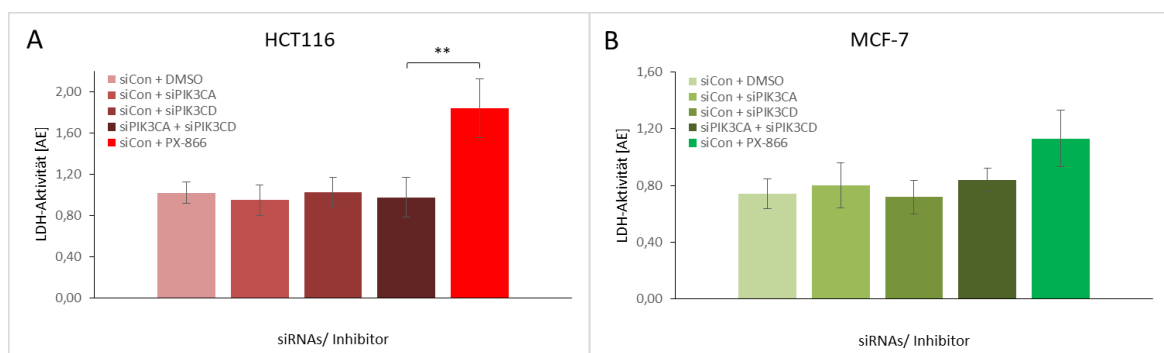


Abb. 9: Gegen PI3K Isoformen gerichtete siRNAs können die senolytische Wirkung von PX-866 nicht replizieren. Senescente HCT116- (A) und MCF-7 (B) Zellen wurden mit siRNAs gegen PIK3CA, PIK3CD und der Kombination beider siRNAs transfiziert und nach 120 h geerntet. Zur Vergleichbarkeit des senolytischen Effektes dienten die Transfektion mittels siCon und eine folgende 24-stündige Inkubation mit PX-866. Anschließend wurde der Zelltod mittels LDH-Zytotoxizitätstest quantifiziert. Hier konnte ein deutlicher Anstieg der LDH-Aktivität durch Inkubation mit PX-866 gemessen werden, wohingegen die verschiedenen siRNAs im Vergleich zur Transfektion mit siCon und anschließenden Inkubation mit DMSO keinen nennenswerten Unterschied zeigen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **p < 0,01

3.3 Reproduktion der senolytischen Wirkung von PX-866 durch Inhibition verschiedener Kinasen des PI3K-Signalwegs

Der komplexe PI3K-Signalweg verfügt über zahlreiche Signaltransduktionsarme mit verschiedensten Effektorkinasen. Außerdem kann bei Kinase-Inhibitoren wie PX-866 und Wortmannin nie ganz ausgeschlossen werden, dass auch andere Kinasen durch sogenannte *off target* Effekte beeinflusst werden. Um diese detaillierter aufzuschlüsseln sowie den entscheidenden Signaltransduktionsarm zu detektieren, wurden verschiedene Inhibitoren mit verschiedenen Effektorkinasen als Zielprotein innerhalb des PI3K-Signalwegs herangezogen (Kap. 1.5).

3.3.1 Die Inhibition von PI3K Effektorkinasen übt keinen senolytischen Einfluss aus

Zur Identifikation des im Signalweg folgenden entscheidenden Zielproteins für die senolytische Wirkung von PX-866 wurden verschiedene Inhibitoren verwendet (Abb. 10).

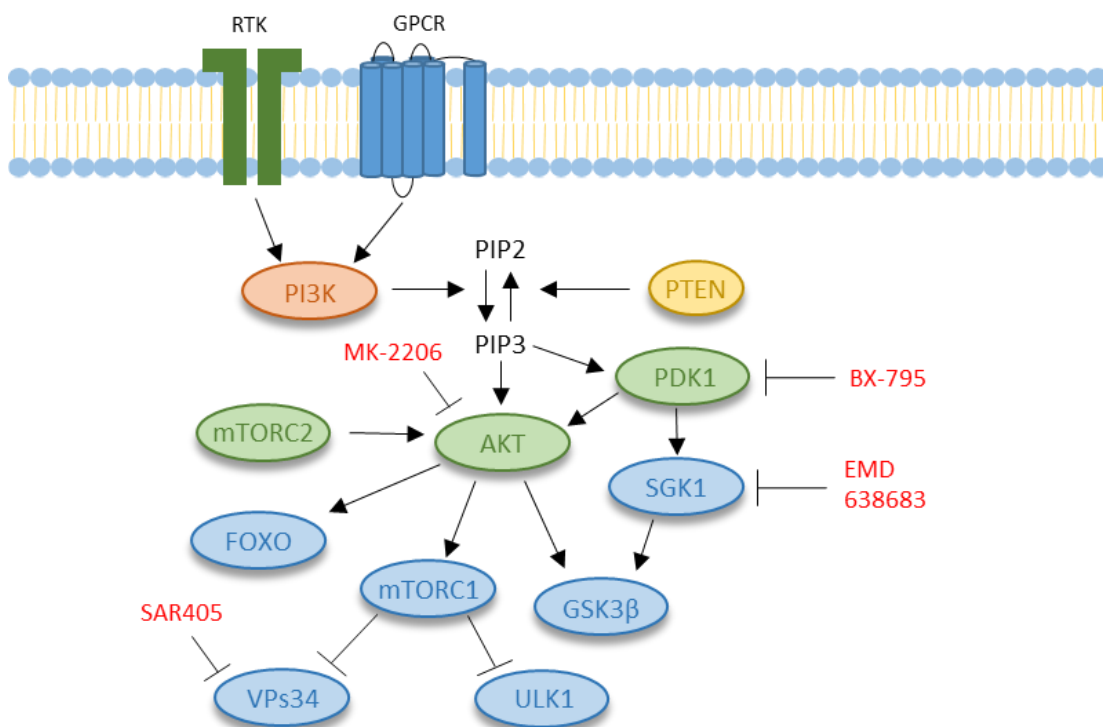


Abb. 10: Der PI3K-Signalweg mit Angriffspunkten der verwendeten Inhibitoren der Effektorkinasen. Zur Identifikation möglicher *off-target* Effekte bzw. des im Signalweg folgenden entscheidenden Zielproteins wurden Inhibitoren mit unterschiedlichen Angriffspunkten im PI3K-Signalweg verwendet. MK-2206 ist ein spezifischer AKT-Inhibitor und hemmt damit eines der Hauptzielproteine des Signalwegs. BX-795 ist ein PDK-1 Inhibitor. Es steuert unter anderem die Aktivierung der SGK1 und ist an der Phosphorylierung von AKT mitbeteiligt. EMD 638683 hemmt die SGK1. Eine Kinase, die gemeinsam mit AKT verantwortlich ist für die Phosphorylierung von GSK3β. (Erstellt nach Alessi et al., 1997; Courtney et al., 2010; Djuzenova et al., 2019; Fruman et al., 2017; Hertweck et al., 2004; Maehama & Dixon, 1998; Okuzumi et al., 2009; Pap & Cooper, 1998; Xiaobo et al., 2016; Zhao et al., 2017).

MK-2206 als AKT-Inhibitor (Hirai et al., 2010) diente dazu eines der Hauptzielproteine des PI3K-Signalwegs als möglicherweise entscheidendes Protein zu überprüfen. Des Weiteren wurde ein PDK-1 Inhibitor, BX-795, (Feldman et al., 2005) und ein SGK1-Inhibitor, EMD 638683 (Ackermann et al., 2011), verwendet. Zuletzt sollte auch die PI3K Klasse III mittels des Vps34 Inhibitors SAR405 (Ronan et al., 2014) überprüft werden. Vps34 steht über mTORC1 in Verbindung mit der PI3K Klasse I. Durch fehlende PI3K Klasse I Aktivierung, wird mTORC1 weniger phosphoryliert, was zu einer gesteigerten Aktivität von Vps34, einem wichtigen Autophagieregulator, führt (Ronan et al., 2014). Zur Quantifizierung einer möglichen senolytischen Wirkung wurden erneut die bereits beschriebenen Zytotoxizitätsteste angewandt. Vor Einsatz der Inhibitoren in den entsprechenden Zytotoxizitätstesten wurden diese ähnlich den siRNAs auf ihre Wirksamkeit mittels Western Blot überprüft. Proliferierende und seneszente HCT116- und MCF-7 Zellen wurden jeweils mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt. Für jeden Inhibitor wurde ein Protein ausgewählt, über welches auf die Wirksamkeit der Inhibitoren geschlossen werden konnte. Die Wirksamkeit des AKT-Inhibitors MK-2206 konnte durch Reduktion von phosphoryliertem AKT bestätigt werden (Abb. 11A). MK-2206 bindet an die PH-Domäne von AKT, sodass die Bindung an PIP3 und damit die Rekrutierung an die Zellmembran verhindert wird. Die normalerweise folgende Phosphorylierung an den Positionen Thr308 durch PDK1 und an Position Ser473 durch mTORC2 kann somit nicht stattfinden (Djuzenova et al., 2019; Okuzumi et al., 2009). Eine Behandlung mit MK-2206 ließ im Kristallviolett-Test in HCT116-Zellen keinen Unterschied zwischen proliferierenden und seneszenten Zellen erkennen (Abb. 11B). Die Zellzahl beider wird im gleichen Maße deutlich reduziert. Im LDH-Test zeigte sich in diesen Zellen in 3 µM Konzentration kein Unterschied zwischen den mit DMSO behandelten Kontrollen und den mit MK-2206 behandelten Zellen. Bei 30 µM hingegen löste MK-2206 sowohl in seneszenten Zellen als auch in proliferierenden Zellen signifikant Zelltod aus (Abb. 11B und 11D). Somit wirkt MK-2206 in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf proliferierende und seneszente HCT116-Zellen, während in niedrigen Konzentrationen kein Effekt besteht. In MCF-7 Zellen dagegen konnte im Kristallviolett-Test im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 - 10 µM ein Unterschied in der Zellzahl zwischen proliferierenden und seneszenten Zellen detektiert werden (Abb. 11C). Im LDH-Test konnte in seneszenten MCF-7 Zellen in hohen Konzentration wie z. B. bei Verwendung von 30 µM MK-2206 ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität verzeichnet werden, wohingegen in proliferierenden Zellen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen MK-2206 und DMSO besteht (Abb. 11E). Somit konnte durch den Einsatz von MK-2206 die senolytische Wirkung von PX-866 nicht in beiden Zelllinien reproduziert werden, insbesondere weil PX-866 im LDH-Zytotoxizitätstest im Gegensatz zu MK-2206 keine Auswirkung auf proliferierende Zellen zeigt.

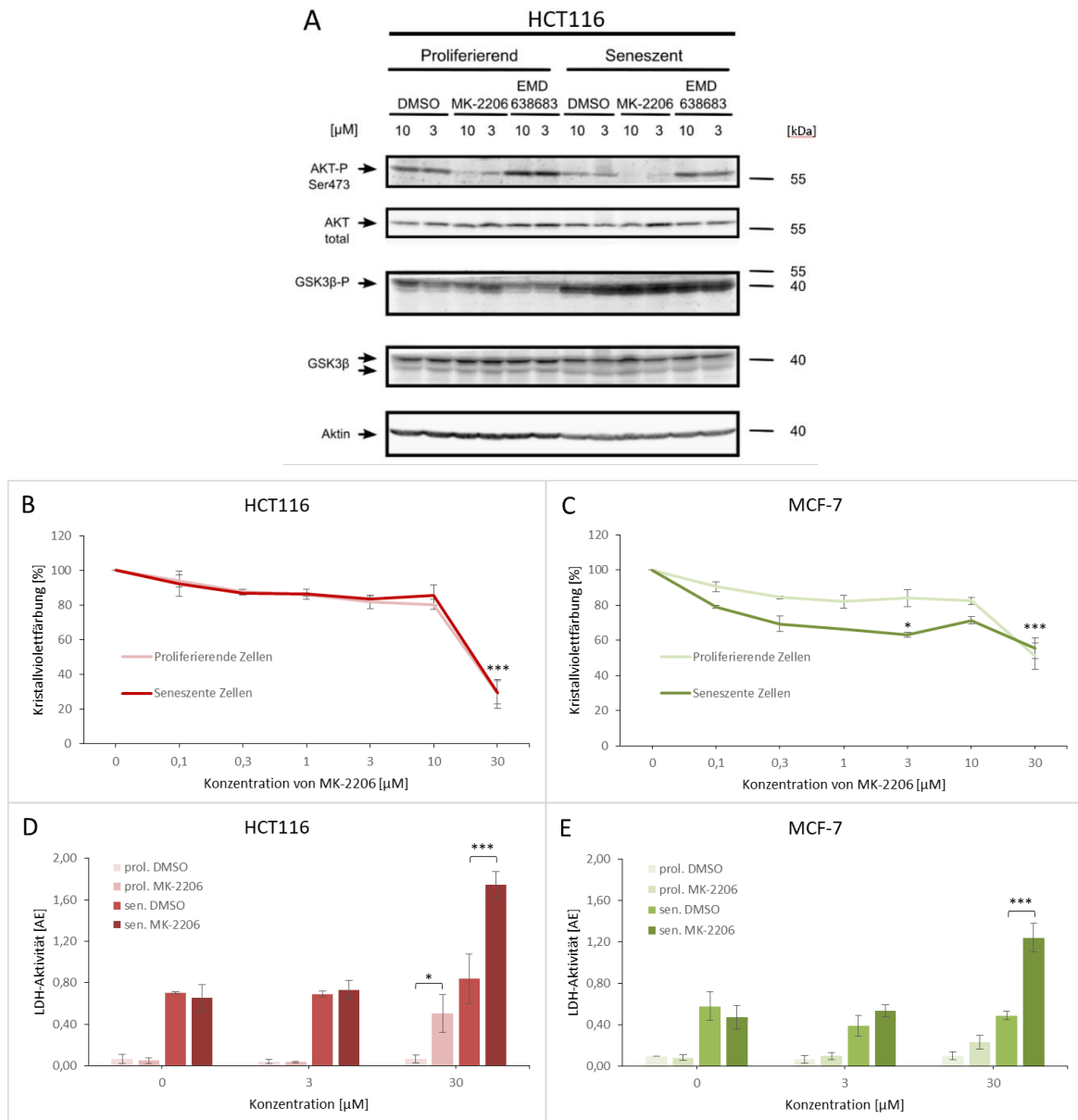


Abb. 11: Der AKT-Inhibitor MK-2206 erzielt keinen senolytischen Effekt. Die Wirksamkeit von MK-2206 wurde durch Reduktion der detektierten Proteinmenge an AKT-P nachgewiesen (A). Die Wirksamkeit des SGK1 Inhibitors EMD 638683 wurde durch Reduktion der Proteinmenge an GSK3β-P gezeigt (A). Da die Phosphorylierung der GSK3β nicht nur durch SGK1, sondern auch durch AKT erreicht wird (Pap & Cooper, 1998), ist lediglich eine geringe Reduktion der Proteinmenge an GSK3β-P zu erkennen. Zudem ist hierdurch die Reduktion von GSK3β-P durch 10 μM MK2206 zu erklären. MK-2206 inhibiert AKT, was zu einer geringeren Phosphorylierung der GSK3β führt. Senescente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit MK-2206 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (B, C) und LDH-Zytotoxizitätstest (D, E) quantifiziert. Im Kristallviolett-Test ergibt sich in HCT116 Zellen kein Unterschied zwischen sen. und prol. Zellen (B). In einer Konzentration von 30 μM kommt es zu einer Reduktion beider Zellzahlen. Im LDH-Test lässt sich dies als Zelltodinduktion verifizieren (D). In MCF-7 Zellen führt MK-2206 zu einer stärkeren Reduktion der Zahl seneszenter als proliferierender Zellen (C). Durch Detektion der extrazellulären LDH-Aktivität kann gezeigt werden, dass MK-2206 in hohen Konzentration hier senolytisch wirkt (E). Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente und kann repräsentierend auch für MCF-7 Zellen gesehen werden. Die gezeigten Daten der Zytotoxizitätsteste sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die in den Kristallviolett-Testen dargestellten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in proliferierenden bzw. seneszenten Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μM. *p < 0,05, ***p < 0,001

EMD 638683 als SGK1-Inhibitor führt zu einer Reduktion der Phosphorylierung von GSK3 β , da GSK3 β ein Zielprotein der SGK1 und damit des PI3K-Signalwegs darstellt (Xiaobo et al., 2016). Die Reduktion der Menge an phosphorylierter GSK3 β ist in proliferierenden und seneszenten Zellen erkennbar, aber in proliferierenden ausgeprägter (Abb. 11A). Im Kristallviolett-Test ließ sich in keiner der verwendeten Konzentrationen eine ausgeprägte Reduktion der lebenden proliferierenden oder seneszenten Zellen erkennen (Abb. 12A und 12B). Im LDH-Zytotoxizitätstest zeigte der Inhibitor lediglich ähnliche LDH-Aktivitäten wie DMSO in den proliferierenden bzw. seneszenten Zellen (Abb. 12C und 12D). Die Inhibition der SGK1 erzielt damit keine senolytische Wirkung.

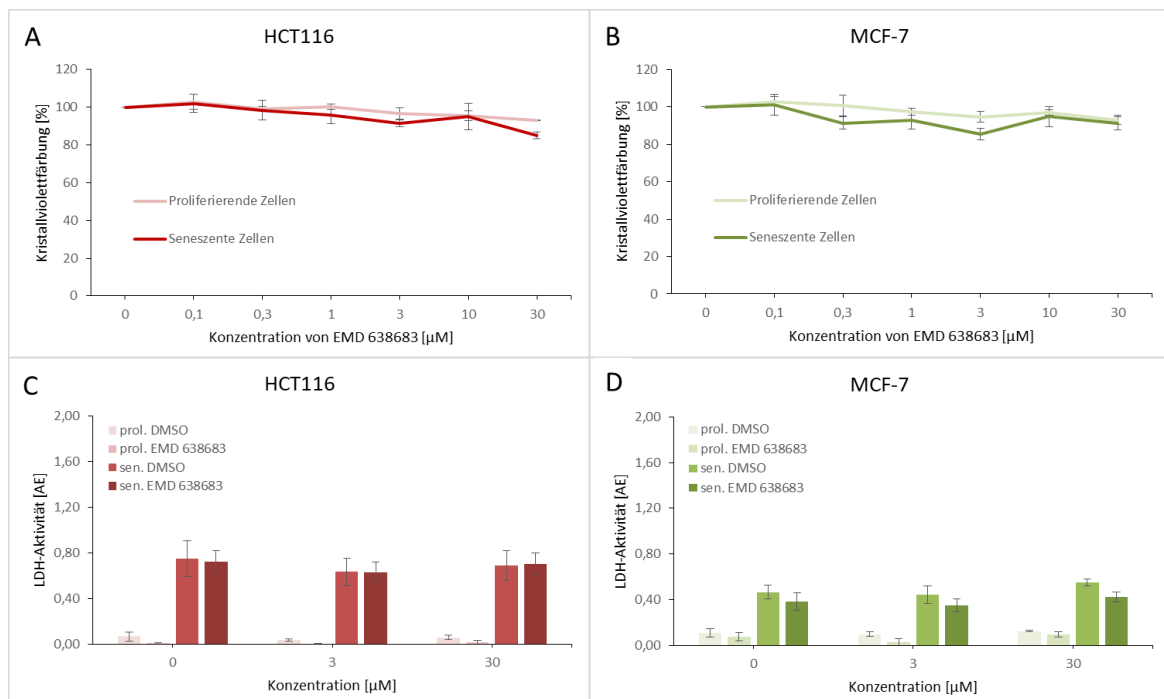


Abb. 12: Der SGK1-Inhibitor EMD 638683 wirkt nicht senolytisch. Seneszenz und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit EMD 638683 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest ist in beiden Zelllinien sowohl in seneszenten als auch in proliferierenden Zellen keine signifikante Zellzahlreduktion zu erkennen (A, B). Passend hierzu zeigt sich im LDH-Zytotoxizitätstest in den verwendeten Konzentrationen kein Anstieg der gemessenen LDH-Aktivität nach Inkubation mit EMD 638683 im Vergleich zu DMSO (C, D). Die gezeigten Daten der Zytotoxizitätsteste sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Wirksamkeit des PDK1-Inhibitors BX-795 konnte durch Reduktion von phosphoryliertem RSK gezeigt werden (Abb. 13A). Die Aktivierung von RSK ist komplex und wird über die Phosphorylierung an vier verschiedenen Stellen gesteuert. Neben der Phosphorylierungen durch die Kinasen ERK und CTK wird zusätzlich eine Phosphorylierung an Position Ser227 durch PDK1 zur vollständigen Aktivierung benötigt (Jensen et al., 1999).

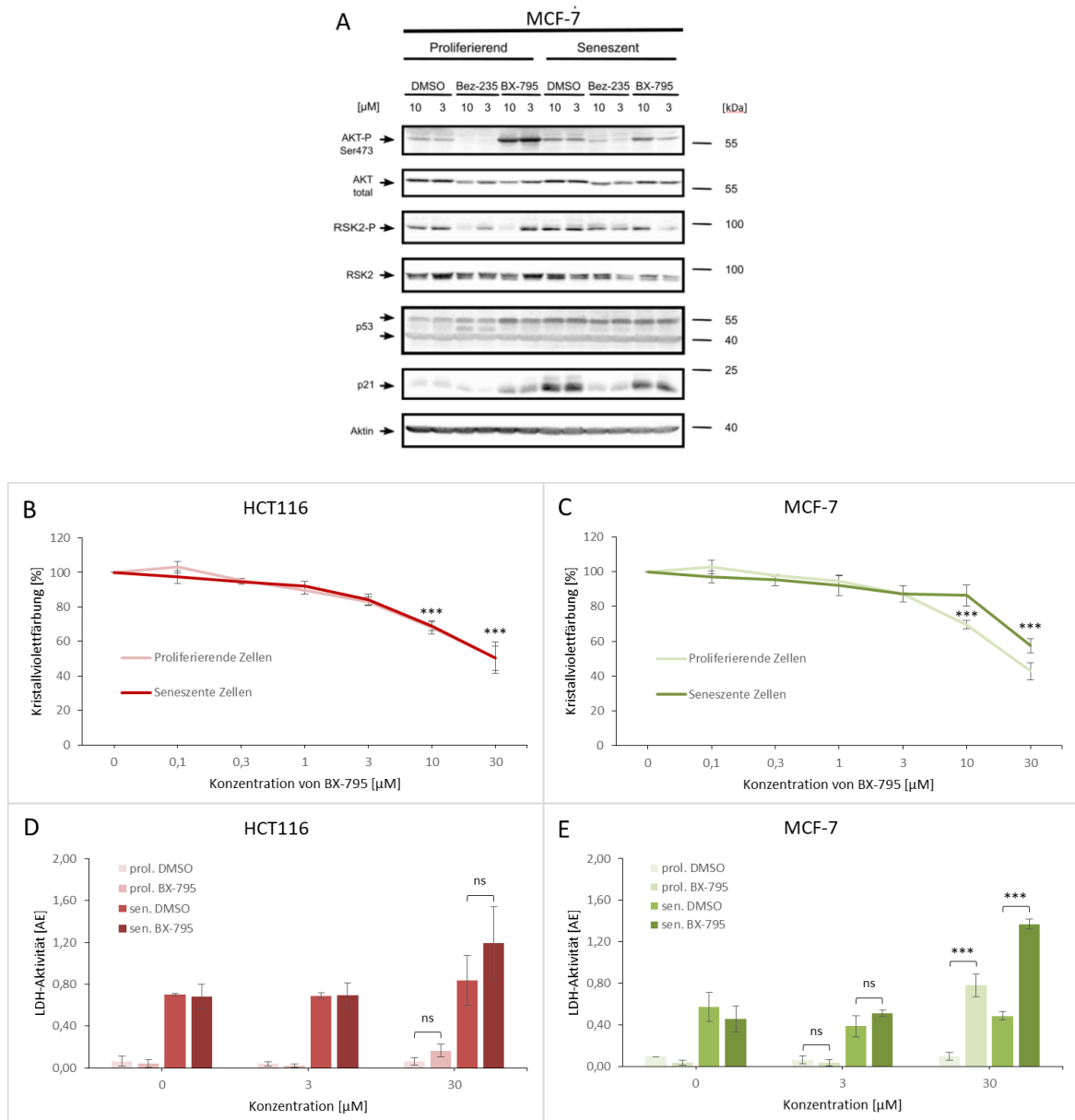


Abb. 13: Der PDK1-Inhibitor BX-795 wirkt nicht senolytisch. Die Wirksamkeit von BX-795 wurde durch Reduktion der Proteinmenge an phosphoryliertem RSK nachgewiesen (A). Die detektierte Menge an RSK-P wird ebenfalls durch den panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BEZ-235 reduziert. Dies ist dadurch zu erklären, dass eine PI3K-Inhibition zu einer Reduktion aktivierter PDK1 und somit einer Reduktion von RSK-P führt. Gleichzeitig wurde bereits die Wirksamkeit von BEZ-235 durch Reduktion der Proteinmenge an AKT-P nachgewiesen. Sen. und prol. HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit BX-795 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (B, C) und LDH-Zytotoxizitätstest (D, E) quantifiziert. Im Kristallviolett-Test zeigt sich kein Unterschied zwischen sen. und prol. HCT116 Zellen (B). In hohen Konzentrationen nimmt die Zahl beider Zellen ab, was im LDH-Test als Anstieg der LDH-Aktivität in beiden Zellen verifiziert werden kann (D). In MCF-7 Zellen kann im Kristallviolett-Test in hohen Konzentrationen sogar eine deutlichere Zellzahlreduktion der prol. Zellen detektiert werden (C). Dies lässt sich ebenfalls im LDH-Test durch Anstieg der LDH-Aktivität als Zelltod bestätigen (E). BX-795 wirkt somit in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf sen. und prol. Zellen. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente und kann repräsentierend auch für HCT116 Zellen gesehen werden. Die gezeigten Daten der Zytotoxizitätsteste sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die in den Kristallviolett-Testen dargestellten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in prol. bzw. sen. Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μ M. ns nicht signifikant, *** $p < 0,001$.

Beim PDK1-Inhibitor BX-795 konnte im Kristallviolett-Test kein signifikanter Unterschied in der Zahl der überlebenden HCT116-Zellen zwischen proliferierenden und seneszenten Zellen verzeichnet werden (Abb. 13B). Die gemessene LDH-Aktivität konnte das Ergebnis des Kristallviolett-Tests verifizieren. Bei 3 μM Konzentration lässt sich sowohl in seneszenten als auch proliferierenden Zellen kein signifikanter Unterschied in der gemessenen LDH-Aktivität nach Stimulation mit BX-795 im Vergleich zu DMSO erkennen. Bei 30 μM Konzentration hingegen steigt die gemessene LDH-Aktivität sowohl in proliferierenden als auch in seneszenten Zellen zwar geringfügig gegenüber der nach Stimulation mit DMSO gemessenen Aktivität an. Dieser Unterschied ist allerdings auch nicht signifikant (Abb. 13D). Bezüglich der MCF-7 Zellen sind im Kristallviolett-Test ähnliche Ergebnisse wie bei den HCT116-Zellen zu sehen. In hohen Konzentrationen findet sich sowohl eine signifikante Zellzahlreduktion in proliferierenden als auch in seneszenten Zellen (Abb. 13 C). Im LDH-Zytotoxizitätstest ist bei 30 μM ein deutlicher zytotoxischer Effekt von BX-795 zu sehen. Dieser ist verhältnismäßig in den proliferierenden Zellen sogar ausgeprägter als in den seneszenten Zellen (Abb. 13 E). BX-795 wirkt somit in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf seneszente und proliferierende MCF-7 Zellen und zeigt in geringen Konzentrationen sowie in HCT116-Zellen keinen nennenswerten Effekt.

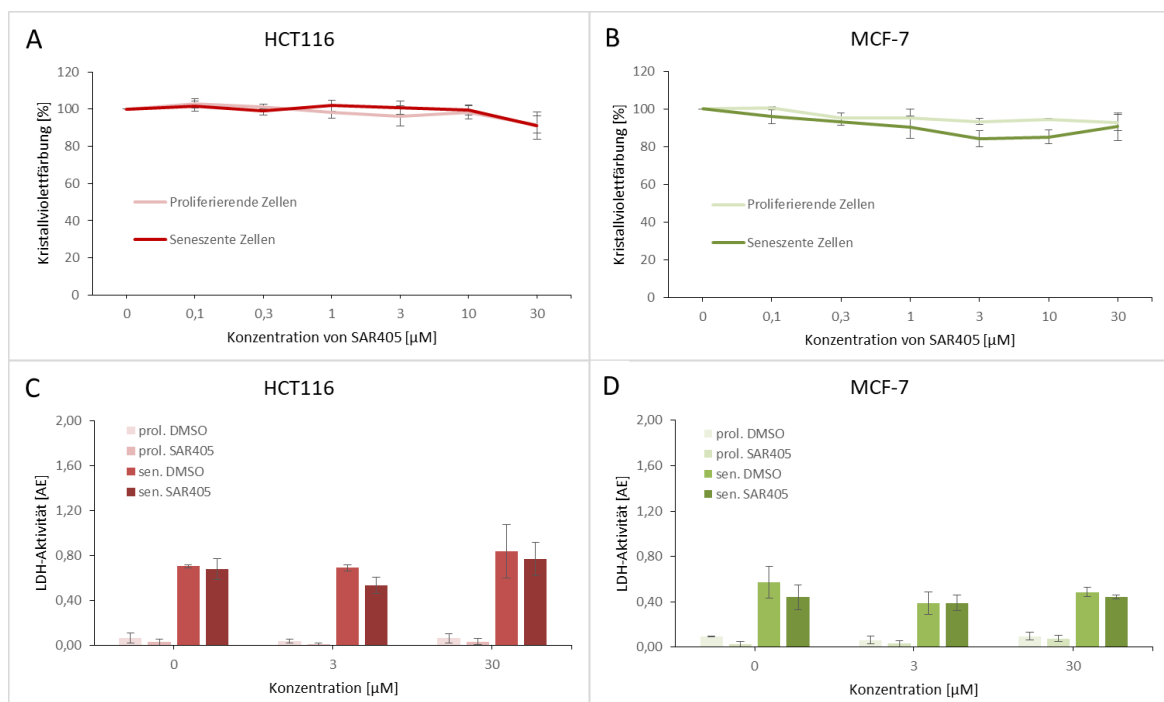


Abb. 14: Der PI3K-Klasse-III-, Vps34, Inhibitor SAR405 wirkt nicht senolytisch. Seneszente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit SAR405 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Im Kristallviolett-Test ist in beiden Zelllinien keine relevante Reduktion vitaler Zellen zu messen (A, B). Dies lässt sich durch den LDH-Zytotoxizitätstest verifizieren. In diesem kommt es zu keinem Anstieg der extrazellulär gemessenen LDH-Aktivität im Vergleich zu DMSO (C, D). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach der Inkubation mit SAR405 als PI3K-Klasse-III-, Vps34, Inhibitor ließ sich im Kristallviolett-Test in keiner der verwendeten Konzentrationen eine signifikante Reduktion der lebenden proliferierenden oder seneszenten Zellen erkennen (Abb. 14A und 14B). Im LDH-Zytotoxizitätstest zeigten sich nach Verwendung des Inhibitors lediglich ähnliche LDH-Aktivitäten wie DMSO ohne signifikanten Unterschied in den jeweils proliferierenden bzw. seneszenten Zellen (Abb. 14C und 14D). Die Inhibition der PI3K-Klasse-III mittels des Autophagieinhibitors SAR405 erzielt damit keine senolytische Wirkung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der verwendeten Inhibitoren von den PI3K-Effektorkinasen die senolytische Wirkung von PX-866 replizieren kann.

3.3.2 Pan-PI3K Inhibition ist für eine senolytische Wirkung entscheidend

Neben Inhibitoren der einzelnen Effektorkinasen des PI3K-Signalwegs wurden sowohl weitere panPI3K-Klasse-I-Inhibitoren, als auch Inhibitoren der einzelnen Isoformen verwendet, um zu testen, ob die senolytische Wirkung von PX-866 auf panPI3K-Klasse-I-Inhibition zurückzuführen ist. So wurden BAY80-6946 und BEZ-235 als weitere panPI3K-Inhibitoren verwendet (Liu et al., 2013; Maira et al., 2008). Byl-719 diene als beispielhafter PI3K α - und CAL-101 als PI3K δ -Inhibitor (Furet et al., 2013; Lannutti et al., 2011).

Auch bei diesen Inhibitoren wurde die Wirksamkeit vor Einsatz in den Zytotoxizitätstests mittels Western Blot überprüft. Mittel der Wahl war der Nachweis der Reduktion der Phosphorylierung von AKT, welches als ein Substrat des PI3K-Signalwegs fungiert (Di Cristofano, 2017). Nach Inhibition mittels BAY80-6946 oder Byl-719 konnte sowohl in seneszenten als auch in proliferierenden Zellen kaum phosphoryliertes AKT mehr nachgewiesen werden. PX-866 zeigte sich leicht weniger effektiv, sodass zwar eine deutliche Reduktion im Vergleich zu DMSO aber kein vollständiges Fehlen von AKT-P zu verzeichnen war. Bezüglich des δ -Isoform spezifischen Inhibitors CAL-101 ließ sich ebenfalls eine Reduktion der AKT-Phosphorylierung erkennen, welche allerdings schwächer ausgeprägt war (Abb. 15). Die Wirksamkeit von BEZ-235 konnte ebenfalls über die deutliche Reduktion der Menge an phosphoryliertem AKT in proliferierenden und seneszenten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13A).

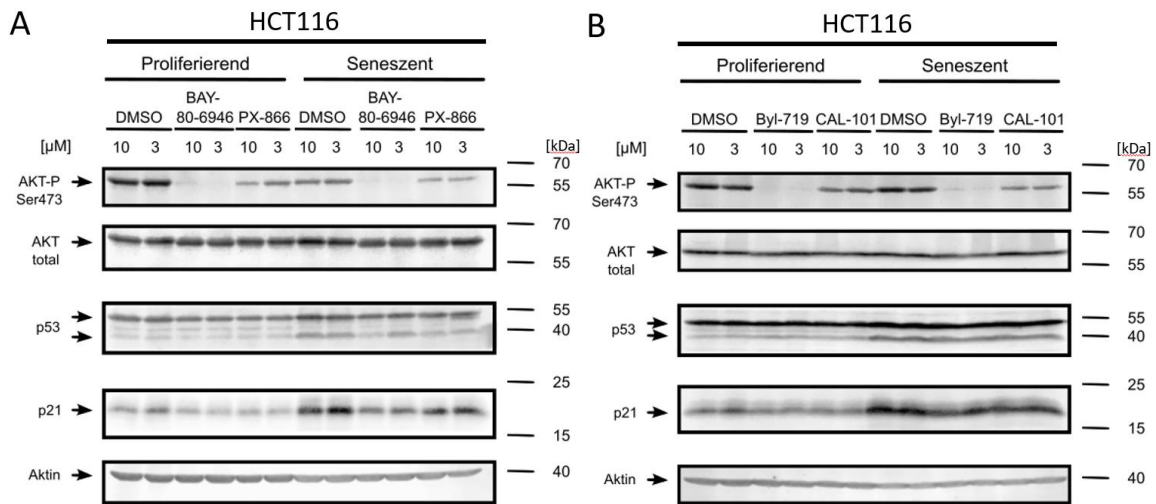


Abb. 15: PI3K Inhibitoren reduzieren die nachgewiesene Menge von AKT-P. Seneszenz und proliferierende HCT116 Zellen wurden mit den verschiedenen PI3K-Inhibitoren für 24 h inkubiert. Anschließend konnte die Wirksamkeit der Inhibitoren im Western Blot durch Reduktion der detektierten Proteinmenge an phosphoryliertem AKT nachgewiesen werden. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente und können repräsentierend für MCF-7 Zellen gesehen werden.

Zur Analyse der senolytischen Aktivität wurden seneszenz- und proliferierende Zellen in einer Konzentrationsreihe mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt, um anschließend den induzierten Zelltod zu quantifizieren.

Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest konnte nach der Verwendung des panPI3K-Inhibitors BAY80-6946 in beiden verwendeten Zelllinien eine Reduktion der Anzahl lebender Zellen sowohl in proliferierenden als auch in seneszenten Zellen gezeigt werden, wenn auch nur in seneszenten Zellen die Reduktion signifikant ist. In proliferierenden Zellen lässt sich lediglich eine Tendenz ableiten. So zeigte sich z. B. nach Einsatz von 10 µM Konzentration in seneszenten als auch in proliferierenden HCT-116 eine annähernd gleich ausgeprägte Zellzahlreduktion. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich in den MCF-7 Zellen erkennen (Abb. 16A und 16B). Beim Vergleich dieser Daten mit denen des LDH-Zytotoxizitätstest fällt allerdings auf, dass sowohl in HCT116-Zellen als auch in MCF-7 Zellen sehr wohl ein Unterschied in der gemessenen LDH-Aktivität zwischen seneszenten und proliferierenden Zellen besteht (Abb. 16C und 16D). Die gemessene LDH-Aktivität und somit der induzierte Zelltod ist bei seneszenten Zellen deutlich ausgeprägter, wohingegen in proliferierenden Zellen kaum LDH und somit Zelltod detektiert werden kann. BAY80-6946 führt in der Kristallviolettffärbung also zu einer reduzierten Zahl detektierter vitaler sowohl proliferierender als auch seneszenten Zellen, wohingegen sich im LDH-Zytotoxizitätstest lediglich ein gesteigerter Zelltod in seneszenten Zellen messen lässt. Dies ist ähnlich zu den von PX-866 erzielten Ergebnissen, welches ebenfalls bei proliferierenden und seneszenten Zellen eine Zellzahlreduktion im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest auslöst, ohne

dass ein erhöhter Zelltod der proliferierenden Zellen im LDH-Zytotoxizitätstest verifiziert werden kann (Kap. 3.1). Es ist davon auszugehen, dass die durch BAY80-6946 erzielte Zellzahlreduktion im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest ähnlich wie bei PX-866 auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist, da bekannt ist, dass PI3K-Inhibition zu weniger Zellproliferation führt (Courtney et al., 2010). Im LDH-Zytotoxizitätstest kann also eine senolytische Wirkung von BAY80-6946 verifiziert werden, sowohl durch den Unterschied in der LDH-Aktivität zwischen den behandelten seneszenten und proliferierenden Zellen als auch durch den Unterschied zwischen den mit DMSO und BAY80-6946 versetzten seneszenten Zellen. BAY80-6946 wirkt damit wie PX-866 senolytisch.

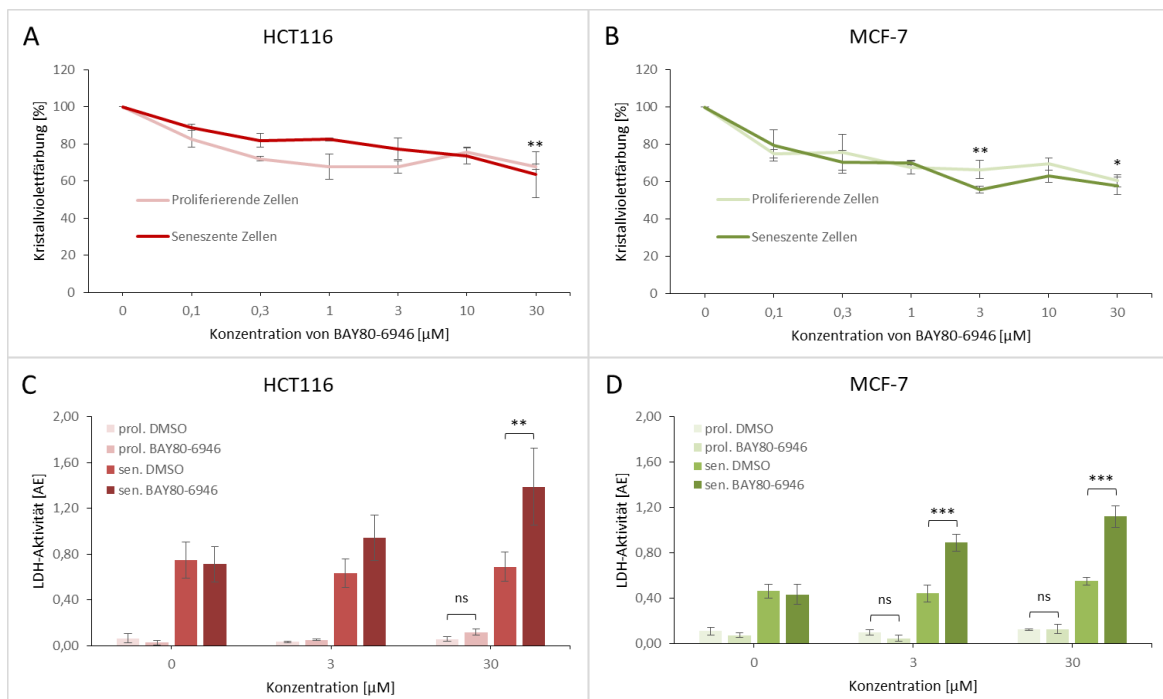


Abb. 16: Der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BAY80-6946 wirkt senolytisch. Senescente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit dem panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BAY80-6946 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Während im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest in beiden Zelllinien eine Zellzahlreduktion in seneszenten und proliferierenden Zellen gemessen wird, kann im LDH-Zytotoxizitätstest lediglich in seneszenten Zellen ein deutlicher Anstieg der extrazellulär gemessenen LDH-Aktivität nach Inkubation mit BAY80-6946 im Vergleich zu DMSO gemessen werden. BAY80-6946 löst somit lediglich in seneszenten Zellen Zelltod aus und wirkt senolytisch. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Wenn nicht anders dargestellt, beziehen sich die mit Sternchen dargestellten Signifikanzen in den Kristallviolett-Testen jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in seneszenten Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μ M. ns nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

BEZ-235 wurde als weiterer panPI3K-Inhibitor hinzugezogen. Dessen Einsatz erreichte ebenfalls im Kristallviolett-Test sowohl bei seneszenten als auch bei proliferierenden Zellen eine Zellzahlreduktion (Abb. 17A und 17B). Mit Hilfe des LDH-Zytotoxizitätstests kann allerdings auch hier wie bei der Verwendung von BAY80-6946 gezeigt werden, dass die

reduzierte detektierte Zellzahl in der Kristallviolett-Färbung bei den proliferierenden Zellen nicht auf induzierten Zelltod zurückgeführt werden kann. Die gemessene LDH-Aktivität bei 3 μM Konzentration von BEZ-235 ist in proliferierenden MCF-7 Zellen annähernd gleich der nach Einsatz der Lösungsmittelkontrolle gemessenen Aktivität. Im Gegensatz hierzu ist in seneszenten HCT116- und MCF-7 Zellen ein signifikanter bzw. hoch signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität nach Einsatz von 3 μM BEZ-235 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO zu messen (Abb. 17C und 17D). BEZ-235 wirkt somit ebenfalls senolytisch.

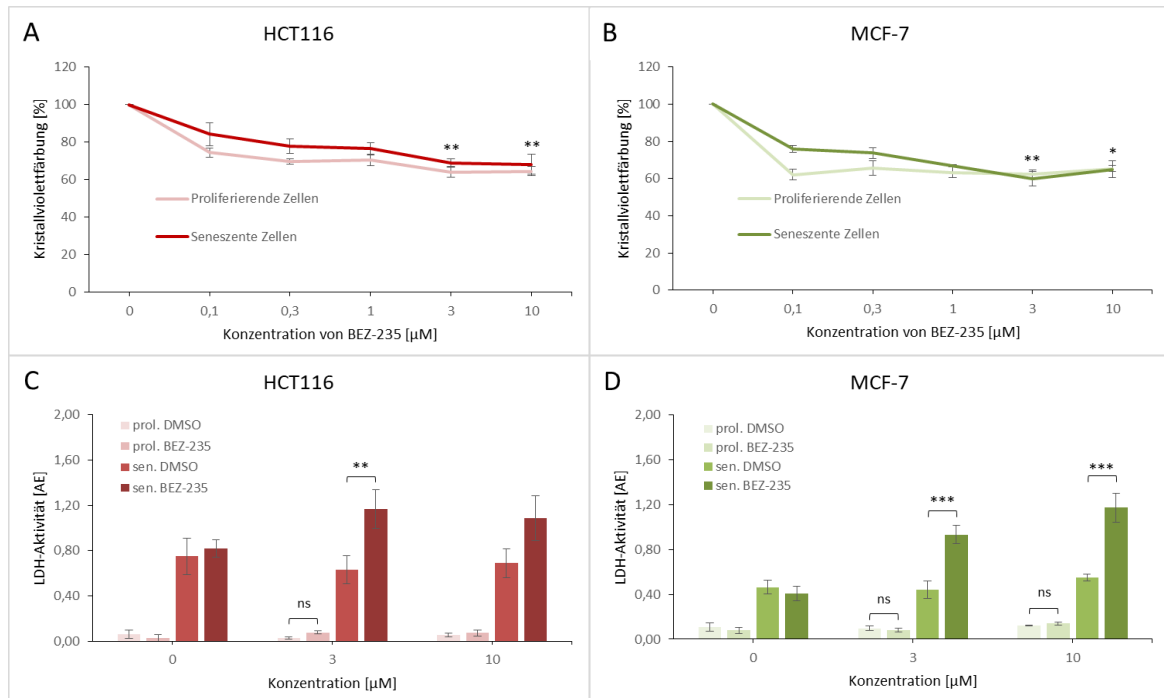


Abb. 17: Der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BEZ-235 wirkt senolytisch. Senescente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit dem panPI3K-Klasse-I-Inhibitor BEZ-235 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Da BEZ-235 in hohen Konzentrationen (30 μM) präzipitierte, wurde auf eine Messung in diesem Konzentrationsbereich verzichtet. Während im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest in beiden Zelllinien eine Zellzahreduktion in seneszenten und proliferierenden Zellen gemessen wird, kann im LDH-Zytotoxizitätstest lediglich in seneszenten Zellen ein deutlicher Anstieg der extrazellulär gemessenen LDH-Aktivität nach Inkubation mit BEZ-235 im Vergleich zu DMSO gemessen werden. BEZ-235 löst somit lediglich in seneszenten Zellen Zelltod aus und wirkt senolytisch. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Wenn nicht anders dargestellt, beziehen sich die mit Sternchen dargestellten Signifikanzen in den Kristallviolett-Testen jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in seneszenten Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μM . ns nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Byl-719 als PI3K α -Inhibitor lässt im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest ein ähnliches Ergebnis verzeichnen. In HCT116 Zellen führt sein Einsatz zu einer Reduktion der Zellzahl von seneszenten als auch proliferierenden Zellen in gleichem Ausmaß (Abb. 18A). Lediglich in MCF-7 wird eine geringfügig höhere Zellzahreduktion in den seneszenten Zellen als in den proliferierenden Zellen ausgelöst (Abb. 18B). Ähnlich wie bei BAY80-6946 kann aber auch bei Byl-719 die im Kristallviolett-Test bei den proliferierenden Zellen verzeichnete

Zellzahlreduktion nicht auf induzierten Zelltod zurückgeführt werden. Im LDH-Zytotoxizitätstest zeigt sich hingegen lediglich in den seneszenten Zellen eine im Vergleich zu DMSO signifikant ansteigende LDH-Aktivität (Abb. 18C und 18D).

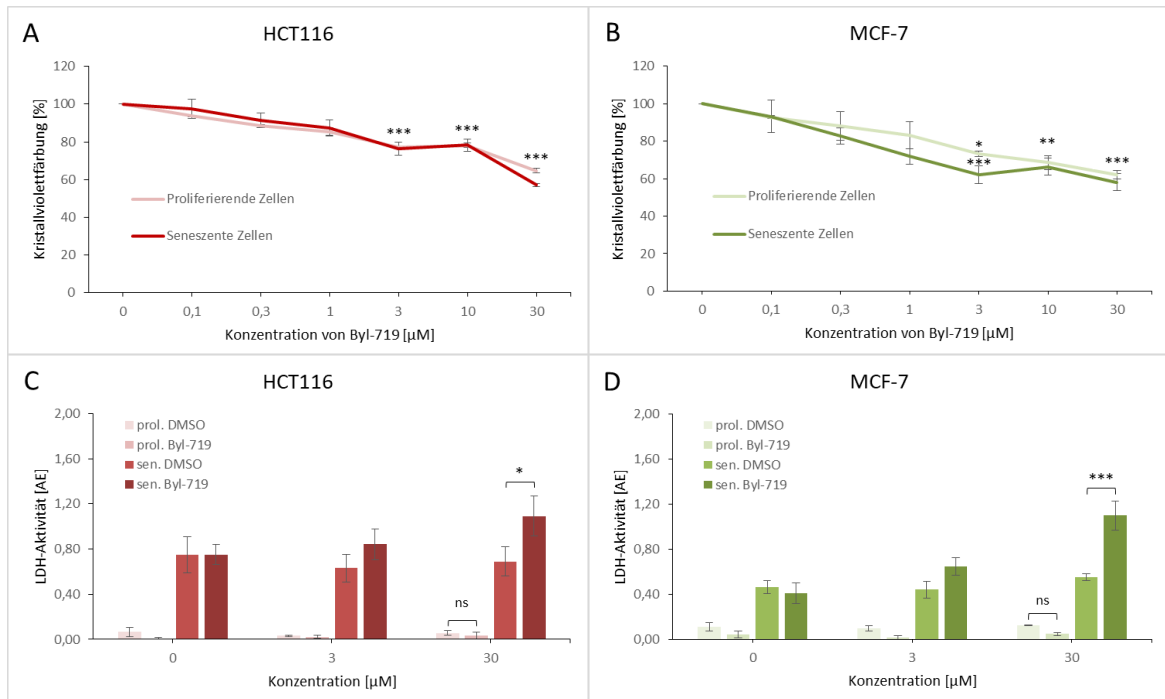


Abb. 18: Der PI3K- α Inhibitor Byl-719 wirkt senolytisch. Senescente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit dem Isoform-spezifischen PI3K- α Inhibitor Byl-719 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Während im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest in beiden Zelllinien eine Zellzahlreduktion in seneszenten und proliferierenden Zellen gemessen wird, kann im LDH-Zytotoxizitätstest lediglich in seneszenten Zellen ein deutlicher Anstieg der extrazellulär gemessenen LDH-Aktivität nach Inkubation mit Byl-719 im Vergleich zu DMSO gemessen werden. Byl-719 löst somit lediglich in seneszenten Zellen Zelltod aus und wirkt senolytisch. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Wenn nicht anders dargestellt, beziehen sich die mit Sternchen dargestellten Signifikanzen in den Kristallviolett-Testen jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in seneszenten bzw. proliferierenden Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μ M. ns nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Somit wirkt auch Byl-719 senolytisch, wenn auch in geringerer Weise als BAY80-6946 wie der Vergleich der LDH-Aktivität nach Einsatz der Inhibitoren in jeweils 3 μ M Konzentration zeigt. Byl-719 führt im Vergleich zu DMSO lediglich zu einer schwächeren Steigerung der LDH-Aktivität als BAY80-6946 (Abb. 16C, 16D, 18C und 18D). Die isolierte Inhibition der PI3K α -Isoform zeigt also einen senolytischen Effekt, wenn auch nicht in gleich hohem Ausmaß wie die panPI3K-Klasse-I-Inhibition.

Der Einsatz des PI3K δ -Inhibitor CAL-101 erreicht von den insgesamt vier verwendeten PI3K-Inhibitoren die geringste Zellzahlreduktion im Kristallviolett-Test (Abb. 19A und 19B). Im LDH-Zytotoxizitätstest konnte kein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität in

seneszenten Zellen im Vergleich zu DMSO detektiert werden (Abb. 19C und 19D). CAL-101 zeigt somit keine senolytische Wirkung.

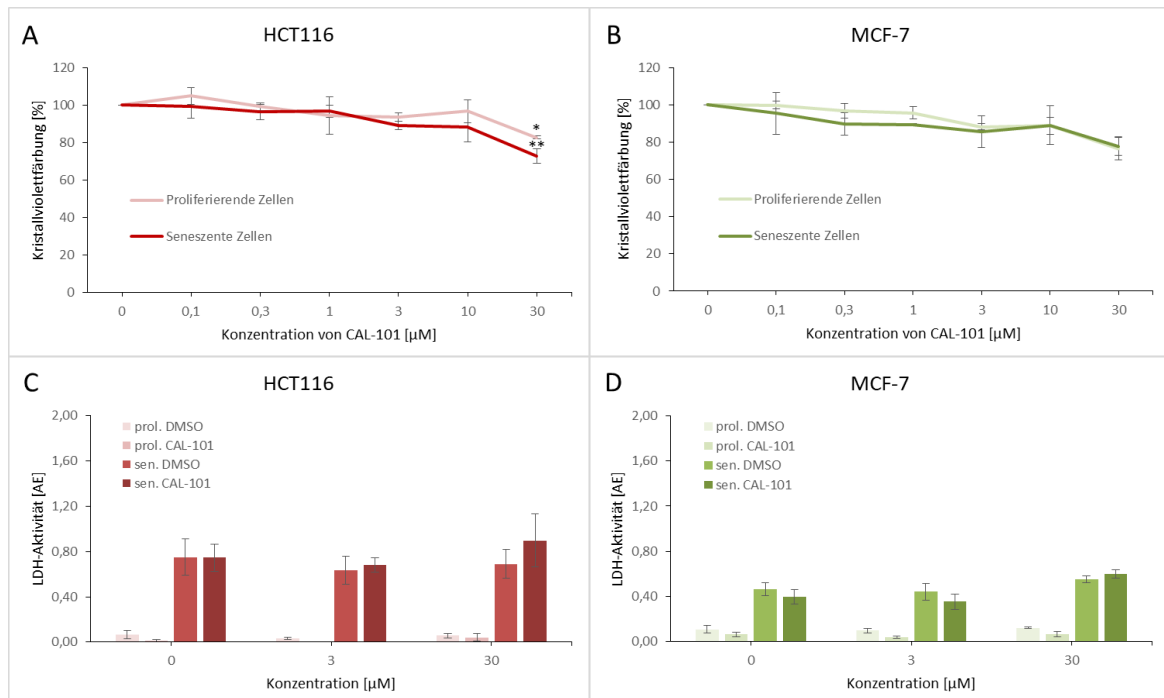


Abb. 19: Der PI3K- δ Inhibitor CAL-101 zeigt keine senolytische Wirkung. Seneszenzte und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit dem Isoform-spezifischen PI3K- δ Inhibitor CAL-101 inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest kann lediglich eine geringfügige Zellzahlreduktion in seneszenten und proliferierenden Zellen gemessen werden. Im LDH-Zytotoxizitätstest zeigt sich kein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität in seneszenten Zellen nach Inkubation mit CAL-101 im Vergleich zu DMSO. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Wenn nicht anders dargestellt, beziehen sich die mit Sternchen dargestellten Signifikanzen in den Kristallviolett-Testen jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in seneszenten bzw. proliferierenden Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μM . *p < 0,05, **p < 0,01.

3.3.3 Die gleichzeitige Inhibition der alpha und delta Isoform ist für die senolytische Wirkung ausreichend

Da bisher die größte senolytische Wirkung durch panPI3K-Klasse-I-Inhibition erreicht werden konnte, wurde versucht diesen Effekt durch die Kombination eines PI3K α -Inhibitors mit einem PI3K δ -Inhibitor zu replizieren. Hierfür wurde der PI3K α -Inhibitor Byl-719 in einer Konzentrationsreihe wie zuvor titriert. Der PI3K δ -Inhibitor CAL-101 wurde in 10 μM Konzentration in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte hinzugegeben; außer bei 0 μM , um eine Negativkontrolle zu erhalten.

Im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest führt die Kombination beider Inhibitoren in beiden verwendeten Zelllinien mit steigender Konzentration von Byl-719 zu einer zunehmenden

Zellzahlreduktion sowohl in proliferierenden als auch in seneszenten Zellen (Abb. 20A und 20B). Vergleicht man diese Daten mit denen des LDH-Zytotoxizitätstests zeigt sich, dass bei den proliferierenden Zellen kein Anstieg der LDH-Aktivität verzeichnet wird und somit kein Zelltod stattfindet. Die Zellzahlreduktion im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest ist bei den proliferierenden Zellen also nicht auf Zelltodinduktion zurückzuführen. In den seneszenten Zellen hingegen sieht man einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität sowohl bei HCT116 als auch bei MCF-7 Zellen. Byl-719 bewirkt in 10 μM Konzentration in Kombination mit 10 μM CAL-101 in seneszenten HCT116- und MCF-7 Zellen eine signifikant höhere LDH-Aktivität als DMSO. In 3 μM Konzentration ist ebenfalls eine Tendenz zu erkennen, insbesondere in MCF-7 Zellen. Da dieser Unterschied bei den proliferierenden Zellen nicht zu sehen ist, tötet die Kombination aus Byl-719 und CAL-101 gezielt seneszente Zellen und wirkt somit senolytisch (Abb. 20C und 20D).

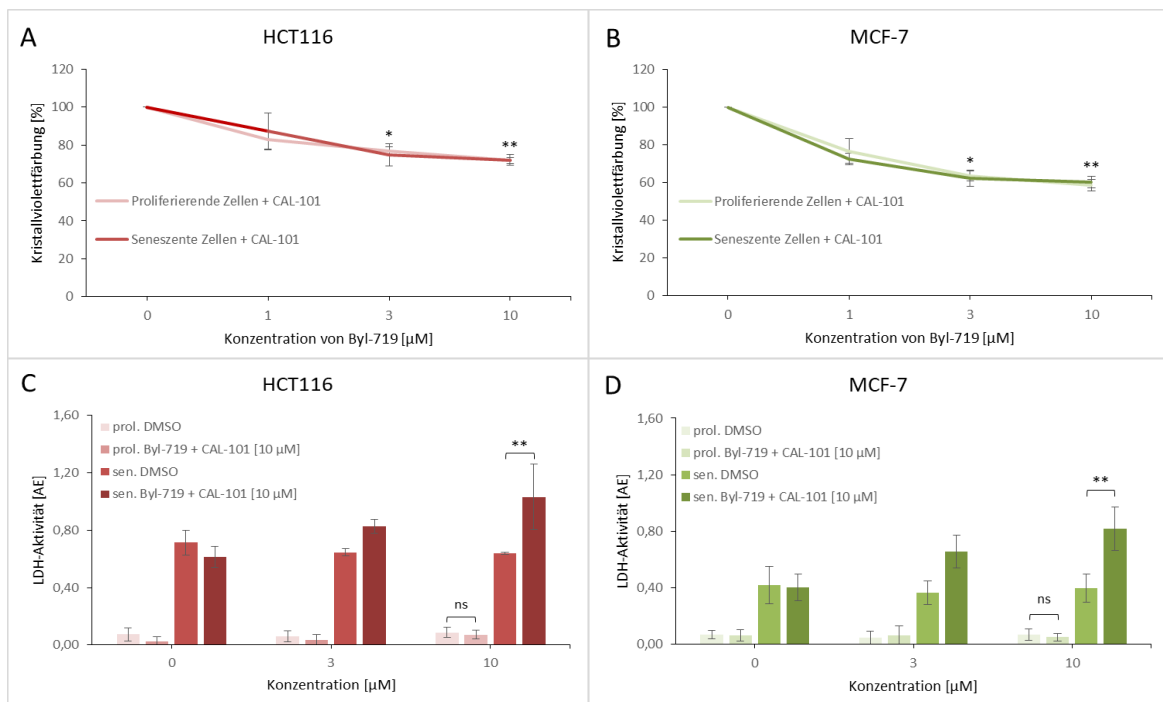


Abb. 20: Die kombinierte Verwendung der beiden Isoform-spezifischen PI3K Inhibitoren, Byl-719 und CAL-101 in 10 μM Konzentration wirkt senolytisch. Seneszente und proliferierende HCT116- und MCF-7 Zellen wurden für 24 h mit den Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren, Byl-719 als PI3K α und CAL-101 als PI3K δ Inhibitor, in Kombination inkubiert. Hierfür wurde zuvor Byl-719 in einer Konzentrationsreihe titriert, wohingegen CAL-101 jeweils in 10 μM Konzentration hinzugefügt wurde. Lediglich bei 0 μM erfolgte keine Hinzugabe eines Inhibitors um eine Negativkontrolle zu erreichen. Anschließend wurde der Zelltod mittels Kristallviolett- (A, B) und LDH-Zytotoxizitätstest (C, D) quantifiziert. Im Kristallviolett-Test ist in beiden Zelllinien eine Reduktion vitaler Zellen sowohl in seneszenten als auch in proliferierenden Zellen zu verzeichnen (A, B). Im LDH-Zytotoxizitätstest hingegen wird lediglich in seneszenten Zellen ein Anstieg der LDH-Aktivität nach Inkubation mit Byl-719 + CAL-101 im Vergleich zu DMSO gemessen. Die kombinierte Verwendung der beiden Isoform-spezifischen Inhibitoren wirkt somit senolytisch. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei (C, D) bzw. fünf (A, B) unabhängigen Experimenten. Die in den Kristallviolett-Testen dargestellten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich der entsprechenden verwendeten Konzentration des Inhibitors in seneszenten Zellen mit der verwendeten Konzentration von 0,1 μM . ns nicht signifikant * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Diese Ergebnisse wurden nun mit der alleinigen Verwendung von Byl-719 und der Verwendung von PX-866 verglichen. In seneszenten HCT116 Zellen ist die Tendenz zu erkennen, dass die kombinierte Inhibition der PI3K α - und PI3K δ -Isoform höhere LDH-Aktivitäten als die alleinige Verwendung des PI3K α -Inhibitors Byl-719 erzielt. Die kombinierte Inhibition mehrerer Isoformen der PI3K wirkt demnach ausgeprägter senolytisch als die alleinige Inhibition der PI3K α -Isoform. In HCT116 Zellen unterscheidet sich der Zelltod nicht signifikant von dem durch den panPI3K-Klasse-I-Inhibitor PX-866 induzierten Zelltod (Abb. 21A). Auch in den seneszenten MCF-7 Zellen lässt sich eine Tendenz in Form einer höheren LDH-Aktivität und somit höherer Zelltodesrate nach kombinierter Inhibition der PI3K α - und PI3K δ -Isoform durch die Inhibitoren Byl-719 und CAL-101 im Vergleich zur alleinigen Inhibition der PI3K α -Isoform erkennen. Allerdings ist in dieser Zelllinie der durch kombinierte Inhibition der PI3K α - und PI3K δ -Isoform induzierte Zelltod sogar tendenziell ausgeprägter als der durch den panPI3K-Inhibitor PX-866 erzielte Zelltod (Abb. 21B).

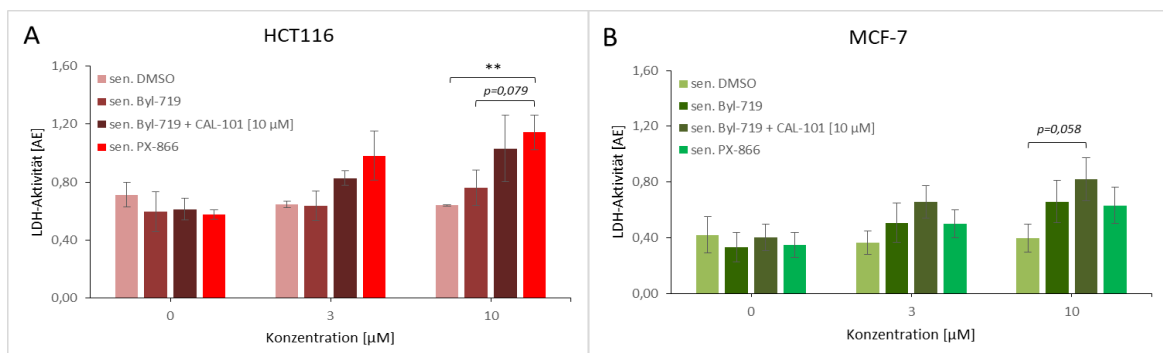


Abb. 21: Byl-719 + CAL-101 induzieren ein größeres Ausmaß an Zelltod als Byl-719 alleine. Senescente HCT116- und MCF-7 Zellen wurden mit dem PI3K α -Inhibitor Byl-719, der Kombination aus Byl-719 und dem PI3K δ -Inhibitor CAL-101 in 10 μ M Konzentration und dem panPI3K-Klasse-I-Inhibitor PX-866 für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod mittels LDH-Zytotoxizitätstest quantifiziert. In beiden Zelllinien führt die kombinierte Verwendung der beiden Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren zu einer höheren extrazellulären LDH-Aktivität als die alleinige Verwendung des PI3K α Inhibitors Byl-719. In MCF-7 Zellen wird sogar eine höhere LDH-Aktivität als durch PX-866 induziert gemessen (B). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. ****p < 0,01.**

Insgesamt lässt sich also zeigen, dass die kombinierte Inhibition mehrerer Isoformen der PI3K Klasse I stärker senolytisch wirkt, als die Inhibition lediglich einer Isoform der PI3K Klasse I.

4 Diskussion

4.1 Das senolytische Potential von PX-866 konnte verifiziert werden

Der panPI3K-Klasse-I-Inhibitor PX-866 als Weiterentwicklung des Pilzmetaboliten Wortmannin (Wipf et al., 2004) ist bereits in verschiedenen klinischen Studien am Menschen erprobt worden (Hong et al., 2012; Jimeno et al., 2015; Pitz et al., 2015). Die bisherige Anwendung beschränkte sich allerdings auf die kombinierte und gleichzeitige Verwendung mit anderen Substanzen wie beispielsweise mit Docetaxel in Patienten mit Rezidiven oder Metastasen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Jimeno et al., 2015). Alternativ konnte sowohl für PX-866 als auch für Wortmannin eine radiosensitivierende Wirkung nachgewiesen werden (Ihle et al., 2004; Price & Youmell, 1996; Rosenzweig et al., 1997). So konnte z. B. gezeigt werden, dass die vorherige Applikation von PX-866 die Wirkung der Bestrahlung in Ovarialkarzinomen verstärkt (Ihle et al., 2004). Was bisher noch nicht weitergehend erforscht worden ist, sind die Auswirkungen der Applikation von PX-866 nach bereits erfolgter Radiatio insbesondere auf die hierdurch entstehenden seneszenten Zellen und damit die Auswirkungen einer möglichen senolytischen Wirkweise von PX-866.

In dieser Arbeit wurde der bereits vorher durch die Arbeitsgruppe vermutete senolytische Effekt von PX-866 in zwei Zelllinien, den HCT116 Kolonkarzinom- sowie den MCF-7 Mammakarzinomzellen bestätigt. Mit Hilfe zweier Zytotoxizitätsteste, dem Kristallviolett- und dem LDH-Zytotoxizitätstest, konnte gezeigt werden, dass spezifisch in seneszenten Zellen Zelltod induziert wird, während sich in proliferierenden Zellen lediglich im Kristallviolett-Zytotoxizitätstest die Anzahl der Zellen verringert, ohne dass eine erhöhte Rate an Zelltod messbar wird (Kap. 3.1). Dies ist am ehesten auf die bereits bekannte zytostatische Wirkung von PX-866 zurückzuführen (Courtney et al., 2010; Howes et al., 2007). Neben der Wirkung auf Zellen, welche wie in dieser Arbeit durch ionisierende Bestrahlung in Seneszenz getrieben wurden, konnte die Arbeitsgruppe in anderen Arbeiten ebenfalls zeigen, dass auch Zellen, welche durch Chemotherapeutika wie z. B. Camptothecin in Seneszenz getrieben wurden, sensibel auf die senolytische Wirkung von PX-866 sind (Neuwahl et al., 2024).

Aufgrund nicht ausreichender Erfolge im Menschen insbesondere in Bezug auf primäre Endpunkte wie beispielsweise progressionsfreies- oder Gesamtüberleben in Phase-II Studien (Jimeno et al., 2015; Pitz et al., 2015) nahm das Interesse an PX-866 in den vergangenen Jahren zunehmend ab. Es erfolgte keine Erprobung in Phase-III Studien. Mit dem Gedanken PX-866 nun nicht als Zytostatikum, sondern lediglich als Senolytikum

einzusetzen, öffnen sich neue Türen für dessen Verwendung. Da in dieser Arbeit der senolytische Effekt nur an zwei Zelllinien, den HCT116 Kolonkarzinom- sowie den MCF-7 Mammakarzinomzellen gezeigt wurde, bleibt zu klären, ob die senolytische Wirkweise auch in anderen Zellen erreicht werden kann.

Diesbezüglich wurde PX-866 in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe auch in Lungenkarzinomzellen A549 auf eine senolytische Wirkweise hin getestet. Hier zeigte sich, dass PX-866 den Zelltod in seneszenten Zellen dieser Zelllinie herbeiführen konnte, allerdings auch proliferierende Zellen eliminiert wurden. In diesem Fall kann es also als hauptsächlich senolytisch angesehen werden, wirkt aber auch zytotoxisch gegenüber proliferierenden A549 Zellen (Neuwahl et al., 2024). Des Weiteren gibt es z. B. eine Studie, die sich mit dem Einsatz von PX-866 in Glioblastomzellen nach erfolgter Behandlung mit Temozolomid beschäftigt hat. Die Applikation von Temozolomid führt in > 80 % der Fälle nicht zu einem zytotoxischen Effekt, sondern zur Induktion eines seneszenten Phänotyps in den behandelten Glioblastomzellen. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die anschließende Applikation von PX-866 diese seneszenten Zellen gezielt über Apoptoseinduktion eliminieren kann, ohne einen Effekt auf proliferierende Zellen zu zeigen. Somit konnte in zwei verschiedenen Glioblastomzelllinien PX-866 ebenfalls ein senolytischer Effekt zugesprochen werden (Beltzig et al., 2022). Dieser Beleg, dass PX-866 nicht nur in den in dieser Arbeit verwendeten Zellen, also humanen Kolon- und Mammakarzinomzellen, als Senolytikum identifiziert werden konnte, sondern auch durch andere Arbeitsgruppen in anderen Zelllinien lässt den Ansatz umso vielversprechender erscheinen.

Bezüglich Glioblastomen findet sich eine weitere Studie, die sich ebenfalls mit dem Einsatz von PX-866 nach vorheriger erfolgter Erstlinientherapie in Form von Bestrahlung und dem Einsatz von Temozolomid beschäftigt hat. In dieser Phase-II Studie konnte der primäre Endpunkt in Form eines therapeutischen Ansprechens auf PX-866 allerdings nicht erreicht werden. Es zeigte sich weder ein signifikanter Anstieg der Patienten mit partiellem Therapieansprechen des Tumors noch der Patienten mit sogenannter *stable disease* (Pitz et al., 2015). In dieser Studie war die Voraussetzung für den Einsatz von PX-866 allerdings, dass zuvor ein Zeitraum von mindestens 28 Tagen ohne erfolgte Therapie durchlaufen worden war. Dies unterscheidet sich sowohl vom Konzept der oben genannten Experimente, in denen PX-866 ein senolytischer Effekt in Glioblastomzellen nachgewiesen werden konnte, als auch vom Konzept dieser Arbeit. Um den senolytischen Effekt nachzuweisen, erfolgt die Behandlung mit PX-866 zeitnah nach zuvor stattgefundenener Strahlen-/Chemotherapie. Es ist also denkbar, dass sich PX-866 in der Phase-II Studie als nicht so erfolgreich zeigte, weil nicht auf einen senolytischen Effekt, sondern lediglich

zytotoxischen Effekt hin getestet wurde. Interessant wäre hier insbesondere die einzelnen Patienten mit unterschiedlichem therapeutischen Ansprechen auf PX-866 im Hinblick auf die nach Strahlen-/Chemotherapie vergangene Zeit genauer zu analysieren, um herauszufinden, ob insbesondere die Patienten, bei welchen ein kürzerer Zeitraum dazwischen lag, ein besseres Therapieansprechen zeigten. Insgesamt weisen diese Studien zusammengenommen darauf hin, dass PX-866 auch in anderen Zellen eine senolytische Wirkung zeigt, so lange kein zu großer Zeitraum zwischen der Seneszenz-induzierenden Therapie und der Applikation des Senolytikums liegt.

4.1.1 Der senolytische Effekt von PX-866 beschränkt sich auf maligne Zellen

Neben der Erprobung von PX-866 als Senolytikum an verschiedenen malignen Zelllinien, ist insbesondere auch die Erprobung an seneszenten Fibroblasten interessant, um das bei einer Radiatio mit bestrahlte, den Tumor umgebende Gewebe, abzubilden. Schließlich sind nicht nur seneszente maligne Zellen, sondern auch benigne Zellen, die in die Seneszenz getrieben worden sind, an den Nachteilen der verschiedenen auf DNA-Schädigung beruhenden onkologischen Therapien beteiligt (Kap. 1.3). Hier ist beispielsweise die Lungenfibrose nach Strahlentherapie zu nennen (Pan et al., 2017). Diese beruht auf einem überschießenden Wachstum der im Rahmen der Therapie mitbestrahlten umgebenden Fibroblasten, welches durch die im Sekretom enthaltenen proinflammatorischen und profibrotischen Zytokine ausgelöst wird (Beach et al., 2017; Nguyen et al., 2018).

Hierfür untersuchte die Arbeitsgruppe primäre immortalisierte BJ/hTERT-Fibroblasten- und RPE-340/hTERT-Epithelzelllinien (Neuwahl et al., 2024). Diese werden aufgrund der konstitutiven hTERT-Expression nicht replikativ seneszent, können allerdings durch DNA-Schäden in den seneszenten Status getrieben werden (Gorbunova et al., 2002; Rodier et al., 2009). Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit analysierten beiden Tumorzelllinien, zeigten sich sowohl proliferierende als auch seneszente Fibroblasten in allen getesteten Konzentrationen resistent gegenüber dem Einfluss von PX-866 (Neuwahl et al., 2024). PX-866 zeigt bisher also lediglich einen senolytischen Effekt in malignen Zellen. Neben dem Nachteil, dass somit durch die Tumorthherapie in die Seneszenz getriebene benigne Zellen, nicht durch PX-866 eliminiert werden können, ergibt sich hieraus allerdings auch ein Vorteil für eine potentielle *in vivo* Anwendung. Durch eine Therapie mit PX-866 würden nur maligne Zellen attackiert werden, während körpereigenes benignes Gewebe unbeeinträchtigt bleiben würde, was die Nebenwirkungen einer senolytischen Therapie mittels PX-866 reduzieren könnte.

4.2 PX-866 führt über p21 Reduktion zur Apoptose seneszenten Zellen

In dieser Arbeit sollte nun analysiert werden, welche molekularen Signaltransduktionswege für die senolytische Wirkung von PX-866 verantwortlich sind. Denkbar waren sowohl *off target* Effekte sowie die direkte Interaktion mit dem PI3K-Signalweg. Es ist bekannt, dass bei Seneszenzinduktion eine Hochregulation des PI3K-Signalweges stattfindet (Wörthmüller et al., 2023). Daraus resultierend ergibt sich der Gedanke, dass die Inhibition eben jenes Signalweges dazu führen könnte, dass die Seneszenz nicht mehr aufrechterhalten werden kann und die Zellen nach PI3K-Inhibition ein Zelltodprogramm einleiten. Passend dazu konnte in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression von p21 zur Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands erforderlich ist, und dass seneszente Zellen bei fehlender p21 Proteinexpression Apoptose einleiten. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der p21 Proteinexpression nach Behandlung mit PX-866 für den Tod der seneszenten Zellen verantwortlich ist (Neuwahl et al., 2024). Dementsprechend konnte auch in dieser Arbeit eine Reduktion der p21 Proteinmenge in seneszenten Zellen nach vorangegangener Behandlung mit PX-866 gezeigt werden (Abb. 15A). Es ist bekannt, dass die PI3K und die nachgeschalteten Kinasen, wie z. B. AKT, p21 an mehreren Resten phosphorylieren und hierdurch dessen zelluläre Lage und Proteinstabilität regulieren (Abbas & Dutta, 2009; Jänicke et al., 2007; Li et al., 2002). p21 ist allerdings auch Substrat anderer Kinasen z. B. der GSK3 β (Lee et al., 2007), sodass diese Ergebnisse sowohl auf eine entscheidende Bedeutung der PI3K Inhibition als auch auf eine Bedeutung von *off target* Effekten hinweisen können.

4.3 siRNAs können die senolytische Wirkweise von PX-866 nicht replizieren

Da Inhibitoren nie vollständig nur die Kinase inhibieren, für die sie auch spezifisch sind, sollte durch den Einsatz von siRNAs überprüft werden, ob die senolytische Wirkweise von PX-866 eindeutig auf der Inhibition der Klasse I der PI3K beruht. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Verwendung von siRNAs nicht an die senolytische Wirkung von PX-866 heranreicht (Kap. 3.2.2). Dies scheint bei erster Betrachtung auf einen hohen Stellwert sogenannter *off target* Effekte in der senolytischen Wirkweise von PX-866 hinzuweisen. Ein anderer Erklärungsansatz läge im Unterschied zwischen der irreversiblen Inhibition der PI3K durch PX-866 und der lediglich transienten Unterdrückung der Proteinsynthese durch die siRNAs. Betrachtet man die in den Western Blots gemessene Proteinexpression, kann durch Verwendung der siRNAs nur eine Reduktion der detektierten

Menge an PI3Ks erreicht werden und somit lediglich ein *Knockdown* und kein *Knockout* (Abb. 6 und Abb. 7). Des Weiteren findet lediglich eine geringfügige Reduktion der Menge von AKT-P statt. Im Gegensatz dazu ist die Reduktion von AKT-P durch Verwendung von PX-866 deutlich ausgeprägter, was für eine bessere Unterdrückung der PI3K durch den Inhibitor im Gegensatz zu den siRNAs spricht (Abb. 15A). siRNAs können somit nicht als Beweis dafür dienen, ob die senolytische Wirkung von PX-866 nun auf die Inhibition des PI3K-Signalwegs oder auf *off target* Effekte zurückzuführen ist.

Interessanterweise gibt es eine Studie, die sich ebenfalls mit dem Einsatz von siRNAs gegen PIK3CD, allerdings in Präadipozyten und Epithelzellen beschäftigte (Zhu et al., 2015). Die Zellen wurden ebenfalls durch Bestrahlung (mit 10 Gy) in Seneszenz gebracht. Hier konnte der gegen die δ -Isoform der PI3K gerichteten siRNA ein senolytischer Effekt zugesprochen werden, während siRNAs, die gegen andere Isoformen der PI3K gerichtet waren, keinen senolytischen Effekt aufwiesen (Zhu et al., 2015). Fraglich beruht der Unterschied in den Ergebnissen auf der Verwendung von benignen Zellen vs. malignen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden. Allerdings konnte in weiterführenden Arbeiten gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit verwendeten panPI3K-Inhibitoren in zwei verschiedenen benignen Zelllinien (primäre immortalisierte BJ/hTERT-Fibroblasten- und RPE-340/hTERT-Epithelzelllinien) keinen senolytischen Effekt aufwiesen (Neuwahl et al., 2024), sodass auch kein senolytischer Effekt durch Einsatz eben jener siRNAs in diesen Zelllinien zu erwarten ist. Hier findet sich also Potential zur genaueren Evaluation der unterschiedlichen senolytischen Wirksamkeit der gegen die Isoformen der PI3K gerichteten siRNAs in unterschiedlichen Zelllinien.

4.4 Die Inhibition verschiedener PI3K-Effektorkinasen ist nicht entscheidend für die senolytische Wirkung von PX-866

Zur weiteren Evaluation der senolytischen Wirkweise von PX-866 wurden neben siRNAs verschiedene Inhibitoren verwendet, die an unterschiedlichen Stellen des PI3K-Signalwegs interferieren.

SAR405 wurde als hochselektiver Vps34-Inhibitor ausgewählt (Ronan et al., 2014). Vps34 steht über mTORC1 in Verbindung mit der PI3K Klasse I. Durch fehlende PI3K Klasse I Aktivierung, wird mTORC1 weniger phosphoryliert, was zu einer gesteigerten Aktivität von Vps34 führt (Ronan et al., 2014). Ein über diesen Signalweg resultierender *off target* Effekt schien also möglich, insbesondere, da der Autophagie auch pro-seneszente Eigenschaften zugeschrieben werden (Kwon et al., 2017) und eine Autophagieblockade somit senolytisch wirken könnte. Eine Autophagieblockade mittels SAR405 zeigte allerdings keinen

senolytischen Effekt (Kap. 3.3.1), was die These unterstützt, dass der Autophagie auch anti-seneszente Eigenschaften zugeordnet werden können. Autophagie kann Seneszenzinduktion unterbinden, indem auslösende Stressoren wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies entfernt werden (Kwon et al., 2017).

Als weiterer Inhibitor kam BX-795, ein PDK-1 Inhibitor, zur Anwendung (Feldman et al., 2005). BX-795 konnte bereits als *Radiosensitizer* in Versuchen zu oralen Plattenepithelkarzinomen oder hepatozellulären Karzinomen erfolgreich getestet werden (Bamodu et al., 2020; Pai et al., 2021). Bisher noch nicht erforscht worden, war die Anwendung spät nach einer Radiotherapie. Hier konnte weder im Kristallviolett- noch im LDH-Zytotoxizitätstest eine senolytische Wirkung aufgedeckt werden (Kap. 3.3.1). Die Inhibition der PDK-1 ist also nicht entscheidend für die senolytische Wirkung von PX-866. Um zu evaluieren, inwiefern die auf die Inhibition der PI3K folgende Inhibition des Haupteffektormoleküls des PI3K-Signalwegs, AKT, entscheidend ist, wurde mit MK-2206 ein AKT-Inhibitor herangezogen (Hirai et al., 2010). Dieser zeigte allerdings auch keine an die von PX-866 heranreichende senolytische Aktivität (Kap. 3.3.1).

Als weiterer *off target* Effekt wurde die Inhibition einer weiteren Effektor kinase des PI3K-Signalwegs, der SGK1, durch Verwendung von EMD 638683 getestet (Ackermann et al., 2011; Di Cristofano, 2017). EMD 638683 konnte bereits in einer Studie ein senolytischer Effekt im Zusammenhang mit Lungenfibrose nachgewiesen werden. Seneszente Zellen spielen in der Entstehung der Fibrose vor allem durch den SASP und das damit einhergehende inflammatorische Mikromilieu eine große Rolle. Durch den Einsatz von EMD 638683 konnte die durch fettreiche Ernährung induzierte Lungenfibrose verbessert werden (Gu et al., 2023). Da dies scheinbar auf einer senolytischen Wirkweise beruht, lag der Gedanke nahe, dass auch die durch Strahlentherapie induzierte Lungenfibrose eine Besserung durch EMD 638683 erfahren könnte, sodass die Testung auf seine senolytische Wirkweise an den HCT116- und MCF-7 Zellen erfolgte. Allerdings konnte in beiden Zelllinien keine relevante Zelltodinduktion, weder bei den proliferierenden noch bei den seneszenten Zellen, nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1). Eine mögliche Erklärung hierfür, wäre der Unterschied in der Testung an benignen im Vergleich zu malignen in die Seneszenz getriebenen Zellen. Ursächlich für die Entstehung der Lungenfibrose sind seneszente Fibroblasten, in welchen durch im Sekretom enthaltene proinflammatorische und profibrotische Zytokine ein überschießendes Wachstum ausgelöst wird (Beach et al., 2017; Nguyen et al., 2018). Im Gegensatz zu Fibroblasten erfolgte die Testung der potentiell senolytischen Substanzen in dieser Arbeit an Mamma- sowie Kolonkarzinomzellen. Es könnte also Gegenstand weiterer Forschung sein, zu evaluieren, in welchen Zellen genau EMD 638683 eine senolytische Wirkung entfaltet. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung

zu, dass die senolytische Wirkung eines Inhibitors zelltypabhängig ist. So wie PX-866 nur in malignen Zellen und nicht in benignen Fibroblasten senolytisch wirkt (Kap. 4.1.1), könnte EMD 638683 nur in benignen Zellen senolytisch wirken. Der in dieser Arbeit fehlende senolytische Effekt könnte allerdings auch auf der Basis eines anderen Weges der Seneszenzinduktion beruhen. Während in der erwähnten Studie die untersuchte Lungenfibrose aufgrund fettreicher Ernährung entstanden war, handelt es sich in dieser Arbeit um ein Modell zur Erzeugung seneszenten Zellen durch DNA-Schädigung mittels Strahlentherapie. Des Weiteren sei zu nennen, dass die in der erwähnten Studie getesteten Zellen ihr Seneszenzprogramm mittels p16 aufrechterhalten. Die in dieser Arbeit verwendeten HCT116- und MCF-7 Zelllinien exprimieren beide allerdings kein funktionsfähiges p16 (Chakradeo et al., 2016; Todd et al., 2017), sondern lediglich die Wildtyp-Form von p53, sodass sie über die p53-p21 Achse Seneszenz einleiten können (Abbas & Dutta, 2009; Jänicke et al., 2008; Sohn et al., 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass eben die Reduktion der p21 Proteinexpression dafür entscheidend ist, dass das Seneszenzprogramm nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Neuwahl et al., 2024). Demnach könnte auch der Unterschied der senolytischen Wirkung von EMD 638683 auf den unterschiedlichen die Seneszenz aufrechterhaltenden Signalwegen basieren.

Bei der Evaluation der senolytischen Wirkweise einer Substanz auf eine Zelllinie könnten also der seneszenzinduzierende Mechanismus (altersassoziiert vs. therapieinduziert), der das Seneszenzprogramm aufrechterhaltende Signalweg (p16 vs. p53/p21) sowie der Zelltyp (benigne vs. maligne) eine entscheidende Rolle spielen.

Zusammenfassend konnte keiner der verwendeten Inhibitoren eine ähnliche senolytische Wirkung erzielen wie PX-866, wobei EMD 638683 als SGK-1 Inhibitor in Studien zur Lungenfibrose vielversprechende Ergebnisse als Senolytikum gezeigt hatte (Gu et al., 2023). Diesbezüglich ist noch zu erwähnen, dass in Studien gezeigt werden konnte, dass die Kinasen SGK1 und AKT sich gegenseitig kompensieren können, wenn eine von beiden pharmakologisch inhibiert wird (Di Cristofano, 2017). Dies lässt sich in dieser Arbeit damit stützen, dass nach Einsatz von EMD 638683 eine gesteigerte Proteinexpression von AKT-P im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gemessen werden konnte (Abb. 11A). Dies könnte ebenfalls für den nur eingeschränkt senolytischen Effekt von EMD 638683 erklärbar sein. Durch die panPI3K-Klasse-I-Inhibition mittels PX-866 werden beide Effektorkinasen und damit der vollständige anschließende Signalweg blockiert und eine gegenseitige Kompensation der Kinasen verhindert. Interessant wäre nun in weiteren Experimenten zu klären, ob die kombinierte Verwendung von EMD 638683 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 in den hier verwendeten Tumorzelllinien einen senolytischen Effekt aufweisen kann.

4.5 Die panPI3K Inhibition ist der entscheidende Faktor für die senolytische Wirkung von PX-866

4.5.1 Die Verwendung anderer panPI3K-Inhibitoren repliziert die senolytische Wirkung von PX-866

PX-866 ist ein irreversibler panPI3K-Klasse-I-Inhibitor (Wipf et al., 2004) und konnte als neues Senolytikum identifiziert werden. Sollte letztlich die panPI3K-Klasse-I-Inhibition entscheidend für den senolytischen Effekt sein, müsste dieser durch den Einsatz weiterer PI3K Inhibitoren reproduzierbar sein. Aufgrund dieses Gedankens fiel die Entscheidung BAY80-6946 als zweiten pan-PI3K Inhibitor (Liu et al., 2013) sowie BEZ-235 als dritten pan-PI3K Inhibitor (Maira et al., 2008) auf einen senolytischen Effekt zu testen, welcher bestätigt werden konnte. Sowohl BAY80-6946 als auch BEZ-235 zeigten eine senolytische Wirkung in den in dieser Arbeit getesteten Kolon- und Mammakarzinomzellen (Kapitel 3.3.2). In weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von p21 zur Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands erforderlich ist, und dass der Verlust der p21 Proteinexpression nach Behandlung mit PX-866 für den Tod der seneszenten Zellen verantwortlich ist (Neuwahl et al., 2024). Ähnlich wie bei PX-866 konnte in dieser Arbeit eine Reduktion der p21 Proteinmenge nach Stimulation mit BAY80-6946 und BEZ-235 als Hinweis auf die hierinliegende Ursache ihrer senolytischen Wirkweise detektiert werden (Abb. 13A und Abb. 15A).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass definitiv die Inhibition der PI3K entscheidend für die senolytischen Effekte von PX-866 ist. Wären sogenannte *off target* Effekte verantwortlich, wäre es sehr unwahrscheinlich die Ergebnisse mit zwei weiteren PI3K-Inhibitoren reproduzieren zu können, da diese mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit die gleichen weiteren Ziele wie PX-866 ansteuern würden, insbesondere da die Inhibitoren in ihrer Strukturformel deutliche Unterschiede aufweisen (Abb. 22). Bei Seneszenzinduktion findet eine Hochregulation des PI3K-Signalwegs statt (Wörthmüller et al., 2023). Die Daten lassen vermuten, dass eben die Inhibition dieses Signalwegs dazu führt, dass das Seneszenzprogramm nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Mit BAY80-6946 und BEZ-235 sind also zwei weitere für die Zukunft interessante Senolytika identifiziert worden.

BAY80-6946, auch bezeichnet als Copanlisib, wurde erstmalig 2017 in den USA durch die FDA zugelassen zur Behandlung von Erwachsenen mit Rezidiv eines folliculären Lymphoms (Markham, 2017). Es weist den Vorteil auf, dass die Pharmakokinetik weder durch das Alter noch durch das Geschlecht, den Raucherstatus, das Gewicht oder die Leber- bzw. Nierenfunktion beeinflusst wird (Curigliano & Shah, 2019). Auch zuletzt konnte es erfolgreich in Phase-III Studien mit guter klinischer Verträglichkeit getestet werden

(Matasar et al., 2021). In den bisher durchgeführten Studien wurde BAY80-694 allerdings entweder alleine oder in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika oder zielgerichteten Therapeutika verwendet (Dreyling et al., 2013; Keegan et al., 2021; Markham, 2017). Bisher noch nicht getestet worden ist BAY80-6946 auf eine potentiell senolytische Aktivität nach vorher eingesetzter Strahlen- oder Chemotherapie. Möglicherweise lassen sich auch einige der erzielten Erfolge auf eine bisher nicht identifizierte senolytische Wirkung von BAY80-6946 zurückführen.

BEZ-235, auch bezeichnet als Dactolisib, wurde ebenfalls bereits als *Radiosensitizer* vor Strahlentherapie erfolgreich getestet (Kim et al., 2014), allerdings noch nicht im Hinblick auf eine senolytische Wirkung nach erfolgter Radiatio. Es war bereits in klinischen Studien der Phase I und II, von denen allerdings viele aufgrund einer erhöhten Toxizität vorzeitig beendet werden mussten (Carlo et al., 2016; Fazio et al., 2016; Salazar et al., 2018). Ein zukünftiger und damit sicherer Ansatz könnte die Anwendung von Dactolisib in niedrigerer klinischer Dosis nach bereits erfolgter initialer Therapie sein, um die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden panPI3K-Inhibitoren liegt darin, dass BEZ-235 im Gegensatz zu BAY80-6946 zusätzlich zu den Isoformen der Klasse I der PI3K auch die Kinase mTOR inhibiert (Maira et al., 2008), wohingegen BAY80-6946 nur mit deutlicher schwächerer und nicht signifikanter Intensität auf diese Kinase wirkt (Liu et al., 2013). Dies bedingt am ehesten die im Vergleich der beiden Inhibitoren erhöhte Toxizität von BEZ-235, sodass BAY80-6946 den für die Zukunft vielversprechenderen Ansatz zum Einsatz als Senolytikum darstellt.

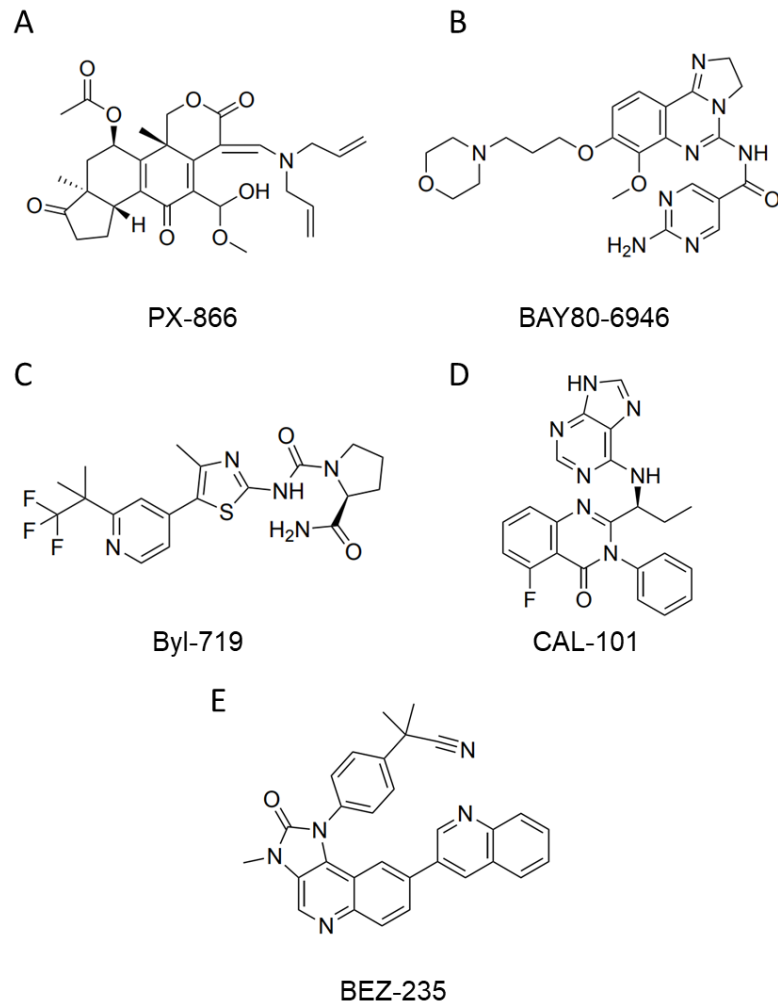


Abb. 22: Strukturformeln der neu identifizierten Senolytika (modifiziert nach Ihle et al., 2004; Liu et al., 2013; Maira et al., 2008; Markham, 2014; Markham, 2019). Die neu identifizierten Senolytika PX-866 (A), BAY80-6946 (B), Byl-719 (C) und BEZ-235 (E) sowie CAL-101 (D), welches in Kombination mit Byl-719 senolytisch wirkt, weisen unterschiedliche Strukturformeln auf. Dies bedeutet, dass *off target* Effekte, welche für den senolytischen Effekt verantwortlich sein könnten, unwahrscheinlich sind. Die PI3K-Klasse-I-Inhibition ist entscheidend für die senolytische Wirkweise von PX-866.

4.5.2 Die kombinierte Anwendung von Byl-719 und CAL-101 wirkt senolytisch

Das neu identifizierte Senolytikum BAY80-6946 gilt zwar als panPI3K-Klasse-I-Inhibitor, inhibiert allerdings bevorzugt die α - und δ -Isoform der PI3K (Liu et al., 2013). Dieser Effekt konnte mittels Byl-719 als α -Isoform spezifischer Inhibitor (Furet et al., 2013) und CAL-101 als δ -Isoform spezifischer Inhibitor (Lannutti et al., 2011) nachgebildet werden. Byl-719 wies in dieser Arbeit zwar eine senolytische Wirkung auf, welche allerdings nicht an die von PX-866 oder BAY80-6946 heranreichte, während CAL-101 alleine keine senolytische Wirkung zeigte (Kapitel 3.3.2). Durch die kombinierte Verwendung von Byl-719 und CAL-101 konnte

ein deutlich stärkerer senolytischer Effekt erzielt werden; in MCF-7 Zellen sogar tendenziell stärker als der durch PX-866 erreichte Effekt (Kapitel 3.3.3). Dies bestätigt, dass *off target* Effekte bei der senolytischen Wirkung von PX-866 keine Rolle spielen, da auch Byl-719 und CAL-101 deutliche Unterschiede in den Strukturformeln im Vergleich zu den bisher beschriebenen panPI3K-Klasse-I-Inhibitoren aufweisen (Abb. 22).

Ein möglicher Erklärungsansatz, warum nur die panPI3K-Klasse-I-Inhibition so vielversprechende Ergebnisse erzielt, liegt darin, dass die Inhibition einer Isoform der PI3K zur Hochregulation einer anderen Isoform führen kann (Fruman et al., 2017). Demnach könnte erklärt werden, warum die von Byl-719 erzielten Ergebnisse durch Kombination mit CAL-101 verstärkt werden können. Die ausgleichende erhöhte Expression der δ -Isoform nach Inhibition der α -Isoform wird durch die Hinzunahme von CAL-101 verhindert; der senolytische Effekt damit verstärkt. Dass Byl-719 alleine zu einer deutlicheren Zelltodinduktion in den seneszenten Zellen im Vergleich zu CAL-101 führt, lässt darauf hindeuten, dass die α -Isoform in den beiden verwendeten Zelllinien die entscheidendere Rolle spielt. Passend hierzu ist zu nennen, dass die δ -Isoform eigentlich eine größere Bedeutung in Immunzellen hat (Fruman et al., 2017). Vermutlich nimmt sie erst nach der Inhibition der α -Isoform eine entscheidendere Rolle in den HCT116- und MCF-7 Zellen ein. Dementsprechend ließe sich auch erklären, warum Byl-719 eine größere Reduktion der nachgewiesenen Proteinmenge von phosphoryliertem AKT im Vergleich zu CAL-101 erzielt (Abb. 15B).

Die kombinierte Anwendung von Byl-719 und CAL-101 ist bereits an Rhabdomyosarkomzellen getestet worden (Piazzini et al., 2022). Dies erfolgte zwar nicht im Hinblick auf eine Verwendung dieser als Senolytikum, sondern nur im Hinblick auf die Verwendung als proliferationshemmende Substanzen in der onkologischen Therapie, bietet aber die Möglichkeit einige Ergebnisse auf den Einsatz der beiden Inhibitoren als Senolytikum nach erfolgter Strahlentherapie zu beziehen. Man kam hier zu dem Ergebnis, dass die kombinierte Anwendung beider Inhibitoren erfolgreicher war als die alleinige Anwendung eines der beiden Inhibitoren (Piazzini et al., 2022). Dies stützt die These, dass die Inhibition lediglich einer Isoform zu einer kompensatorischen gesteigerten Expression der anderen Isoform führt (Fruman et al., 2017). Des Weiteren wird beschrieben, dass die kombinierte Anwendung von zwei Isoform-spezifischen Inhibitoren besonders in Bezug auf Nebenwirkungen der Verwendung eines pan-PI3K Inhibitors überlegen sein könnte (Piazzini et al., 2022). Somit könnte im Hinblick auf deren Verwendung als Senolytikum statt der Applikation von PX-866 die Verabreichung von Byl-719 und CAL-101 zu einer reduzierten Zahl an Nebenwirkungen führen.

4.6 Die Verwendung von PI3K-Inhibitoren als Senolytika bietet Vorteile in der klinischen Anwendung im Vergleich zur bisherigen Verwendung

Mit BAY80-6946, BEZ-235 und der kombinierten Anwendung von Byl-719 und CAL-101 konnten in dieser Arbeit neue Senolytika identifiziert werden. BAY80-6946, Byl-719 und CAL-101 bieten gegenüber PX-866 den Vorteil, dass sie für spezielle Indikationen bereits durch die FDA zugelassen wurden. BAY80-6946 erhielt seine erstmalige Zulassung durch die FDA 2017 als Drittlinientherapie zur Behandlung von Erwachsenen mit Rezidiv eines follikulären Lymphoms (Markham, 2017). Byl-719 wurde 2019 durch die FDA in Kombination mit Fulvestrant zur Therapie des metastasierten Hormonrezeptor-positiven/HER2 negativen Mammakarzinoms mit PIK3CA Mutation zugelassen (Markham, 2019). 2020 folgte die Zulassung durch die EMA (Royer et al., 2023). CAL-101 konnte bereits 2014 seine Zulassung durch die FDA erlangen, in diesem Fall zur Behandlung von Rezidiven der chronisch lymphatischen Leukämie, des follikulären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms sowie des kleinzelligen lymphozytischen Lymphoms (Markham, 2014). Alle drei Inhibitoren haben gemeinsam, dass sie zu akzeptablen Nebenwirkungen führen. Zu den häufigsten gehören z. B. Hyperglykämie, Leuko- sowie Thrombozytopenien, Diarrhoen, Übelkeit, Erbrechen und Hautausschlag (André et al., 2019; Markham, 2017). Lediglich BEZ-235 konnte bisher keine klinische Zulassung erlangen. Viele Phase-I und –II Studien mussten aufgrund einer erhöhten Toxizität vorzeitig beendet werden. Diese im Vergleich zu den anderen Inhibitoren erhöhte Rate an Nebenwirkungen basiert am ehesten auf der kombinierten Inhibition der Kinasen PI3K und mTOR (Carlo et al., 2016; Fazio et al., 2016; Salazar et al., 2018). Somit bieten sich vor allem BAY80-6946, Byl-719 und CAL-101 für die klinische Verwendung an. Dennoch ergeben sich auch hier Fragen, wie die bisher bekannten Nebenwirkungen noch weiter reduziert werden könnten.

Die negativen Folgen der PI3K-Inhibition ergeben sich unter anderem aus der systemischen Inhibition des PI3K-Signalwegs. Ein denkbarer Lösungsansatz wäre somit z. B. lediglich die lokale Applikation eines der hier identifizierten Senolytika (Kirkland & Tchkonja, 2017). Sicherlich könnten damit nicht alle Nachteile der seneszenten Zellen aus dem Weg geräumt werden, aber es würde einen Ansatz zur gezielten Behandlung bzw. Vorbeugung einzelner Nebenwirkungen der zur Seneszenzinduktion führenden onkologischen Therapien bieten. So könnte beispielsweise die Inhalation eines Senolytikums der Entstehung der durch Strahlentherapie induzierten Lungenfibrose vorbeugen. Durch diese lediglich lokale Anwendung könnte eine Reduktion der systemischen Nebenwirkungen erreicht werden (Kirkland & Tchkonja, 2017). Eine andere Möglichkeit wäre Inhibitoren in zielgerichteten

Nanopartikeln einzukapseln, um eine spezifische Freisetzung der Wirkung im Tumorgewebe zu erreichen und eine systemische Wirkung zu reduzieren (Fruman et al., 2017). In einer präklinischen Studie zu Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches dienten beispielsweise P-Selectin-bindende, auf Fucoidan basierende Nanopartikel, als Träger für Byl-719 (Mizrachi et al., 2017). Hiermit konnten deutlich effektivere Ergebnisse als mit der täglichen freien Verabreichung erreicht werden. Des Weiteren wurden die durch Byl-719 induzierten Nebenwirkungen reduziert (Mizrachi et al., 2017). Auch in seneszenten Zellen konnte mit Nanopartikeln z. B. eine spezifische Freisetzung des Senolytikums Navitoclax erreicht werden (González-Gualda et al., 2020). Das Prinzip in dieser Studie beruhte darauf, dass seneszente Zellen hohe Konzentrationen der SA- β -Gal aufweisen und somit Inhibitoren eingekapselt in Galaktose-Nanopartikel gezielt in diesen Zellen vermehrt freigesetzt werden. Auch hier konnte der Effekt von Navitoclax durch dieses Prinzip verstärkt sowie Nebenwirkungen reduziert werden (González-Gualda et al., 2020). Ähnliches ließe sich in Zukunft mit den anderen hier als senolytisch identifizierten Inhibitoren versuchen, um diese gezielt in maligne oder gezielt in seneszente Zellen einzubringen, um Nebenwirkungen zu reduzieren.

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der Nebenwirkungen liegt im Unterschied der notwendigen Dosierungen. In den bisher erfolgten klinischen Studien war der Gedanke die hier nun als senolytisch identifizierten Inhibitoren als eine weitere onkologische Therapiemöglichkeit einzusetzen mit dem Ziel die malignen proliferierenden Zellen in den Zelltod zu treiben. In dieser Arbeit konnte weder bei BAY80-6946 noch bei Byl-719 oder CAL-101 eine relevante LDH-Aktivität respektive ein relevanter Zelltod der proliferierenden Zellen verzeichnet werden, sondern lediglich ein Zellzyklusarrest. Es ist davon auszugehen, dass für die Verwendung dieser Substanzen als Senolytikum niedrigere effektive Dosen ausreichen, als wenn sie mit dem Ziel der Zelltodinduktion bei proliferierenden Zellen eingesetzt werden. Eine niedrigere Dosis sollte auch zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führen (Fruman et al., 2017).

CAL-101 wurde zudem bereits als Radiosensitizer erforscht. Hier konnte allerdings auch ein Anstieg an Nebenwirkungen der Radiatio verzeichnet werden (Gryc et al., 2017). Daraus resultiert gleichzeitig ein Anhaltspunkt für weitere Forschung. Wie würden sich die Nebenwirkungen der Strahlentherapie verhalten, wenn CAL-101 nicht vor, sondern nach erfolgter Radiotherapie eingesetzt wird? Dieser Ansatz CAL-101 kombiniert mit Byl-719 als Senolytikum einzusetzen, würde schließlich das Ziel verfolgen die Nebenwirkungen der Strahlentherapie zu reduzieren.

Zuletzt ist zu erwähnen, dass PI3K-Inhibitoren in einigen Studien nicht die erhofften Ergebnisse erbrachten. So zeigte sich z. B. PX-866 in Phase-II Studien bezüglich der primären Endpunkte (Progressionsfreies Überleben und objektives Ansprechen) nicht so erfolgreich wie erwartet (Jimeno et al., 2015; Pitz et al., 2015). Tumorzellen weisen eine hohe Zellteilungsrate und damit einhergehend ein hohes Mutationspotential auf, sodass sie den Inhibitoren nach einiger Zeit der Therapie entkommen können, was zu den teilweise enttäuschenden Ergebnissen beitragen könnte (Fruman et al., 2017; He & Sharpless, 2017). Hier könnte ebenfalls ein Vorteil der gekoppelten Verwendung mit Seneszenz auslösenden Therapien liegen. Die darauf entstehenden seneszenten Zellen unterliegen einem irreversiblen Zellzyklusarrest und haben dementsprechend ein viel geringeres Mutationspotential, sodass die Entwicklung eines *Escape-Mechanismus* deutlich länger dauern könnte, als in proliferierenden Tumorzellen (He & Sharpless, 2017). Perspektivisch wäre damit von einer geringeren Resistenzentwicklung dieser Zellen gegenüber der senolytischen Therapie auszugehen.

4.7 Ausblick und Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die panPI3K-Klasse-I-Inhibition als entscheidender molekularer Ansatzpunkt der senolytischen Aktivität von PX-866 identifiziert werden. In diesem Zusammenhang konnten weitere in HCT116- und MCF-7 Zellen als Senolytika wirkende Inhibitoren entdeckt werden: BAY80-6946, BEZ-235, Byl-719 und die kombinierte Anwendung von Byl-719 und CAL-101. Offen bleibt allerdings teilweise die Frage, inwiefern diese Substanzen in anderen Zellen senolytisch wirken. So könnten diese Inhibitoren in Zukunft an weiteren Tumorzelllinien auf ein senolytisches Potential hin getestet werden. Sollten sie auch in diesen eine entsprechende Aktivität aufweisen, wäre ein breiter Einsatz in der Klinik denkbar. Aber auch, wenn sich ihr senolytisches Potential nur auf die bisher untersuchten malignen Zelllinien, die Kolonkarzinomzellen HCT116, Mammakarzinomzellen MCF-7, Lungenkarzinomzellen A549 und die Glioblastomzellen LN229 und A172 (Beltzig et al., 2022; Neuwahl et al., 2024) beschränkt, so wäre zumindest in eben diesen der Einsatz in der Klinik als Senolytikum möglich. Dadurch, dass in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe eine fehlende Wirkung der neu identifizierten Senolytika auf BJ/hTERT-Fibroblasten- und RPE-340/hTERT-Epithelzelllinien nachgewiesen werden konnte (Neuwahl et al., 2024) und sich die Nebenwirkungen von BAY80-6946, Byl-719 und CAL-101 in klinischen Studien als akzeptabel gezeigt haben, ist davon auszugehen, dass sich ihre zytotoxische Wirkung in Bezug auf benignes Gewebe in Grenzen hält, was Voraussetzung für den weiteren klinischen Einsatz ist.

Mit BAY80-6946, BEZ-235, Byl-719 und CAL-101 wurde eine Auswahl an pan- und Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren untersucht. Neben diesen gibt es allerdings noch viele weitere die PI3K inhibierende Substanzen. Insbesondere die Kombination weiterer unterschiedlicher Isoform-spezifischer Inhibitoren bietet Anlass für weitere Versuche.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Senolytika identifiziert werden, welche gezielt in malignen p53 Wildtyp Zellen, die über die p53/p21 Achse therapieinduziert Seneszenz einleiten, wirken. In Zukunft folgen könnte die Umsetzung in einem Mausmodell, um die senolytische Wirkung am Organismus *in vivo* zu erforschen bevor schließlich ein Einsatz in klinischen Phase-I Studien denkbar wäre.

Ziel wäre auf lange Sicht die Applikation eines der hier identifizierten Senolytika in spezifischen Tumoren nach zuvor erfolgter Strahlen- oder Chemotherapie zur Elimination der durch diese Therapie entstehenden seneszenten Zellen. Da zur Seneszenzinduktion eine vergleichsweise geringere Strahlen- oder Chemotherapiedosis nötig wäre als zur Zelltodinduktion, könnte in Zukunft auch eine Reduktion der Dosis denkbar sein. Im Anschluss würde dann zur vollständigen Beseitigung der malignen Zellen die Applikation des Senolytikums erfolgen (Sieben et al., 2018). Dies könnte mit einer deutlichen Reduktion der Nebenwirkungen einer Strahlen- oder Chemotherapie wie beispielsweise Fatigue oder Nausea und Emesis einhergehen. Des Weiteren könnte der auf diese onkologischen Therapien folgende Einsatz der Senolytika die Rate an Rezidiven und Metastasen reduzieren, deren Entstehung durch den SASP begünstigt wird (Coppé et al., 2008; Demaria et al., 2017; Gonzalez-Meljem et al., 2018).

Die in dieser Arbeit als Senolytika identifizierten PI3K-Inhibitoren stellen somit einen vielversprechenden Ansatz für weitere Forschung dar. Sie bieten das Potential zu einer besseren Verträglichkeit der onkologischen Therapien beizutragen sowie ein vollständig neues Therapiekonzept in der Onkologie zu etablieren.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400-414.
- Ackermann, T. F., Boini, K. M., Beier, N., Scholz, W., Fuchss, T., & Lang, F. (2011). EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. *Cell Physiol Biochem*, 28(1), 137-146.
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., & Andrulis, M. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 15(8), 978-990.
- Akter, R., Hossain, M. Z., Kleve, M. G., & Gealt, M. A. (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*, 103-113.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology*, 7(4), 261-269.
- André, F., Ciruelos, E., Rubovszky, G., Campone, M., Loibl, S., Rugo, H. S., Iwata, H., Conte, P., Mayer, I. A., & Kaufman, B. (2019). Apolisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 380(20), 1929-1940.
- Bamodu, O. A., Chang, H. L., Ong, J. R., Lee, W. H., Yeh, C. T., & Tsai, J. T. (2020). Elevated PDK1 Expression Drives PI3K/AKT/MTOR Signaling Promotes Radiation-Resistant and Dedifferentiated Phenotype of Hepatocellular Carcinoma. *Cells*, 9(3).
- Beach, T. A., Johnston, C. J., Groves, A. M., Williams, J. P., & Finkelstein, J. N. (2017). Radiation induced pulmonary fibrosis as a model of progressive fibrosis: Contributions of DNA damage, inflammatory response and cellular senescence genes. *Experimental Lung Research*, 43(3), 134-149.
- Beltzig, L., Christmann, M., & Kaina, B. (2022). Abrogation of Cellular Senescence Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells: Search for Senolytics. *Cells*, 11(16).
- Bendell, J. C., Kurkjian, C., Infante, J. R., Bauer, T. M., Burris, H. A., Greco, F. A., Shih, K. C., Thompson, D. S., Lane, C. M., & Finney, L. H. (2015). A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33, 463-471.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352.
- Bowman, P., Meek, R., & Daniel, C. (1975). Aging of human fibroblasts in vitro: correlations between DNA synthetic ability and cell size. *Experimental Cell Research*, 93(1), 184-190.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torraine, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *Journal of Clinical Investigation*, 104(3), 263-269.
- Burgering, B. M. T., & Coffey, P. J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376(6541), 599-602.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., & Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate

- systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9742-9747.
- Carlo, M. I., Molina, A. M., Lakhman, Y., Patil, S., Woo, K., DeLuca, J., Lee, C.-H., Hsieh, J. J., Feldman, D. R., & Motzer, R. J. (2016). A phase Ib study of BEZ235, a dual inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR), in patients with advanced renal cell carcinoma. *The oncologist*, 21(7), 787-788d.
- Carnero, A. (2013). Markers of cellular senescence. *Cell senescence: methods and protocols*, 83-92.
- Chakradeo, S., W Elmore, L., & A Gewirtz, D. (2016). Is senescence reversible? *Current Drug Targets*, 17(4), 460-466.
- Chang, B.-D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K., & Roninson, I. B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Research*, 59(15), 3761-3767.
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., & Gerald, W. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725-730.
- 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 Rep*, 15(11), 1139-1153.
- Chuang, F. C., Wang, C. C., Chen, J. H., Hwang, T. Z., Yeh, S. A., & Su, Y. C. (2021). PI3k inhibitors (BKM120 and BYL719) as radiosensitizers for head and neck squamous cell carcinoma during radiotherapy. *PloS One*, 16(1), e0245715.
- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36396-36403.
- Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*, 281(40), 29568-29574.
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), 2853-2868.
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(6), 1075-1083.
- Curigliano, G., & Shah, R. R. (2019). Safety and Tolerability of Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Inhibitors in Oncology. *Drug Saf*, 42(2), 247-262.
- Day, D., Prawira, A., Spreafico, A., Waldron, J., Karithanam, R., Giuliani, M., Weinreb, I., Kim, J., Cho, J., Hope, A., Bayley, A., Ringash, J., Bratman, S. V., Jang, R., O'Sullivan, B., Siu, L. L., & Hansen, A. R. (2020). Phase I trial of alpelisib in combination with concurrent cisplatin-based chemoradiotherapy in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*, 108, 104753.
- 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(1), 61-69.
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., . . . Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*, 7(2), 165-176.

- Di Cristofano, A. (2017). SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, 123, 49-71.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Development*, 8(21), 2540-2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Giovanni Nuciforo, P., & Bensimon, A. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638-642.
- 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(20), 9363-9367.
- Djuzenova, C. S., Fiedler, V., Memmel, S., Katzer, A., Sisario, D., Brosch, P. K., Göhrung, A., Frister, S., Zimmermann, H., Flentje, M., & Sukhorukov, V. L. (2019). Differential effects of the Akt inhibitor MK-2206 on migration and radiation sensitivity of glioblastoma cells. *BMC Cancer*, 19(1), 299.
- Do, K., Speranza, G., Bishop, R., Khin, S., Rubinstein, L., Kinders, R. J., Datiles, M., Eugeni, M., Lam, M. H., Doyle, L. A., Doroshov, J. H., & Kummar, S. (2015). Biomarker-driven phase 2 study of MK-2206 and selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with colorectal cancer. *Investigational New Drugs*, 33(3), 720-728.
- Dreyling, M., Morschhauser, F., Bron, D., Bouabdallah, K., Vitolo, U., Linton, K., Van Den Neste, E., Mappa, S., Giurescu, M., & Childs, B. H. (2013). Preliminary results of a phase II study of single agent bay 80-6946, a novel PI3K inhibitor, in patients with relapsed/refractory, indolent or aggressive lymphoma. *Blood*, 122(21), 87.
- Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevesa, T., Klotz, S., Medina-Echeverz, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., Heikenwalder, M., Wang, X. W., Zender, L., & Greten, T. F. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*, 30(4), 533-547.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606-619.
- Fazio, N., Buzzoni, R., Baudin, E., Antonuzzo, L., Hubner, R. A., Lahner, H., De Herder, W. W., Raderer, M., Teule, A., & Capdevila, J. (2016). A phase II study of BEZ235 in patients with everolimus-resistant, advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *Anticancer Research*, 36(2), 713-719.
- Feldman, R. I., Wu, J. M., Polokoff, M. A., Kochanny, M. J., Dinter, H., Zhu, D., Biroc, S. L., Alicke, B., Bryant, J., Yuan, S., Buckman, B. O., Lentz, D., Ferrer, M., Whitlow, M., Adler, M., Finster, S., Chang, Z., & Arnaiz, D. O. (2005). Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem*, 280(20), 19867-19874.
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), 343-346.
- Franke, T. F., Yang, S.-I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., & Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81(5), 727-736.
- 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(4), 605-635.
- Furet, P., Guagnano, V., Fairhurst, R. A., Imbach-Weese, P., Bruce, I., Knapp, M., Fritsch, C., Blasco, F., Blanz, J., & Aichholz, R. (2013). Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(13), 3741-3748.
- Furman, R. R., Sharman, J. P., Coutre, S. E., Cheson, B. D., Pagel, J. M., Hillmen, P., Barrientos, J. C., Zelenetz, A. D., Kipps, T. J., & Flinn, I. (2014). Idelalisib and

- rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 370(11), 997-1007.
- Gil, J., & Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5, 107-114.
- Gonzalez-Meljem, J. M., Apps, J. R., Fraser, H. C., & Martinez-Barbera, J. P. (2018). Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumourigenesis. *Br J Cancer*, 118(10), 1283-1288.
- González-Gualda, E., Pàez-Ribes, M., Lozano-Torres, B., Macias, D., Wilson III, J. R., González-López, C., Ou, H. L., Mirón-Barroso, S., Zhang, Z., & Lérida-Viso, A. (2020). Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity. *Aging Cell*, 19(4), e13142.
- Gopal, A. K., Fanale, M. A., Moskowitz, C. H., Shustov, A. R., Mitra, S., Ye, W., Younes, A., & Moskowitz, A. J. (2017). Phase II study of idelalisib, a selective inhibitor of PI3K δ , for relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology*, 28(5), 1057-1063.
- Gopal, A. K., Kahl, B. S., De Vos, S., Wagner-Johnston, N. D., Schuster, S. J., Jurczak, W. J., Flinn, I. W., Flowers, C. R., Martin, P., & Viardot, A. (2014). PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 370(11), 1008-1018.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., & Pereira-Smith, O. M. (2002). Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38540-38549.
- Gryc, T., Putz, F., Goerig, N., Ziegler, S., Fietkau, R., Distel, L. V., & Schuster, B. (2017). Idelalisib may have the potential to increase radiotherapy side effects. *Radiation Oncology (London, England)*, 12(1), 109.
- Gu, X., Meng, H., Peng, C., Lin, S., Li, B., Zhao, L., Yang, X., Wang, G., Cai, W., Zhou, J., Liu, S., Wu, P., Du, Y., Jin, J., & Wang, X. (2023). Inflammasome activation and metabolic remodelling in p16-positive aging cells aggravates high-fat diet-induced lung fibrosis by inhibiting NEDD4L-mediated K48-polyubiquitin-dependent degradation of SGK1. *Clin Transl Med*, 13(6), e1308.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000-1011.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436-453.
- Hertweck, M., Göbel, C., & Baumeister, R. (2004). C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Developmental Cell*, 6(4), 577-588.
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsuchioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P. K., Pan, B. S., & Kotani, H. (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 9(7), 1956-1967.
- Hong, D. S., Bowles, D. W., Falchook, G. S., Messersmith, W. A., George, G. C., O'Bryant, C. L., Vo, A. C., Klucher, K., Herbst, R. S., Eckhardt, S. G., Peterson, S., Hausman, D. F., Kurzrock, R., & Jimeno, A. (2012). A multicenter phase I trial of PX-866, an oral irreversible phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 18(15), 4173-4182.

- 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. *Mol Cancer Ther*, 6(9), 2505-2514.
- Hudis, C., Swanton, C., Janjigian, Y. Y., Lee, R., Sutherland, S., Lehman, R., Chandarlapaty, S., Hamilton, N., Gajria, D., Knowles, J., Shah, J., Shannon, K., Tetteh, E., Sullivan, D. M., Moreno, C., Yan, L., & Han, H. S. (2013). A phase 1 study evaluating the combination of an allosteric AKT inhibitor (MK-2206) and trastuzumab in patients with HER2-positive solid tumors. *Breast Cancer Research*, 15(6), R110.
- Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W., & Raulet, D. H. (2013). p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 2057-2069.
- Ihle, N. T., Williams, R., Chow, S., Chew, W., Berggren, M. I., Paine-Murrieta, G., Minion, D. J., Halter, R. J., Wipf, P., & Abraham, R. (2004). Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(7), 763-772.
- Jain, S., Shah, A. N., Santa-Maria, C. A., Siziopikou, K., Rademaker, A., Helenowski, I., Cristofanilli, M., & Gradishar, W. J. (2018). Phase I study of alpelisib (BYL-719) and trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive metastatic breast cancer (MBC) after trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 171(2), 371-381.
- 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(9), 5661-5670.
- Jänicke, R. U., Sohn, D., Essmann, F., & Schulze-Osthoff, K. (2007). The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle*, 6(4), 407-413.
- Jänicke, R. U., Sohn, D., & Schulze-Osthoff, K. (2008). The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ*, 15(6), 959-976.
- 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. *J Biol Chem*, 273(16), 9357-9360.
- Jensen, C. J., Buch, M. B., Krag, T. O., Hemmings, B. A., Gammeltoft, S., & Frödin, M. (1999). 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J Biol Chem*, 274(38), 27168-27176.
- Jimeno, A., Bauman, J. E., Weissman, C., Adkins, D., Schnadig, I., Beaugregard, P., Bowles, D. W., Spira, A., Levy, B., Seetharamu, N., Hausman, D., Walker, L., Rudin, C. M., & Shirai, K. (2015). A randomized, phase 2 trial of docetaxel with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol*, 51(4), 383-388.
- Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), 405-412.
- Jones, J. A., Robak, T., Brown, J. R., Awan, F. T., Badoux, X., Coutre, S., Loscertales, J., Taylor, K., Vandenberghe, E., Wach, M., Wagner-Johnston, N., Ysebaert, L., Dreiling, L., Dubowy, R., Xing, G., Flinn, I. W., & Owen, C. (2017). Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol*, 4(3), e114-e126.
- Juric, D., Janku, F., Rodón, J., Burris, H. A., Mayer, I. A., Schuler, M., Seggewiss-Bernhardt, R., Gil-Martin, M., Middleton, M. R., Baselga, J., Bootle, D., Demanse, D., Blumenstein, L., Schumacher, K., Huang, A., Quadt, C., & Rugo, H. S. (2019). Alpelisib Plus Fulvestrant in PIK3CA-Altered and PIK3CA-Wild-Type Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 5(2), e184475.

- Juric, D., Rodon, J., Taberero, J., Janku, F., Burris, H. A., Schellens, J. H. M., Middleton, M. R., Berlin, J., Schuler, M., Gil-Martin, M., Rugo, H. S., Seggewiss-Bernhardt, R., Huang, A., Bootle, D., Demanse, D., Blumenstein, L., Coughlin, C., Quadt, C., & Baselga, J. (2018). Phosphatidylinositol 3-Kinase α -Selective Inhibition With Alpelisib (BYL719) in PIK3CA-Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(13), 1291-1299.
- Kandalai, S., Li, H., Zhang, N., Peng, H., & Zheng, Q. (2023). The human microbiome and cancer: a diagnostic and therapeutic perspective. *Cancer Biology & Therapy*, *24*(1), 2240084.
- Keegan, N. M., Furney, S. J., Walshe, J. M., Gullo, G., Kennedy, M. J., Smith, D., McCaffrey, J., Kelly, C. M., Egan, K., & Kerr, J. (2021). Phase Ib trial of copanlisib, a phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor, with trastuzumab in advanced pre-treated HER2-positive breast cancer "PanTHER". *Cancers*, *13*(6), 1225.
- Kim, J. J., Lee, S. B., Park, J. K., & Yoo, Y. D. (2010). TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ*, *17*(9), 1420-1434.
- Kim, K. W., Myers, C. J., Jung, D. K., & Lu, B. (2014). NVP-BEZ-235 enhances radiosensitization via blockade of the PI3K/mTOR pathway in cisplatin-resistant non-small cell lung carcinoma. *Genes & Cancer*, *5*(7-8), 293-302.
- Kirkland, J. L., & Tchkonja, T. (2017). Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*, *21*, 21-28.
- 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*, *40*(9), 607-612.
- Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A. J., Byrd, J. C., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., & Deininger, M. (2011). CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *117*(2), 591-594.
- Lee, J. Y., Yu, S. J., Park, Y. G., Kim, J., & Sohn, J. (2007). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(8), 3187-3198.
- Lehman, T. A., Reddel, R., Peifer, A., Spillare, E., Kaighn, M. E., Weston, A., Gerwin, B. I., & Harris, C. C. (1991). Oncogenes and tumor-suppressor genes. *Environmental Health Perspectives*, *93*, 133-134.
- Li, Y., Dowbenko, D., & Lasky, L. A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11352-11361.
- Liu, N., Rowley, B. R., Bull, C. O., Schneider, C., Haegbarth, A., Schatz, C. A., Fracasso, P. R., Wilkie, D. P., Hentemann, M., Wilhelm, S. M., Scott, W. J., Mumberg, D., & Ziegelbauer, K. (2013). BAY 80-6946 is a highly selective intravenous PI3K inhibitor with potent p110 α and p110 δ activities in tumor cell lines and xenograft models. *Mol Cancer Ther*, *12*(11), 2319-2330.
- Maciel-Barón, L. A., Morales-Rosales, S. L., Aquino-Cruz, A. A., Triana-Martínez, F., Galván-Arzate, S., Luna-López, A., González-Puertos, V. Y., López-Díazguerrero, N. E., Torres, C., & Königsberg, M. (2016). Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *AGE*, *38*(1), 26.
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(22), 13375-13378.
- Maira, S. M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chène, P., De Pover, A., Schoemaker, K., Fabbro, D., Gabriel, D., Simonen, M., Murphy, L., Finan, P., Sellers, W., & García-Echeverría, C. (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. *Mol Cancer Ther*, 7(7), 1851-1863.
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, 169(3), 381-405.
- Markham, A. (2014). Idelalisib: first global approval. *Drugs*, 74(14), 1701-1707.
- Markham, A. (2017). Copanlisib: First Global Approval. *Drugs*, 77(18), 2057-2062.
- Markham, A. (2019). Alpelisib: First Global Approval. *Drugs*, 79(11), 1249-1253.
- Matasar, M. J., Capra, M., Özcan, M., Lv, F., Li, W., Yañez, E., Sapunarova, K., Lin, T., Jin, J., Jurczak, W., Hamed, A., Wang, M. C., Baker, R., Bondarenko, I., Zhang, Q., Feng, J., Geissler, K., Lazaroiu, M., Saydam, G., . . . Zinzani, P. L. (2021). Copanlisib plus rituximab versus placebo plus rituximab in patients with relapsed indolent non-Hodgkin lymphoma (CHRONOS-3): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 22(5), 678-689.
- Mayer, I. A., Abramson, V. G., Formisano, L., Balko, J. M., Estrada, M. V., Sanders, M. E., Juric, D., Solit, D., Berger, M. F., Won, H. H., Li, Y., Cantley, L. C., Winer, E., & Arteaga, C. L. (2017). A Phase Ib Study of Alpelisib (BYL719), a PI3K α -Specific Inhibitor, with Letrozole in ER+/HER2- Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(1), 26-34.
- 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(11), 1304-1306.
- Mizrachi, A., Shamay, Y., Shah, J., Brook, S., Soong, J., Rajasekhar, V. K., Humm, J. L., Healey, J. H., Powell, S. N., & Baselga, J. (2017). Tumour-specific PI3K inhibition via nanoparticle-targeted delivery in head and neck squamous cell carcinoma. *Nature communications*, 8(1), 14292.
- Molife, L. R., Yan, L., Vitfell-Rasmussen, J., Zernhelt, A. M., Sullivan, D. M., Cassier, P. A., Chen, E., Biondo, A., Tetteh, E., Siu, L. L., Patnaik, A., Papadopoulos, K. P., de Bono, J. S., Tolcher, A. W., & Minton, S. (2014). Phase 1 trial of the oral AKT inhibitor MK-2206 plus carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*, 7, 1.
- 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(9), 702-712.
- Nakanishi, S., Kakita, S., Takahashi, I., Kawahara, K., Tsukuda, E., Sano, T., Yamada, K., Yoshida, M., Kase, H., & Matsuda, Y. (1992). Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2157-2163.
- Neuwahl, J. (2020). *Evaluation des senolytischen Potentials einer marinen Naturstoffbibliothek* Heinrich-Heine-Universität].
- Neuwahl, J., Neumann, C. A., Fitz, A. C., Biermann, A. D., Magel, M., Friedrich, A., Sellin, L., Stork, B., Piekorz, R. P., Proksch, P., Budach, W., Jänicke, R. U., & Sohn, D. (2024). Combined inhibition of class 1-PI3K-alpha and delta isoforms causes senolysis by inducing p21WAF1/CIP1 proteasomal degradation in senescent cells. *Cell Death & Disease*, 15(5), 373.
- 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.
- O'Brien, S. M., Lamanna, N., Kipps, T. J., Flinn, I., Zelenetz, A. D., Burger, J. A., Keating, M., Mitra, S., Holes, L., Yu, A. S., Johnson, D. M., Miller, L. L., Kim, Y., Dansey, R. D., Dubowy, R. L., & Coutre, S. E. (2015). A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 126(25), 2686-2694.

- Okuzumi, T., Fiedler, D., Zhang, C., Gray, D. C., Aizenstein, B., Hoffman, R., & Shokat, K. M. (2009). Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nature Chemical Biology*, 5(7), 484-493.
- Paez-Ribes, M., Gonzalez-Gualda, E., Doherty, G. J., & Munoz-Espin, D. (2019). Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med*, 11(12), e10234.
- Pai, S., Yadav, V. K., Kuo, K. T., Pikatan, N. W., Lin, C. S., Chien, M. H., Lee, W. H., Hsiao, M., Chiu, S. C., Yeh, C. T., & Tsai, J. T. (2021). PDK1 Inhibitor BX795 Improves Cisplatin and Radio-Efficacy in Oral Squamous Cell Carcinoma by Downregulating the PDK1/CD47/Akt-Mediated Glycolysis Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21).
- Pan, J., Li, D., Xu, Y., Zhang, J., Wang, Y., Chen, M., Lin, S., Huang, L., Chung, E. J., Citrin, D. E., Wang, Y., Hauer-Jensen, M., Zhou, D., & Meng, A. (2017). Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 99(2), 353-361.
- Pap, M., & Cooper, G. M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 19929-19932.
- Pasquier, B. (2015). SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy*, 11(4), 725-726.
- Patnaik, A., Appleman, L. J., Tolcher, A. W., Papadopoulos, K. P., Beeram, M., Rasco, D. W., Weiss, G. J., Sachdev, J. C., Chadha, M., Fulk, M., Ejadi, S., Mountz, J. M., Lotze, M. T., Toledo, F. G., Chu, E., Jeffers, M., Peña, C., Xia, C., Reif, S., . . . Ramanathan, R. K. (2016). First-in-human phase I study of copanlisib (BAY 80-6946), an intravenous pan-class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of Oncology*, 27(10), 1928-1940.
- Piazzzi, M., Bavelloni, A., Cenni, V., Salucci, S., Bartoletti Stella, A., Tomassini, E., Scotlandi, K., Blalock, W. L., & Faenza, I. (2022). Combined Treatment with PI3K Inhibitors BYL-719 and CAL-101 Is a Promising Antiproliferative Strategy in Human Rhabdomyosarcoma Cells. *Molecules*, 27(9).
- 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., Squire, J., Tsao, M. S., Kamel-Reid, S., Banerji, S., Tu, D., Powers, J., Hausman, D. F., & Mason, W. P. (2015). Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17(9), 1270-1274.
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., & Grindey, G. (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Research*, 54(9), 2419-2423.
- Price, B. D., & Youmell, M. B. (1996). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Research*, 56(2), 246-250.
- Ramanathan, R. K., McDonough, S. L., Kennecke, H. F., Iqbal, S., Baranda, J. C., Seery, T. E., Lim, H. J., Hezel, A. F., Vaccaro, G. M., & Blanke, C. D. (2015). Phase 2 study of MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, as second-line therapy for advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: A SWOG cooperative group trial (S1005). *Cancer*, 121(13), 2193-2197.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973-979.
- Ronan, B., Flamand, O., Vescovi, L., Dureuil, C., Durand, L., Fassy, F., Bachelot, M. F., Lambertson, A., Mathieu, M., Bertrand, T., Marquette, J. P., El-Ahmad, Y., Filoche-Romme, B., Schio, L., Garcia-Echeverria, C., Goulaouic, H., & Pasquier, B. (2014).

- A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat Chem Biol*, 10(12), 1013-1019.
- Rosenzweig, K. E., Youmell, M. B., Palayoor, S. T., & Price, B. D. (1997). Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(7), 1149-1156.
- Royer, B., Kaderbhai, C. G., & Schmitt, A. (2023). Pharmacokinetics and Pharmacodynamic of Alpelisib. *Clinical Pharmacokinetics*, 62(1), 45-53.
- Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A. H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., Belt, B. A., Alspach, E., Leahy, K., Luo, J., Schaffer, A., Edwards, J. R., Longmore, G., Faccio, R., DeNardo, D. G., & Stewart, S. A. (2016). Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun*, 7, 11762.
- Sagiv, A., & Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology*, 14(6), 617-628.
- Salazar, R., Garcia-Carbonero, R., Libutti, S. K., Hendifar, A. E., Custodio, A., Guimbaud, R., Lombard-Bohas, C., Ricci, S., Klumpen, H. J., & Capdevila, J. (2018). Phase II study of BEZ235 versus everolimus in patients with mammalian target of rapamycin inhibitor-naïve advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *The oncologist*, 23(7), 766-e790.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., & Riggins, G. J. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304(5670), 554-554.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098-1101.
- Savas, P., Lo, L. L., Luen, S. J., Blackley, E. F., Callahan, J., Moodie, K., van Geelen, C. T., Ko, Y. A., Weng, C. F., Wein, L., Silva, M. J., Bujak, A. Z., Yeung, M. M., Ftouni, S., Hicks, R. J., Francis, P. A., Lee, C. K., Dawson, S. J., & Loi, S. (2022). Alpelisib Monotherapy for PI3K-Altered, Pretreated Advanced Breast Cancer: A Phase II Study. *Cancer Discov*, 12(9), 2058-2073.
- Schmitt, C. A., Wang, B., & Demaria, M. (2022). Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities. *Nature Reviews: Clinical Oncology*, 19(10), 619-636.
- Schosserer, M., Grillari, J., & Breitenbach, M. (2017). The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol*, 7, 278.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867-874.
- 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(9), 723-737.
- 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 Res*, 66(23), 11254-11262.
- Todd, M. C., Langan, T. A., & Sclafani, R. A. (2017). Doxycycline-Regulated p16(MTS1) Expression Suppresses the Anchorage-Independence and Tumorigenicity of Breast Cancer Cell Lines that Lack Endogenous p16. *Journal of Cancer*, 8(2), 190-198.
- Wipf, P., Minion, D. J., Halter, R. J., Berggren, M. I., Ho, C. B., Chiang, G. G., Kirkpatrick, L., Abraham, R., & Powis, G. (2004). Synthesis and biological evaluation of synthetic viridins derived from C (20)-heteroalkylation of the steroidal PI-3-kinase inhibitor wortmannin. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2(13), 1911-1920.
- Wörthmüller, J., Disler, S., Pradervand, S., Richard, F., Haerri, L., Ruiz Buendía, G. A., Fournier, N., Desmedt, C., & Rüegg, C. (2023). MAGI1 Prevents Senescence and Promotes the DNA Damage Response in ER(+) Breast Cancer. *Cells*, 12(15).

- Xiaobo, Y., Qiang, L., Xiong, Q., Zheng, R., Jianhua, Z., Zhifeng, L., Yijiang, S., & Zheng, J. (2016). Serum and glucocorticoid kinase 1 promoted the growth and migration of non-small cell lung cancer cells. *Gene*, 576(1 Pt 2), 339-346.
- Yap, T. A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R. D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Pope, L. L., Heaton, S. P., Thomas, G., Garrett, M. D., Sullivan, D. M., de Bono, J. S., & Tolcher, A. W. (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 29(35), 4688-4695.
- Zhao, W., Qiu, Y., & Kong, D. (2017). Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(1), 27-37.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'Hara, S. P., LaRusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., LeBrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., . . . Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644-658.

6 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. D. Sohn für die Übernahme des Erstgutachtens sowie der experimentellen Betreuung, der Bereitstellung des Forschungsthemas, die Unterstützung bei der praktischen Durchführung und der statistischen Auswertung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. B. Stork für die Übernahme der Co-Betreuung bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W. Budach, als ehemaligem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, und seiner Nachfolgerin Frau Univ.-Prof. Dr. med. J. Hörner-Rieber für die Möglichkeit im Labor für Molekulare Radioonkologie der Klinik für Strahlentherapie meine medizinische Doktorarbeit anfertigen zu können.

Ich bedanke mich bei Christine Hachmann, Philipp Steinbrecher und Alexandra Zepina für die Unterstützung im Labor und das tolle Arbeitsklima.

Zuletzt möchte ich mich für die inhaltliche und sprachliche Korrektur bei Sylvia Möxs-Neumann, Michael Neumann und Leonard Karl bedanken. Meiner Familie möchte ich außerdem auch für die emotionale Unterstützung danken und dafür, dass sie mir bei der Anfertigung der schriftlichen Ausarbeitung parallel zum Berufsleben und auch sonst stets den Rücken freigehalten haben.