

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen

**Charakterisierung und vergleichende Analyse der Zytokin-
und Therapie-induzierten Seneszenz im humanen malignen
Melanom**

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

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

vorgelegt von

Homann, Lorenzo Julian Benedict

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter Professor Dr. T. Wieder

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schulze-Osthoff

3. Berichterstatter: Professorin Dr. V. Jendrossek

Tag der Disputation: 11.12.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom – zentrale epidemiologische und therapeutische Aspekte	1
1.2 Das Immunsystem	2
1.2.1 Das angeborene Immunsystem	2
1.2.2 Das adaptive Immunsystem	3
1.2.3 Die Immun-Checkpoint-Blockade	5
1.3 Die zelluläre Seneszenz	6
1.3.1 Definition und Charakterisierung seneszenten Zellen	6
1.3.2 Biologische und therapeutische Aspekte der Seneszenz	7
1.3.3 Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp	9
1.3.4 Die Zytokin-induzierte Seneszenz	10
1.3.5 Die Therapie-induzierte Seneszenz	11
1.4 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmittel	17
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	18
2.1.4 Lösungen und Puffer	20
2.1.5 Antikörper	21
2.1.6 Kits und Arrays	22
2.1.7 Software	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zelllinien	24

2.2.2	Zellkultur _____	24
2.2.3	Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib _____	25
2.2.4	Konditioniertes Medium _____	26
2.2.5	SA- β -Gal- und DAPI-Färbung _____	26
2.2.6	Growth Arrest Assay _____	27
2.2.7	Laktatdehydrogenase Zytotoxizitätsassay _____	28
2.2.8	Western Blot _____	29
2.2.9	Zellzyklusanalyse mit 7-AAD-APC-BrdU-Durchflusszytometrie_	31
2.2.10	RNA-Isolation _____	33
2.2.11	cDNA-Synthese _____	33
2.2.12	Polymerasekettenreaktion _____	34
2.2.13	Quantitative Polymerasekettenreaktion _____	34
2.2.14	qPCR-Arrays _____	36
2.2.15	Proteome Profiler Arrays _____	38
2.2.16	Enzyme-linked Immunosorbent Assay _____	40
2.2.17	Statistik _____	40
3	Ergebnisse _____	41
3.1	IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib induzieren Seneszenz-Marker in Melanomzellen _____	41
3.1.1	Induktion der SA- β -Gal-Aktivität und Seneszenz-typischer Veränderungen der Zellmorphologie nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib _____	41
3.1.2	Induktion eines stabilen Wachstumsarrests in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib ____	45
3.1.3	Geringe bis keine zytotoxischen Effekte durch Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib _____	45
3.2	Charakterisierung des Wachstumsarrests von seneszenten Melanomzellen _____	47
3.2.1	Stabile Induktion von p21 nach Behandlung mit IFN- γ und TNF sowie mit Doxorubicin, aber nicht mit Palbociclib _____	47
3.2.2	Erhöhte p21-Expression von seneszenten Melanomzellen geht nicht zwingend mit verstärkter Expression von p53 einher ____	51
3.2.3	Stabiler Zellzyklusarrest vor allem in der G1-Phase nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib ____	53

3.3	Zwischenfazit	57
3.4	Zytokin-induzierte Seneszenz in Melanomzellen ist mit einem stärker proinflammatorischen SASP assoziiert im Vergleich zur Therapie-induzierten Seneszenz	58
3.4.1	Zytokin-induzierte Seneszenz erhöht die Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in größerem Umfang als Therapie-induzierte Seneszenz	58
3.4.2	Zytokin-induzierte Seneszenz verstärkt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in größerem Umfang als Therapie-induzierte Seneszenz	61
3.5	Senescente Melanomzellen können in Abhängigkeit vom Induktor eigenständig Seneszenz induzieren	66
4	Diskussion	69
4.1	ZIS und ICB	69
4.2	Zellzyklusregulatoren	69
4.3	Mögliche Effekte des SASPs und einzelner Zytokine	71
4.4	Verschiedene Mechanismen der parakrinen Seneszenzinduktion	72
4.5	Therapeutische und wissenschaftliche Ausblicke	73
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	77
7	Erklärung zum Eigenanteil	86
8	Veröffentlichungen	87
9	Danksagung	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion von T_H1-Zellen mit Makrophagen und Tumorzellen im Kontext der Immuninvasion von Tumorgewebe über PD-1-vermittelte Apoptoseinduktion in T-Zellen. _____ 5

Abbildung 2: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in SK-MEL-28-Zellen durch Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 43

Abbildung 3: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in WM115-Zellen durch Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 44

Abbildung 4: Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) induzierte einen stabilen Wachstumsarrest und wenig bis keine Zytotoxizität (nach Homann et al. 2022). _____ 46

Abbildung 5: Regulation des Zellzyklusinhibitors p16 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 48

Abbildung 6: Regulation des Zellzyklusinhibitors p21 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 49

Abbildung 7: Regulation des Zellzyklusinhibitors p27 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 50

Abbildung 8: Regulation des Zellzyklusinhibitors p53 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). _____ 52

Abbildung 9: Charakterisierung des durch Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib ausgelösten Zellzyklusarrests in SK-MEL-28-Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). _____ 54

Abbildung 10: Charakterisierung des durch Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib ausgelösten Zellzyklusarrests in WM115-Melanomzellen (nach Homann et al. 2022).	55
Abbildung 11: Quantifizierung von SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) sowie entsprechende Kontrollen (Ctrl.) (nach Homann et al. 2022).	56
Abbildung 12: Genexpression von Zytokinen und Chemokinen in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022).	60
Abbildung 13: SASP-Analyse von seneszenten SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022).	64
Abbildung 14: Quantifizierung von ausgewählten Zytokinen im Überstand seneszenter Melanomzellen (nach Homann et al. 2022).	65
Abbildung 15: Induktion der SA- β -Gal-Aktivität in naiven SK-MEL-28-Melanomzellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium von Zytokin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022).	67
Abbildung 16: Induktion der SA- β -Gal-Aktivität in naiven WM115-Melanomzellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium von Zytokin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022).	68
Abbildung 17: Grafische schematische Zusammenfassung der Seneszenzinduktion im Melanom mit den Zytokinen IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib sowie der Effekte der SASP-Behandlung.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und deren Hersteller. _____	14
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmittel und deren Hersteller. _____	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer. _____	18
Tabelle 4: Lösungen und Puffer, die eigenständig hergestellt wurden. _____	20
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Reaktivität, Verdünnung, Hersteller und Artikelnummer. _____	21
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Verdünnung, Hersteller und Artikelnummer. _____	22
Tabelle 7: Verwendete Kits und Arrays mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer. _____	22
Tabelle 8: Verwendete Software mit Angabe der Version und des Entwicklers. _____	23
Tabelle 9: Mutationsstatus ausgewählter Gene in der SK-MEL-28- und WM115-Zelllinie (nach Castellano et al. 1997; Young et al. 2014). _____	24
Tabelle 10: PCR-Programm zur Durchführung der HPRT-PCR. _____	34
Tabelle 11: Programm zur Durchführung der qPCR im LightCycler® 480 II. _	35
Tabelle 12: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten humanen Primer. _	36
Tabelle 13: Bestückung einer PrimePCR Array Platte „Cytokines and Chemokines (SAB Target List) H96“ mit Markierung der Haushaltsgene und internen Arraykontrollen. _____	37
Tabelle 14: Protokoll für die Durchführung der qPCR-Array-Analysen in einem LightCycler® 480 II. _____	37
Tabelle 15: Bestückung einer Membran aus einem „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit“. _____	39
Tabelle 16: Statistische Analyse der Zellzyklusanalyse (Abbildung 11) mittels Two-way ANOVA, Angabe der p-Werte beim Vergleich der S-Phase der Behandlungen mit den entsprechenden Kontrollen (nach Homann et al. 2022). _____	57

Tabelle 17: Zellzahlen ($\times 10^6$) der in diesem Abschnitt untersuchten
Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). _____ 66

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Ampere
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BCA	Bichinchoninic Acid
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BRAF	Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	Complementary DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid
ddH ₂ O	Steriles, ultra-reines Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HD	Homozygote Deletion
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
ICB	Immun-Checkpoint-Blockade
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KM	Konditioniertes Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
MC	Mediumkontrolle
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mL	Milliliter

mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	Nicht determinierbar
NF κ B	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40 Substitute
NRAS	Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	Passage
Palbo	Palbociclib
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure

RP	Ribosomal Protein
s	Sekunde
SA- β -Gal	SA- β -Galactosidase
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBP	TATA Box Binding Protein
TBST	Tris-Buffered Saline with Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _H 1/2-Zelle	T-Helfer-1/2-Zelle
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TME	Tumor Microenvironment
TNF	Tumornekrosefaktor α
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
WT	Wildtyp
ZIS	Zytokin-induzierte Seneszenz
ZZ	Zellzahl
μ L	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom – zentrale epidemiologische und therapeutische Aspekte

Das maligne Melanom wird auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet und geht von den Melanozyten aus, den pigmentbildenden Zellen von Haut und Schleimhaut. Dabei stellt das maligne Melanom eine zunehmende Herausforderung für das Gesundheitswesen dar, denn seine Inzidenz steigt kontinuierlich an mit 325.000 neuen Fällen weltweit in 2020 (Arnold et al. 2022; Guy et al. 2015; Rastrelli et al. 2014). Die wichtigste Therapieoption eines lokal begrenzten Melanoms ist die operative Entfernung; die Behandlung eines metastasierten Melanoms ist allerdings deutlich komplexer und variabler. Vor der Entwicklung der modernen Immuntherapie basierte die medikamentöse Therapie eines metastasierten Melanoms vorwiegend auf traditionellen Chemotherapeutika wie dem Alkylanz Dacarbazin oder dem Vincaalkaloid Vincristin und konnte nur selten langfristig positive Resultate erzielen (Eigentler et al. 2003). Auch durch eine Polychemotherapie oder die Kombination von Chemotherapeutika mit Zytokinen wie Interferon (IFN)- α wurde lediglich ein medianes Gesamtüberleben von ungefähr zwölf Monaten erreicht (Eigentler et al. 2003). Glücklicherweise konnte mit der Entwicklung fortschrittlicher Immuntherapien die Behandlung des malignen Melanoms revolutioniert werden (Brenner und Röcken 2022; Homann et al. 2022): Basierend auf den Arbeiten der Nobelpreisträger von 2013, James P. Allison und Tasuku Honjo, wurde die Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) entwickelt, welche im weiteren Verlauf der Arbeit genauer erläutert wird (Allison und Krummel 1995; Freeman et al. 2000). Eine weitere wichtige Säule der Therapie des metastasierten malignen Melanoms sind Signaltransduktionsinhibitoren, welche zielgerichtet Proteine wie die Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf (BRAF) oder Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MEK) hemmen; beide Proteine liegen in der Signalkaskade unterhalb von Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog (NRAS), welches beim malignen Melanom häufig mutiert ist. Zytostatika-

basierte Therapieformen haben beim malignen Melanom allerdings nicht völlig an Bedeutung verloren, da sie bei Nichtinfragekommen überlegenerer Therapieschemata (bspw. ICB oder Signaltransduktions-inhibitoren) den Patienten¹ weiterhin als Option angeboten werden können. Bei solchen Patienten können Off-Label auch Zellzyklus-Inhibitoren wie Palbociclib zum Einsatz kommen, welche über Inhibition der Cyclin-Dependent Kinasen (CDK) 4/6 einen Zellzyklusarrest induzieren und so die Proliferation von Tumorzellen inhibieren (Brenner und Röcken 2022; Homann et al. 2022; Tang et al. 2018). In vielen Fällen sind aber Therapien effektiver, die auf eine Modulation des Immunsystems abzielen (Leonardi et al. 2020).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient der Erkennung und Entfernung von Pathogenen sowie krankhaften und entarteten körpereigenen Zellen. Es lässt sich gliedern in ein angeborenes Immunsystem auf der einen Seite und ein adaptives, spezifisches Immunsystem auf der anderen Seite. Beide Seiten der Immunantwort haben jeweils wiederum humorale und zelluläre Komponenten.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem beinhaltet sämtliche Mechanismen, die von Geburt an zur Abwehr möglicher Pathogene, z.B. Bakterien, bereitstehen. Die Erkennung dieser Erreger wird über bestimmte Rezeptoren vermittelt, welche konservierte Strukturen auf Pathogenen (sog. Pathogen-Associated Molecular Pattern) identifizieren können (Janeway 1989). Zu diesen Rezeptoren zählt u.a. die Familie der Toll-Like-Rezeptoren, welche schließlich über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) zur Auslösung einer Entzündungsreaktion führen können.

Zu den zellulären Komponenten der unspezifischen Abwehr zählen neben Granulozyten (neutrophil, eosinophil, basophil), Thrombozyten und Mastzellen

¹ In dieser Arbeit wird das generische Maskulinum verwendet; sofern nicht anders gekennzeichnet, sind stets alle Geschlechter gemeint.

auch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen. Die humoralen Bestandteile umfassen u.a. zytotoxische Enzyme, sog. Neutrophile Extracellular Traps, Zytokine (z.B. IFN- α) und die Komplementkaskade (Brinkmann et al. 2004).

Die Aktivierung und Reaktion des angeborenen Immunsystems erfolgt zwar unmittelbar bei einer Bedrohung durch Pathogene, ist aber eher wenig spezifisch und führt nicht zur Ausbildung einer anhaltenden Immunität.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Das Prinzip des spezifischen, adaptiven Immunsystems ist, dass zu beinahe jeder möglichen pathogenen Struktur ein passender, spezifischer Antikörper gebildet werden kann, um eine zielgerichtete Abwehr und langanhaltende Immunität zu gewährleisten. Diese pathogenen Strukturen können bspw. von Bakterien oder Viren, aber auch von entarteten Zellen stammen. Spezifische Antikörper stellen die humorale Komponente der adaptiven Abwehr dar und werden von B-Lymphozyten produziert, welche zusammen mit T-Lymphozyten und dendritischen Zellen (DZ) den zellulären Bestandteil des spezifischen Immunsystems ausmachen (Bonilla und Oettgen 2010).

Die Aktivierung und Stimulation der B-Zellen zur Antikörperproduktion ist ein komplexer Prozess. Zunächst werden pathogene Partikel von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), bspw. DZ oder Makrophagen, aber auch B-Zellen, phagozytiert und lysosomal prozessiert, bevor diese APZ auf ihrem Major Histocompatibility Complex (MHC)-II-Rezeptor ein 10-12 Aminosäuren langes Peptidfragment präsentieren, welches das Antigen darstellt (Rammensee et al. 1993). An diesen Antigen-beladenen MHC-II-Rezeptor kann (mit Kostimulation) eine naive Cluster of Differentiation (CD) 4⁺ T-Zelle über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) binden. Anschließend differenziert sich diese naive T-Zelle bspw. in eine T-Helfer (T_H)-1, -2, oder -17-Zelle, oder auch in eine regulatorische T-Zelle (T_{reg}) (Leung et al. 2010). Im Kontext dieser Arbeit sind die T_H1-Zellen besonders relevant. Diese T_H1-Zellen sezernieren nach Aktivierung und Differenzierung die Zytokine Interleukin (IL)-2 sowie IFN- γ und Tumornekrosefaktor α (TNF) (Hoyer et al. 2008). Das Zytokin IL-2 kann B-

Zellen zur klonalen Proliferation anregen, sofern ihr B-Zell-Rezeptor bereits an das Antigen gebunden hat (vermittelt durch eine APZ oder zufällig) (Hoyer et al. 2008). TNF hat ein sehr breites Wirkspektrum; immunologisch relevant sind vorwiegend die Aktivierung von NF- κ B (Hayden und Ghosh 2014) und die Stimulation von Makrophagen zur Phagozytose (Wang und He 2020). IFN- γ spielt nicht nur in der angeborenen, sondern auch in der adaptiven Abwehr eine zentrale Rolle: Dieses Zytokin induziert die Differenzierung, Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, reguliert die Expression von MHC-II in APZ hoch sowie aktiviert und stimuliert Makrophagen zur IL-12-Sekretion (Maraskovsky et al. 1989). IL-12 verstärkt nicht nur die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen und T_H1-Zellen, sondern stimuliert außerdem die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H1-Zellen (Jacobson et al. 1995).

Zusammengefasst wird durch die Sekretion der T_H1-Zell-Zytokine ein positiver Feedback-Loop initiiert, welcher zu einer starken Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt (**Abbildung 1**).

Um den positiven Feedback-Loop zu unterbrechen und eine überschießende Aktivität des Immunsystems zu vermeiden, kann Apoptose in T- und B-Zellen durch Bindung des Programmed Cell Death Protein Ligand 1 (PD-L1) an das von Immunzellen exprimierte Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) eingeleitet werden (Okazaki et al. 2002). Dieser Mechanismus dient auch dem Abschalten einer Immunantwort nach einer überstandenen Infektion (Wieder et al. 2018). PD-1 zählt zur Familie der Immun-Checkpoints, zu denen auch Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) gehört. Tumorzellen machen sich den Mechanismus der Apoptoseinduktion in Immunzellen über PD-1 zunutze, indem sie selbst verstärkt PD-L1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, um so die antitumorale Aktivität des Immunsystems zu schwächen (**Abbildung 1**) (Okazaki et al. 2002).

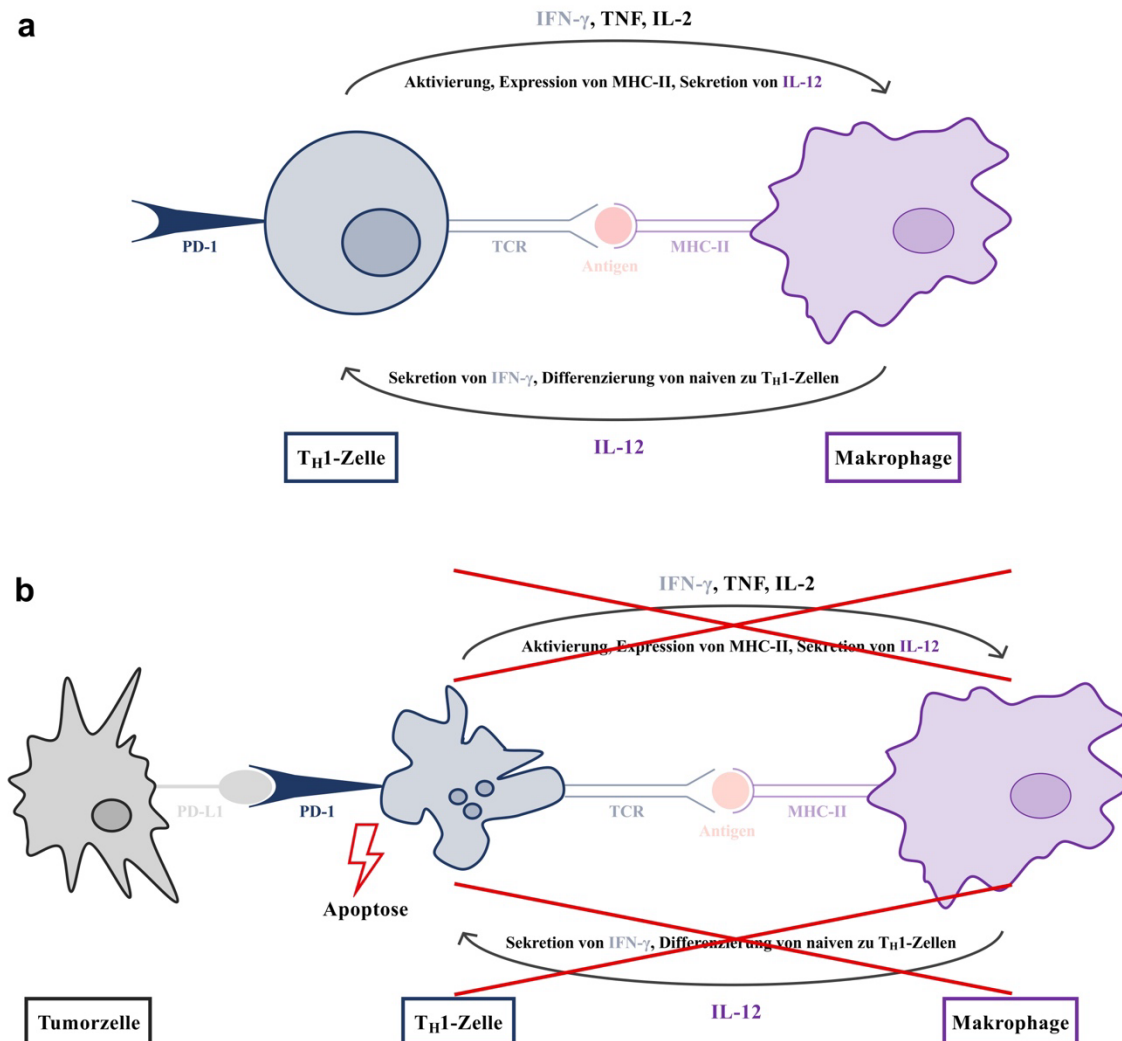


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion von T_H1 -Zellen mit Makrophagen und Tumorzellen im Kontext der Immunevasion von Tumorgewebe über PD-1-vermittelte Apoptoseinduktion in T-Zellen. Weitere Signalmoleküle wie bspw. die CD28/B7-Kostimulation werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. **a**, IL-12-vermittelte Differenzierung von naiven zu T_H1 -Zellen durch Makrophagen. **b**, Immunevasion von Tumorzellen durch PD-1-abhängige Apoptoseinduktion in benachbarten T_H1 -Zellen.

1.2.3 Die Immun-Checkpoint-Blockade

Die beiden Immun-Checkpoints PD-1 und CTLA-4, deren Aktivierung zu einer Schwächung der Immunantwort führt, können therapeutisch mithilfe von Antikörpern geblockt werden (Leach et al. 1996; Topalian et al. 2012; Wieder et al. 2018). Die ICB ist mittlerweile fester Bestandteil der Therapie zahlreicher Tumorerkrankungen, darunter auch der des malignen Melanoms. Die

Kombinationstherapie mit dem PD-1-Antikörper Nivolumab und dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab konnte bei Patienten mit einem Melanom im Stadium III oder IV ein Gesamtüberleben von etwa 50 % nach 5 Jahren erzielen (Homann et al. 2022; Larkin et al. 2019); die ICB hat die Therapie des malignen Melanoms damit revolutioniert (Brenner und Röcken 2022). Nichtsdestotrotz spricht etwa ein Viertel der Patienten nicht auf die ICB an (Larkin et al. 2019). Bei Non-Respondern auf die ICB liegen häufig Mutationen im Tumor vor, welche die Induktion eines bestimmten biologischen Phänomens verhindern (Brenner et al. 2020): Der zellulären Seneszenz.

1.3 Die zelluläre Seneszenz

1.3.1 Definition und Charakterisierung seneszenten Zellen

Die zelluläre Seneszenz wird häufig als Stressreaktionsprogramm bezeichnet, wobei eine große Vielfalt an Stressoren Seneszenz in einer Zelle auslösen kann (Campisi 2013; Gorgoulis et al. 2019). Bereits 1961 beobachteten Hayflick und Moorhead, dass gesunde Zellen sich nur begrenzt häufig teilen (Hayflick und Moorhead 1961). Da mit jeder Teilung die Telomere etwas kürzer werden, wird die Proliferation nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen gestoppt (sog. Hayflick-Limit), um DNA-Schäden zu verhindern. Dieser Zustand eines Wachstumsarrests nach Erreichen des Hayflick-Limits wird als replikative Seneszenz bezeichnet (Victorelli und Passos 2017). Auch durch die Aktivierung von Onkogenen wie *NRAS* kann Seneszenz induziert werden (Takaoka et al. 2004; Kang et al. 2011), ebenso durch Röntgenstrahlen (Suzuki et al. 2001). Im Kontext der Therapie des malignen Melanoms ist besonders relevant, dass durch die T_H1 -Zell-Zytokine $IFN-\gamma$ und TNF, durch Zytostatika und durch Zellzyklusinhibitoren ebenfalls Seneszenz induziert werden kann (Bi et al. 2021; Braumüller et al. 2013; Prasanna et al. 2021; Müller-Hermelink et al. 2008; Homann et al. 2022).

Senescente Zellen besitzen einige definierte Merkmale. Dabei muss eine Zelle neben einem stabilen Wachstumsarrest nicht alle weiteren Merkmale

aufweisen, um als seneszent beschrieben werden zu können. Zu den Charakteristika seneszenter Zellen gehören eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (SA- β -Gal), ein veränderter Stoffwechsel, makromolekularer Schaden sowie eine verstärkte sekretorische Aktivität (Gorgoulis et al. 2019; Ou et al. 2021). Auch verändert sich die zelluläre Morphologie, so dass seneszente Zellen einen breiteren und flacheren Zelleib aufweisen als nicht-seneszente (Campisi 2013). Der Wachstumsarrest manifestiert sich durch Hochregulation von Zellzyklusregulatoren wie p16, p21 oder p27, die verminderte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und durch Reduktion von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Lee und Schmitt 2019). Speziell im Melanom ist häufig *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A* (*CDKN2A*) mutiert (wie auch bei der WM115-Zelllinie, welche in dieser Arbeit verwendet wird), welches p16 kodiert, so dass p21 für die Induktion eines stabilen Wachstumsarrests von großer Bedeutung ist (Castellano et al. 1997; Young et al. 2014; Funck et al. 2020). p21 selbst ist ein nachgeschaltetes Zielmolekül des Tumorsuppressors p53 (Engeland 2022), kann aber auch durch andere Faktoren wie z.B. NF- κ B induziert werden (Nicolae et al. 2018). Der Zellzyklusregulator p27 ist insgesamt weniger mit Seneszenz als mit Quieszenz assoziiert (Chu et al. 2008; Gorgoulis et al. 2019); Quieszenz beschreibt einen instabilen, reversiblen Wachstumsarrest in der G₀-Phase des Zellzyklus (Nik Nabil et al. 2021). Ein weiteres Merkmal seneszenter Zellen ist die Sekretion zahlreicher Faktoren in ihre Umgebung, die als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) zusammengefasst werden (Birch und Gil 2020; Coppé et al. 2008); Teil des SASPs sind typischerweise proinflammatorische Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren.

1.3.2 Biologische und therapeutische Aspekte der Seneszenz

Generell wird als favorisiertes Ergebnis einer Tumorthherapie die vollständige Entfernung des Tumors angesehen, bspw. durch eine Operation oder durch medikamentöse Induktion von Apoptose in den Tumorzellen mithilfe der ICB oder einer Therapie mit Zytostatika oder Zellzyklusinhibitoren. Dabei ist die Reaktion eines Tumors auf eine medikamentöse Therapie heterogen: Ein Teil

der Tumorzellen reagiert tatsächlich mit Apoptoseinduktion auf die äußeren Stressoren, während andere Zellen stattdessen in Seneszenz gehen (Fulda et al. 2010). Damit ist bei Apoptose-resistenten Tumoren die Seneszenzinduktion eine wichtige Form der Tumorkontrolle (Wieder et al. 2017).

Weiterhin könnte eine Therapie, welche als Ziel die Seneszenzinduktion in Tumorzellen hat und nicht die Zerstörung sämtlicher maligner Zellen, als nicht-destruktive Alternative der Tumorkontrolle letztlich mit weniger Nebenwirkungen für den Patienten einhergehen als eine klassische zytotoxische Therapie (Wieder et al. 2017).

Andererseits wird die Seneszenzinduktion nicht selten als unerwünschter Nebeneffekt von Tumorthapien beschrieben, was vor allem den Effekten des proinflammatorischen SASPs geschuldet ist (Coppé et al. 2010; Gorgoulis et al. 2019). Senescente Zellen entstehen nicht nur im Rahmen einer Tumorthapie, sondern akkumulieren im Laufe des Lebens eines Individuums und fördern im Alter durch ein zunehmend entzündliches Milieu degenerative und hyperplastische Erkrankungen (Campisi 2013; Salminen et al. 2011). Substanzen, mit denen senescente Zellen spezifisch eliminiert werden können (sog. Senolytika), sind daher Gegenstand aktueller Forschung (Kirkland und Tchkonja 2020).

Wichtig zur differenzierten Betrachtung der heterogenen und vermeintlich gegensätzlichen SASP-vermittelten Effekte seneszenter Zellen ist der 1957 von George Williams geprägte Begriff der antagonistischen Pleiotropie. Dieser besagt, dass Mechanismen, welche einen positiven Effekt auf das Überleben eines Individuums in seinen früheren Lebensjahren haben, in den späten Jahren für dieses Individuum nachteilig sind (Williams 1957). Tatsächlich spielt die Seneszenz bei einigen Prozessen eine wichtige Rolle, die für ein junges Individuum von Vorteil sind: Tumorsuppression durch Seneszenzinduktion in Tumorzellen, Aktivierung und Förderung einer gegen Tumorzellen gerichteten Immunantwort durch den proinflammatorischen SASP und verbesserte Reparatur von defektem Gewebe (bspw. Wundheilung) durch Reduktion von Fibrose (Jun und Lau 2010). Auch in Immunzellen kann zum Zweck einer

Regulation der Immunantwort Seneszenz induziert werden; durch T_{reg}-Zellen ausgelöste (Effektor-)T-Zell-Seneszenz ist einer der Mechanismen, die eine überschießende Immunreaktion verhindern können (Cudejko et al. 2011; Santoro et al. 2018).

Sämtliche dieser Effekte sind jedoch sehr wahrscheinlich für jedes Individuum unabhängig vom Lebensalter eher vorteilhaft. Dass seneszente Zellen im Alter dennoch als krankheitsfördernd beschrieben werden, kann daran liegen, dass sie nicht mehr transient bestehen und vom Immunsystem abgeräumt werden, sondern dauerhaft akkumulieren und ein längerfristiges proinflammatorisches Milieu erzeugen. So konnte durch das Abräumen seneszenter Zellen in einem Mausmodell für Alzheimer-Demenz die zerebrale Konzentration von A β - und Tauprotein verringert sowie die Gedächtnisleistung verbessert werden (Liu 2022; Zhang et al. 2019).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass seneszente Zellen kontextabhängig sowohl protektive als auch krankheitsfördernde Effekte haben können und eine zeitige Elimination ein Schlüssel dafür sein könnte, eine schädliche Wirkung zu reduzieren.

1.3.3 Der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp

Seneszente Zellen vermitteln ihre Effekte maßgeblich über den SASP. Die Zusammensetzung des SASPs hängt von der Art der Seneszenzinduktion, dem Zelltyp und der Umgebung der Zellen ab und ist daher äußerst vielfältig (Coppé et al. 2010; Coppé et al. 2008; Tchkonja et al. 2013). Eine vollständige Darstellung aller SASP-Faktoren und ihrer biologischen Relevanz würde den Rahmen einer Doktorarbeit überschreiten, so dass sich dieser Abschnitt auf die Funktion einzelner proinflammatorischer Faktoren fokussiert. Für eine stetig aktualisierte und umfassende Zusammenstellung der SASP-Faktoren sei an dieser Stelle auf die Website <http://www.saspatlas.com> verwiesen, welche vom Buck Institute for Research on Aging in California, USA betrieben wird.

Zentrale Bestandteile des SASPs sind entzündungsfördernde Zytokine und Chemokine wie IL-6, IL-7, IL-8 oder C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 (CXCL10) und CXCL11 sowie verschiedene Wachstumsfaktoren (CXCL1,

Hepatocyte Growth Factor oder Insulin-Like-Growth-Factor-Binding-Proteins) (Coppé et al. 2008); dementsprechend ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B wichtig für die positive Regulation des SASPs (Salminen et al. 2012). Im Kontext einer Tumorthherapie konnten für einige dieser Faktoren sowohl pro- als auch antitumorale Effekte gezeigt werden. Die Effekte ausgewählter SASP-Faktoren werden im Einzelnen in **Abschnitt 4** (Diskussion) besprochen.

Zusammenfassend sind die zentralen Bestandteile des SASPs proinflammatorische Faktoren, welche kontextabhängig pro- oder antitumorale Effekte vermitteln.

1.3.4 Die Zytokin-induzierte Seneszenz

Eine der wichtigsten Therapiesäulen des metastasierten malignen Melanoms, die ICB, geht mit einer verminderten T-Zell-Inhibition und damit einer Steigerung der T-Zell-Aktivierung einher (Brenner et al. 2020). Aktive CD4⁺-T_H1-Zellen sezernieren u.a. die Zytokine IFN- γ und TNF, deren Effekte in **Abschnitt 1.2.2** kurz umrissen wurden. Eine weitere wichtige Funktion dieser Zytokine ist die Induktion eines Wachstumsarrests bzw. von Seneszenz in Tumorzellen (Braumüller et al. 2013; Müller-Hermelink et al. 2008). Ursprünglich in einem Maus-Insulinom-Modell als T_H1-Zell-Zytokin-vermittelter p16-abhängiger Signalweg beschrieben, wurden einige weitere Phänotypen der Zytokin-induzierten Seneszenz (ZIS) beobachtet (Rentschler et al. 2022), bspw. in der MCF-7-Brustkrebszelllinie (Rentschler et al. 2018) oder p21-abhängig im Melanom (Funck et al. 2020). Ansonsten wird die ZIS mit den im **Abschnitt 1.3.1** beschriebenen Merkmalen typischer seneszenten Zellen charakterisiert. Die fundamentale klinische Bedeutung der ZIS zeigt sich insbesondere darin, dass bei denjenigen Melanompatienten das Ansprechen auf eine ICB massiv reduziert ist, deren Melanom Mutationen in Seneszenz-induzierenden Signalwegen aufweist (Brenner et al. 2020).

Der SASP im Kontext von ZIS wurde bisher kaum untersucht. Eine Studie hat gezeigt, dass IL-1 β , Matrix Metalloproteinase 9, C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2), IL-8 und weitere proinflammatorische Faktoren vermehrt von seneszenten Melanomzellen freigesetzt wurden, nachdem sie mit dem

konditionierten Medium behandelt worden sind, welches aus einer Co-Kultur von Monozyten und NK-Zellen stammte; dieses konditionierte Medium setzte sich allerdings nicht aus den T_H1-Zell-Zytokinen IFN- γ und TNF zusammen, sondern v.a. aus IL-8, CCL3 sowie CCL4 (Funck et al. 2020) und ist daher kein Modell für die direkt durch T_H1-Zell-Zytokine vermittelte Seneszenz, welche im Kontext der ICB höchst relevant ist.

1.3.5 Die Therapie-induzierte Seneszenz

Der Begriff der Therapie-induzierten Seneszenz (TIS) beschreibt ein sehr heterogenes Phänomen, da es sämtliche Seneszenz-auslösende Medikamente umfasst; einige Quellen zählen sogar auch die Strahlungs-induzierte Seneszenz zur TIS (Ewald et al. 2010; Mikula-Pietrasik et al. 2020). Auch die TIS wird mit den in **Abschnitt 1.3.1** beschriebenen Merkmalen typischer seneszenten Zellen charakterisiert. Diese Arbeit fokussiert sich auf diejenige TIS, welche im Kontext der Therapie eines metastasierten Melanoms auftritt. Daher werden im weiteren Verlauf die Seneszenzphänotypen, welche von CDK4/6-Inhibitoren und Zytostatika ausgelöst werden, genauer untersucht. Zwar spielen BRAF- oder MEK-Inhibitoren eine deutlich wichtigere Rolle in der Melanomtherapie als Zytostatika, jedoch ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit die Datenlage zur Frage, ob durch diese Substanzen überhaupt eine stabile Seneszenz induziert werden kann, nicht eindeutig (Haferkamp et al. 2013). Für die vorliegende Arbeit wurden der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib sowie das Chemotherapeutikum Doxorubicin zur Induktion der TIS ausgewählt. Palbociclib wurde in den letzten Jahren als Seneszenzinduktor in zahlreichen Krebsmodellen etabliert, darunter auch dem Melanom (Bayer et al. 2022; Bi et al. 2021; Jost et al. 2021), und wird bereits Off-Label zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms eingesetzt (Brenner und Röcken 2022; Tang et al. 2018). Doxorubicin wird schon seit langer Zeit als sicherer Seneszenzinduktor in vielen Krebsmodellen verwendet (Elmore et al. 2002; Hwang et al. 2020; Sultana et al. 2010); vor Kurzem wurde außerdem gezeigt, dass vesikuläres Doxorubicin, welches mit Polyethylenglycol stabilisiert wurde, *in vivo* eine Reduktion der Tumormasse eines Melanoms bewirken konnte (Patras et al. 2022).

Der SASP im spezifischen Kontext der durch Doxorubicin und Palbociclib ausgelösten Seneszenz ist wenig erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass seneszente Fibroblasten nach Behandlung mit Doxorubicin verstärkt IL-1 β , CXCL1, CXCL10, CCL5 und weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt haben (van Vliet et al. 2021). Huang et al. haben gezeigt, dass seneszente Kardiomyozyten nach Doxorubicin-Behandlung die mRNA von *IL1B*, *IL6*, *IL12* und *TNF* sowie den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher ein positiver Regulator des SASPs ist, verstärkt exprimiert haben; die Sekretion und damit letztlich den SASP haben Huang et al. allerdings nicht untersucht (Huang et al. 2021). Nach Palbociclib-Behandlung exprimierten seneszente Fibroblasten verstärkt *IL1B*, *IL6* und *IL8* (Bayer et al. 2022). Seneszente Melanomzellen speicherten während der Palbociclib-Behandlung diesen Zellzyklusinhibitor in Vesikeln und setzten ihn nach Behandlungsende an die Umgebung frei (Llanos et al. 2019); das sezernierte Palbociclib wurde allerdings nicht von der Zelle selbst produziert und sollte daher nicht dem SASP zugerechnet werden.

Zusammengefasst besteht der SASP von seneszenten Melanomzellen während TIS vornehmlich aus proinflammatorischen Molekülen wie IL-1 β , IL-8 und verschiedenen Chemokinen. Die Wirkung des SASPs ist in diesem Zusammenhang allerdings abhängig von der Konzentration der freigesetzten Faktoren; noch ist unklar, ob sich die Konzentration an sezernierten Molekülen bei ZIS und TIS im Melanom unterscheidet.

1.4 Fragestellung

Obwohl der ZIS eine herausragende Bedeutung für das Ansprechen der ICB im Melanom zukommt, ist nur wenig über den SASP von Melanomzellen während ZIS bekannt. Dabei gilt der SASP als zentraler Vermittler der positiven wie auch negativen Effekte, welche seneszente Zellen auf ihre Umgebung haben können. Ein genaueres Verständnis über die Komposition und Wirkung des SASPs könnte helfen, das Ansprechen von Melanopatienten auf eine Therapie mit ICB, Chemotherapeutika oder Zellzyklusinhibitoren zu erklären, und Wege aufzeigen, die Melanomtherapie weiter zu optimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei humanen Melanomzelllinien, SK-MEL-28 und WM115, Seneszenz auf drei verschiedenen Wegen induziert: (i) mit den Zytokinen IFN- γ und TNF, (ii) dem Chemotherapeutikum Doxorubicin und (iii) dem CDK4/6-Inhibitor Palbociclib. Verschiedene Seneszenzmarker wie die Expression der SA- β -Gal, der permanente Wachstumsarrest, der Zellzyklusarrest und die Hochregulation von Zellzyklusregulatoren wurden sowohl zum Zeitpunkt der Seneszenzinduktion als auch 48 h später gemessen. Dabei sollte die individuelle Dynamik der verschiedenen Seneszenz-Phänotypen analysiert bzw. bestätigt werden, dass zum Zeitpunkt der SASP-Analysen – 48 h nach Ende der Behandlungen – die große Mehrheit der Zellen tatsächlich seneszent war. Anschließend wurde mit qPCR-Arrays auf mRNA-Ebene die Genexpression von 84 Zytokinen und Chemokinen 48 h nach Wegnahme der jeweiligen Seneszenzinduktoren bestimmt. Dieser Zeitverlauf sollte sicherstellen, dass keine akute Reaktion der Melanomzellen auf die verschiedenen Behandlungen gemessen wurde. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Überstände auf Protein-Ebene analysiert und densitometrisch mittels Proteome Profiler Arrays die Konzentration von 105 verschiedenen Faktoren gemessen, welche üblicherweise mit dem SASP in Verbindung gebracht werden. In einem abschließenden Experiment wurden naive SK-MEL-28- und WM115-Zellen mit den verschiedenen konditionierten Medien behandelt, um festzustellen, ob die einzelnen SASPs eigenständig Seneszenz in Melanomzellen induzieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Abzugshaube Airflow controller AC2	Waldner Laboreinrichtungen
Brutschränke Hera Cell 240 Heraeus T6 CO ₂ -Inkubator CB210	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Binder
Chemilumineszenz-Imager LI-COR Odyssey Imaging System	LI-COR Biosciences
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson
Elektrophoresekammern Wide Mini Sub Cell GT Mini-PROTEAN Tetra Cell Vertical Electrophoresis System	Bio-Rad Bio-Rad
ELISA-Reader Original Multiscan Ex	Thermo Fisher Scientific
Flockeneisbereiter Flake Ice Maker AF 156	Scotsman Ice
Gelkammer Mini PROTEAN Tetra	Bio-Rad
Gelkamm Mini-PROTEAN Gel Combs 15-Well	Bio-Rad
Gelständer Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Stands & Casting Frames	Bio-Rad
Heizblock HB-LS2	VLM

Impulsversiegeler Vacuum Impulse Sealer CASO VC 10	CASO Design Braukmann
Kleinschüttler MS2 Minishaker	IKA
Kryo-Einfriergerät Nalgene Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific
Mikroskope AxioCam 208 Color Axiovert 200 Fluorescence DM IL LED	Zeiss Zeiss Leica
Neubauer-Zählkammer Neubauer Improved (0,1 mm Tiefe / 0,0025 mm ²)	Glaswarenfabrik Karl Hecht
PCR-Thermocycler Mastercycler gradient Primus 96 advanced Cyclor Primus 96 plus MWG	Eppendorf Peqlab Biotech
pH-Meter Modell II CG842	Schott
Photometer BioPhotometer 6131	Eppendorf
Pipettierhilfen Modell Research Modell Research Multichannel Modell Research Plus Modell Research Plus Multichannel Multipette M4 PIPETBOY/PIPETGIRL	Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf Integra Biosciences
qPCR-Maschine Light Cycler 480	Roche
Semidry Blot Trans-Blot Turbo	Bio-Rad

Spacer Plates Mini-PROTEAN Spacer Plates (1,5 mm)	Bio-Rad
Spannungsgeräte PowerPac Basic PowerPac 300	Bio-Rad Bio-Rad
Sterilbänke HeraSafe KS 18 MSC-Advantage Airstream Class II BSC	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Esco Technologies
Stickstofftank Liquid Nitrogen Storage Cylinder XL-240	Taylor Wharton Germany
Ultratiefkühlschränke HERAfreeze Cryogenic Storage System CryoCE 24K	Thermo Fisher Scientific Taylor Wharton Germany
UV-Transluminator RH-5.1 Dunkelraum mit Easy 442K Kamera	Herolab
Waagen CP224SOCE Laborwaage EW1500-2M	Sartorius Kern
Wasserbad WB22	Medingen
Wippen STR8 Rocking Platform Sky Line DRS-12	Stuart Scientific Elmi
Zentrifugen Biofuge <i>pico</i> Biofuge <i>fresco</i> Multifuge 3 S-R Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge Z306	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Biozym Hermle

2.1.2 Verbrauchsmittel

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmittel und deren Hersteller.

Verbrauchsmittel	Hersteller
Gefäße	
Polypropylen-Teströhrchen 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One
Safe-Lock Tubes 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Polystyrene Round-Bottom Tube 5 mL	Corning
PCR 8er-SoftStrips, 0,2 mL	Biozym
Titertube® Micro Test Tubes	Bio-Rad
UV-transparente Küvette 4 mL	Sarstedt
Membranen	
Immobilon-FL Transfer-Membran	Sigma Aldrich
Whatman 17 Chr cellulose chromatography paper	GE Healthcare Life Science
Pipetten	
Ungestopfte Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Starlab
Gestopfte Pipettenspitzen Safe Seal Tips 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Biosphere
Stripette 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Corning
Zellkultur und Platten	
Cell Culture Flasks 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturtestplatten 96F	TPP
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Corning
Deep Well Plate, 96-Well, Round Wells	VWF
Cell Scraper	Corning
96 Well PCR Platte, farblos, LC 480	Biozym
Cryo-s Freezing Tube	Greiner Bio-One

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.

Chemikalie/Lösung	Hersteller	Artikelnummer
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco	25300-054
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3148
4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid (DAPI)	Thermo Fisher Scientific	D1306
Agarose Standard	Roth	3810.3
Albumin fraction V from bovine serum	Roth	8076.4
Ammoniumpersulfat	Merck	A3678
Ampuwa Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi	B23067A
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	F7524
Bromphenolblau	Roth	A512.1
cOplete EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail, Tablets provided in <i>EASY</i> packs	Merck	04693132001
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	A994.1
dNTP -Mix	Thermo Fisher Scientific	AB0196
Doxorubicin hydrochlorid	Sigma-Aldrich	D1515
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich	D8537
Ethanol (EtOH)	VWR International	20821.330
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich	F7524
Glycin	Roth	3908.2
HEPES Buffer Solution, 1 M	Biochrom	L1613
Intercept Blocking Buffer	LI-COR Biosciences	927-70001
Isopropylalkohol	Honeywell International	33539-2
MEM Aminosäurenlösung	Biochrom	K0363
Methanol (MeOH)	Honeywell Int.	32213-2
N,N-Dimethylformamid	Roth	6251.1

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck	T9281
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	3957.1
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich	D6750
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	5136.1
Natriumpyruvat	Biochrom	L0473
Nonidet P-40 Substitute (NP-40)	Sigma Aldrich	74385
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR Biosciences	927-40000
PageRuler Plus Pre-stained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26619
Palbociclib	Thermo Fisher Scientific	50-205-4616
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (10.000 U/ml Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Biochrom	A2213
Rekombinantes humanes IFN-gamma	R&D Systems	285-IF
Rekombinantes humanes TNF-alpha	R&D Systems	210-GMP
Rotiphorese Gel 30	Roth	3029.1
RPMI 1640 Medium	Gibco	21875-034
Salzsäure (HCl)	Roth	4625.1
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad	1725271
Taq-Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific	B38
Taq-Polymerase	Bio & Sell	BS91.711
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Blotting Grade	Roth	0188.2
Triton X-100	Roth	3051.2
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Gibco	16250-061
Tween 20	Roth	9127.1

2.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer, die eigenständig hergestellt wurden.

Name	Zusammensetzung	Volumen/Konzentration
Laemmli Puffer, pH 6,8	2-Mercaptoethanol	10 %
	Bromophenolblau	0,004 %
	Glycerol	20 %
	SDS	4 %
	TRIS-HCl, pH 8,0	125 mM
Laufpuffer (10X)	Glycin	1,9 M
	SDS	1 %
	TRIS	249 mM
RIPA Lysispuffer	NaCl	150 mM
	Natriumdesoxycholat	0,5 %
	NP-40	1,0 %
	SDS	0,1 %
	TRIS-HCl, pH 8,0	50 mM
Sammelgel (5 %)	Acrylamidlösung 30 %	833 µL
	APS Lösung 10 %	50 µL
	ddH ₂ O	2,8 mL
	SDS-Lösung 10%	50 µL
	TEMED	5 µL
	TRIS Puffer 1,5 M, pH 8,8	1,25 mL
TBS + Tween 20 (TBST)	10X TBS 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen und 0,05 % Tween 20 dazugeben	
Transferpuffer, pH 8,5	Glycin	29 mM
	MeOH	20 %
	SDS	0,038 %
	TRIS	48 mM
TRIS-Buffered Saline (TBS; 10X), pH 7,6	NaCl	0,2 M
	TRIS	1,37 M

Trenngel (12 %)	Acrylamidlösung 30 %	4,0 mL
	APS Lösung 10 %	100 µL
	ddH ₂ O	3,3 mL
	SDS-Lösung 10%	100 µL
	TEMED	10 µL
	TRIS Puffer 1,5 M, pH 8,8	2,5 mL
TRIS-Puffer für das Sammelgel, pH 6,8	SDS	0,4 %
	TRIS	0,5 M
TRIS-Puffer für das Trenngel, pH 8,8	SDS	0,4 %
	TRIS	1,5 M
Zellkulturmedium	FCS	50 mL
	HEPES Buffer	5 mL
	MEM Aminosäuren	5 mL
	Natriumpyruvat	5 mL
	Pen/Strep	5 mL
	RPMI 1640 Medium	500 mL

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Angabe von Reaktivität, Verdünnung, Hersteller und Artikelnummer.

Target	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
β-Aktin	Mouse anti-human	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc.	MAB1501R
p16 ^{Ink4a}	Rabbit anti-human	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc.	80772
p21 ^{Waf1/Cip1}	Rabbit anti-human	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc.	2947
p27 ^{Kip1}	Rabbit anti-human	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc.	3686
p53	Rabbit anti-human	1:500	Santa Cruz	sc-126

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Verdünnung, Hersteller und Artikelnummer.

Name	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
IRDye 680RD anti-mouse	1:15.000	LI-COR Biosciences	926-68070
IRDye 800CW anti-rabbit	1:15.000	LI-COR Biosciences	926-32211
IRDye 800CW anti-Streptavidin	1:2000	LI-COR Biosciences	926-32230

2.1.6 Kits und Arrays

Tabelle 7: Verwendete Kits und Arrays mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.

Kit/Array	Hersteller	Artikelnummer
APC BrdU Flow Kit	BD Biosciences	552598
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen	C20300
Human IL-12 p70 DuoSet ELISA	R&D Systems	DX1270
Human IL-1beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY201
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY206
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY208
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	1708890
KAPA SYBR Fast qPCR Kit	Roche	KK4601
NucleoSpin RNA, Mini Kit for RNA purification	Macherey-Nagel	740955
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
PrimePCR™ Cytokines and chemokines (SAB Target List) H96	Bio-Rad	10034128
Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit	R&D Systems	ARY022B
Senescence Detection Kit (SA-beta-gal Staining)	AssayGenie	CV0018

2.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software mit Angabe der Version und des Entwicklers.

Software	Version	Entwickler
Ascent Software for Multiskan	2.6	Thermo Fisher Scientific
Axiovision SE64	4.9.1	Zeiss
EndNote	20.4	Clarivate Analytics
FACSDiva™ Software	9.0	BD Biosciences
FlowJo	10.8.0	BD Biosciences
Image Studio Lite	3.1	LI-COR Biosciences
ImageJ	1.53a	Wayne Rasband
LightCycler® 480 SW	1.5.1	Roche
Microsoft Excel	16.59	Microsoft Corporation
Odyssey SA Software	1.1	LI-COR Biosciences
PrimePCR™ Analysis	1.0.030.1023	Bio-Rad
Prism 9	9.1.2	GraphPad
SPSS Statistics	29.0.0.0	IBM

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Die SK-MEL-28- und die WM115-Zelllinie wurden in dieser Arbeit als *in vitro* Modell für die Seneszenz im humanen Melanom genutzt. Während die SK-MEL-28-Zelllinie aus dem Primärtumor eines 51-jährigen Mannes isoliert wurde (Carey et al. 1976), wurde für die Generierung der WM115-Zelllinie die Melanommetastase einer 55-jährigen Frau verwendet (Herlyn et al. 1985). In **Tabelle 9** wird der Mutationsstatus ausgewählter Gene beider Zelllinien dargestellt (Castellano et al. 1997; Young et al. 2014). Die SK-MEL-28-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Birgitt Schittek von der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen und die WM115-Zelllinie von Prof. Dr. Tobias Feuchtinger von der Universitätskinderklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9: Mutationsstatus ausgewählter Gene in der SK-MEL-28- und WM115-Zelllinie (nach Castellano et al. 1997; Young et al. 2014). WT, Wildtyp. HD, Homozygote Deletion.

Gen	SK-MEL-28	WM115
<i>BRAF</i>	V600E	V600D
<i>CDK4</i>	R24C	WT
<i>NRAS</i>	WT	WT
<i>CDKN2A</i>	WT	HD

2.2.2 Zellkultur

Die Zellen der SK-MEL-28- und der WM115-Zelllinie wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit RPMI 1640 Medium kultiviert, welches wie im **Abschnitt 2.1.4** beschrieben um einige Komponenten ergänzt wurde. Die Ernte erfolgte für beide Zelllinien nach folgendem Schema: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 37 °C warmem Trypsin überschichtet. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Trypsin mit der dreifachen Menge an 37 °C warmem Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das

trockene Zellpellet im Volumen $V_{\text{Verdünnung}}$ Medium gelöst (normalerweise Volumina zwischen 50 μL und 2 mL). Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Suspension mit Trypanblau um den Verdünnungsfaktor VF verdünnt (i.d.R. 1:5 – 1:20) und anschließend mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt, wobei der Mittelwert aus den vier äußeren Großquadraten (MW_{GQ}) ermittelt wurde. Zur Bestimmung der Zellzahl (ZZ) wurde folgende Formel verwendet:

$$ZZ = MW_{GQ} * V_{\text{Verdünnung in ml}} * VF * 10.000$$

Anschließend wurden je nach Bedarf Zellen neu ausgesät oder für die Lagerung im Stickstoff-Zelltank bei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorbereitet. Zur Kryolagerung wurde ein Zellpellet zweimalig mit PBS gewaschen, danach in einer 1:10 DMSO-FCS-Lösung gelöst, in ein Kryo-Röhrchen überführt, anschließend mithilfe eines Kryoeinfriergeräts um $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf zunächst $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und schließlich auf $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt.

2.2.3 Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib

Die Behandlung mit Zytokinen und Palbociclib war bei beiden Zelllinien identisch: Über einen Zeitraum von 96 h wurden die Zellen entweder für die Zytokinbehandlung mit 125 ng/mL IFN- γ und 12,5 ng/mL TNF (Braumüller et al. 2013) oder für die Palbociclibbehandlung mit 8 μM Palbociclib behandelt. Dabei hat die Behandlung stets 24 h nach Aussaat der Zellen in einem je nach Versuch geeigneten Kulturgefäß begonnen. Für die Doxorubicinbehandlung wurden die SK-MEL-28-Zellen mit 50 nM und die WM115-Zellen mit 25 nM Doxorubicin für 24 h behandelt, anschließend das Doxorubicin durch Medium ersetzt und darin für weitere 72 h inkubiert. Die Zytokine wurden in PBS gelöst, die IFN- γ - und TNF-Stocklösungen hatten jeweils eine Konzentration von 100 mg/mL. Die beiden Therapeutika wurden in DMSO gelöst; Doxorubicin wurde als Stock-Lösung in einer Konzentration von 1 mM, Palbociclib in einer Konzentration von 5 mM angesetzt. Alle weiteren Verdünnungen von Zytokinen und Therapeutika wurden mit Kulturmedium durchgeführt. Eine entsprechende Menge an DMSO in Kulturmedium wurde in den Versuchen als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

2.2.4 Konditioniertes Medium

Die Überstände von seneszenten Melanomzellen wurden 48 h nach Ende der jeweiligen Behandlung (und damit verbundener Wegnahme der Seneszenzinduktoren inklusive eines kompletten Mediumwechsels) abgenommen; diese Überstände werden als konditioniertes Medium (KM) bezeichnet. Die unterschiedlichen KM wurden zur Analyse von SASP-Faktoren sowie als Behandlung von naiven, nicht-seneszenten SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen verwendet. Um die KM zu generieren, wurden alle Kulturschalen nach Ende der 96-stündigen Inkubation mit PBS gewaschen. Danach wurden die seneszenten Melanomzellen weitere 48 h in frischem Medium kultiviert. Abschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert, in Zentrifugierröhrchen überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bis zur Analyse bzw. Behandlung. Das Medium, welches von Zytokin-behandelten Melanomzellen konditioniert wurde, wird als I+T-KM bezeichnet, entsprechend wird das von Doxorubicin- bzw. Palbociclib-behandelten Zellen veränderte Medium als Doxo- bzw. Palbo-KM beschrieben. Die Analysen wurden mit Proteome Profiler Arrays (s. **Abschnitt 2.2.15**) und Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) (s. **Abschnitt 2.2.16**) durchgeführt. Naive SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen wurden mit je 100 μL der verschiedenen KM für 96 h behandelt, wobei in 96-Well-Plates 2500 SK-MEL-28- bzw. 3500 WM115-Zellen pro Vertiefung ausgesät wurden, bevor die im nächsten Abschnitt beschriebenen Färbungen durchgeführt wurden.

2.2.5 SA- β -Gal- und DAPI-Färbung

Die Bestimmung der SA- β -Gal-Aktivität wurde in Anlehnung an Braumüller et al. (2013) durchgeführt. Die Aktivität der SA- β -Gal wurde mithilfe des Senescence Detection Kits von Assay Genie bestimmt. Der Assay wurde größtenteils gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Auf 96-Well-Platten wurden 2500 SK-MEL-28- bzw. 3500 WM115-Zellen pro Vertiefung ausgesät. Im Anschluss an die 96-stündigen Behandlungen (s. **Abschnitt 2.2.3**) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Vor und nach jedem Waschen wurden die Platten 1 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Zur Fixierung wurde zunächst der Formaldehyd- und Glutaraldehyd-haltige Fixierpuffer 1:10 in Wasser verdünnt.

Danach wurden die Platten mit 50 μ L des verdünnten Fixierpuffers pro Vertiefung für 10 min auf Raumtemperatur inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Für die anschließende Färbung wurden 100 μ L Färbelösung pro Vertiefung verwendet; 100 μ L Färbelösung setzten sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

- 93 μ L Färbepuffer; der 10X Färbepufferansatz aus dem Kit wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt
- Je 1 μ L Supplement A und Supplement B
- 5 μ L einer 20 mg/mL X-Gal-Lösung; das X-Gal-Pulver aus dem Kit wurde in Dimethylformamid gelöst

Nach Zugabe der Färbelösung wurden die 96-Well-Platten mit Parafilm® luftdicht verschlossen und für 16 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 50 μ L pro Vertiefung einer mit PBS 1:360 verdünnten DAPI-Lösung verwendet, mit der die Zellen für 10 min lichtgeschützt inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich vor der Auswertung mit 50 μ L PBS pro Vertiefung überschichtet.

Für die Auswertung wurde zunächst die Gesamtzellzahl bestimmt. Hierfür wurden alle DAPI-positiven (blau-fluoreszierenden) Zellen mithilfe der Software ImageJ ausgezählt. Im nächsten Schritt wurden im Hellfeld alle SA- β -Gal-positiven (blau gefärbten) Zellen bestimmt und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl in % angegeben. Für jedes Replikat wurden drei Vertiefungen pro Bedingung analysiert, wobei nur Felder mit mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden.

2.2.6 Growth Arrest Assay

Der Growth Arrest Assay (Braumüller et al. 2013; Rentschler et al. 2018) dient der Erfassung der absoluten Zellzahl über den Verlauf mehrerer Passagen. Dabei wird dieselbe Zellpopulation bei jeder Passage nicht wieder in voller Anzahl, sondern stattdessen nur anteilig neu ausgesät. Anhand des Wachstums ausgehend von der neu ausgesäten und der bei der folgenden

Passage gemessenen Zellzahl wird ein Wachstumsfaktor (X-Faktor) ermittelt und mit dessen Hilfe das Wachstum der Ausgangspopulation extrapoliert.

Der Zeitpunkt der Behandlung wurde Passage -1 (p-1) genannt, die erste Zählung und Neu-Aussaat Passage 0 (p0), die zweite Passage p1 und die dritte p2. Zwischen p -1 und p0 waren stets 96 h, während zwischen den folgenden Passagen stets 72 h lagen, um eine Konfluenz der Kontrollen zu verhindern. Zu Beginn des Versuchs und bei jeder Passage wurden für jede Behandlung und Kontrolle 500.000 Zellen in einer 10 cm Laborschale ausgesät. Bei jeder Passage wurde die Zellzahl wie im **Abschnitt 2.2.2** beschrieben bestimmt. Der Versuch wurde bis p2 durchgeführt.

Die Berechnung des X-Faktors geschah nach folgender Formel:

$$X\text{-Faktor für } pX = \frac{\text{bei } pX \text{ ausgezählte Zellzahl}}{\text{bei } pX - 1 \text{ ausgesäte Zellzahl}}$$

Ist der X-Faktor größer als eins, ist die Population gewachsen, ist der X-Faktor gleich eins, blieb die Zellzahl unverändert, ist der X-Faktor kleiner als eins, ist die Population geschrumpft. Um vergleichbare absolute Werte der Populationsgröße zu erhalten, wurde das Wachstum der Ausgangspopulation folgendermaßen extrapoliert:

$$\text{Extrapolierte Zellzahl} = X\text{-Faktor für } pX * \text{Zellzahl von } pX - 1$$

2.2.7 Laktatdehydrogenase Zytotoxizitätsassay

Im Prinzip wurde der Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay wie beschrieben durchgeführt (Wieder et al. 1998). Um die zytotoxischen Effekte der verschiedenen Behandlungen festzustellen, wurde der CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay von Thermo Fisher Scientific verwendet. Auf einer 96-Well-Platte wurden von beiden Zelllinien pro Vertiefung 1500 Zellen in 100 µL Kulturmedium ausgesät. Für jedes Replikat wurden sechs identische Vertiefungen ausgesät und zum einen wie im **Abschnitt 2.2.3** beschrieben behandelt. Zum anderen wurden weitere Zellpopulationen zusätzlich mit 0,1 % Triton X-100 (in PBS gelöst) behandelt; dieses Detergenz löste alle Zellen auf

und dient daher als Positivkontrolle für die maximale Zytotoxizität. Drei der sechs Vertiefungen dienten der Bestimmung der maximalen, die anderen drei der Behandlungs-induzierten LDH-Freisetzung. Bei Versuchsbeginn wurde zu den drei Vertiefungen, welche der Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung dienen, je 10 µL vom 10X Lysispuffer gegeben. Anschließend wurde die Platte im Brutschrank für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 50 µL des Überstands einer jeden Vertiefung auf eine 96-Well-Platte übertragen, bevor 50 µL der Reaction Mixture pro Vertiefung zugegeben wurden, mit der die Platten für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert wurden. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 50 µL Stop Solution pro Vertiefung beendet.

Mithilfe eines ELISA-Readers wurde die Absorption bei 490 nm und bei 680 nm photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurde die 680-nm- von der 490-nm-Absorption abgezogen. Die Bestimmung der Zytotoxizität in % geschah nach folgender Formel:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{(\text{Behandlungsinduzierte LDH-Aktivität}) - (\text{Kulturmedium-LDH-Aktivität})}{(\text{maximale LDH-Aktivität}) - (\text{Kulturmedium-LDH-Aktivität})}$$

2.2.8 Western Blot

Der Western Blot dient der Antikörper-vermittelten Detektion ausgewählter Proteine nach der Auftrennung des Proteoms einer Zell- oder Gewebeprobe nach Masse (Laemmli 1970). In dieser Arbeit wurde mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern gearbeitet.

Als Zelllysate wurden Proben nach den verschiedenen 96-stündigen Behandlungen und weitere 48 h nach Ende der Behandlungen sowie eine Mediumkontrolle zum Zeitpunkt 0 h verwendet. Diese Proben wurden mithilfe eines Zellschabers und RIPA Lysispuffer lysiert, welcher wie im **Abschnitt 2.1.4** beschrieben hergestellt und um den Protease-Inhibitor cOmplete ergänzt wurde. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Lysaten wurde mithilfe des Pierce Bichinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kits bestimmt. Dazu wurden gemäß dem Herstellerprotokoll je 10 µL von jedem Proteinstandard oder von

jeder Probe in Duplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert, bevor 200 μL des Arbeitsreagenz dazugegeben wurden. Danach wurde die Platte lichtgeschützt für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor photometrisch die Absorption bei 563 nm gemessen wurde. Ausgehend von den Absorptionswerten der Standardreihe wurde eine Standardkurve ermittelt, mit der im nächsten Schritt die jeweilige Proteinkonzentration in den einzelnen Lysaten berechnet wurde.

Anschließend wurden Proben mit einem Volumen von 100 μL vorbereitet, welche jeweils 10 μg Protein enthielten. Diese Proben bestanden zu jeweils 50 μL aus entsprechend in Lysispuffer verdünntem Proteinlysate und 50 μL Laemmli-Puffer. Nach Denaturierung der Proteine in den Lysaten durch Erhitzen bei 95 °C für 5 min im Heizblock wurden die Proben neben einer Bahn mit vorgefärbten Molekulargewichtsmarkerproteinen auf ein Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid aufgetragen. Anschließend wurden die Proben in einem Trenngel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 12 % elektrophoretisch bei 100 V aufgetrennt. Zum Blotting (Semi-Dry Blot) wurde das Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Immobilon-FL Transfer Membran transferiert, welche mit Intercept Blocking Puffer geblockt wurde. Gel und Membran wurden mit Whatman-Filterpapier bedeckt und in ein Spannungsfeld gebracht, wobei sich die Membran zwischen Gel und Anode befand. Im Trans-Blot Turbo Transfer System lief jeder Blot bei 1,3 A und 24 V für 10 min. Anschließend wurden die Membranen für 1 h mit Intercept Blocking Puffer bei Raumtemperatur auf einer Wippe geblockt. Im nächsten Schritt wurden die im **Abschnitt 2.1.5** beschriebenen Primär- und Sekundärantikörper entsprechend mit Intercept Blocking Puffer und Tris-Buffered Saline mit Tween20 (TBST) verdünnt. Zusammen mit der jeweiligen Primärantikörperlösung wurde jede Membran über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt auf einer Wippe inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen in TBST dreimal für je 15 min gewaschen. Die Membranen wurden anschließend für 1 h lichtgeschützt mit der entsprechenden Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Membranen viermal für 10 min mit TBST und einmal mit TBS ohne Tween20 für 5 min lichtgeschützt gewaschen.

Die Darstellung der Membran und die Auswertung des Versuchs erfolgte mit dem Li-Cor Odyssey SA Imaging System. Die Dichte der einzelnen Banden auf den verschiedenen Membranen wurde mit der Software Image Studio Lite gemessen. Die densitometrisch ermittelten Messwerte der Zielprotein-Banden wurden auf die Messwerte der β -Aktin-Bande bezogen; diese Ratio wurde anschließend normalisiert auf die entsprechende Ratio der Mediumkontrolle zum Zeitpunkt 0 h, welche als 1 gesetzt wurde. Als Positivkontrolle wurden HeLa Zelllysate verwendet.

2.2.9 Zellzyklusanalyse mit 7-AAD-APC-BrdU-Durchflusszytometrie

Mithilfe der 7-AAD-APC-BrdU-Durchflusszytometrie kann der Zellzyklus untersucht werden. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) interkaliert in die DNA und ist autofluoreszierend, während Bromdesoxyuridin (BrdU) bei der Replikation in die DNA eingebaut wird; da BrdU allein in der Durchflusszytometrie nicht sichtbar ist, wurde es mit einem den Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) tragenden anti-BrdU-Antikörper markiert.

Ganz allgemein werden in der Durchflusszytometrie Einzelzellen analysiert, welche durch eine dünne Messkammer laufen. Hier werden sie von einem Laser angestrahlt, woraufhin sie Streulicht abgeben, welches je nach Winkel in Relation zum Laserstrahl Auskunft über die Größe oder die Binnenstrukturen jeder Einzelzelle gibt. Weiterhin können extrazelluläre oder auch (nach Permeabilisierung) intrazelluläre Bestandteile der Zellen angefärbt werden. Dabei regt der Laser den Fluoreszenzfarbstoff dazu an Licht abzustrahlen, welches vom Durchflusszytometer analysiert werden kann. Verschiedene Farbstoffe emittieren dabei verschiedenfarbiges Licht; durch die unterschiedlichen Wellenlängen können die jeweiligen Lichtstrahlen einem Fluoreszenzkanal zugeordnet werden.

Für die Zellzyklusanalyse, die ähnlich wie von Braumüller et al. 2013 beschrieben durchgeführt wurde, wurde das APC BrdU Flow Kit von BD Pharmingen gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. Nach Behandlung der SK-MEL-28- und WM115-Zellen mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib (s. **Abschnitt 2.2.3**) in 10 cm Zellkulturplatten wurden für das BrdU-Labeling 10 μ L

einer 1 mM BrdU-Lösung in jede Platte gegeben. Die Zellen wurden für weitere 3 h inkubiert, bevor sie wie im **Abschnitt 2.2.2** beschrieben geerntet wurden. Für die Zellzyklusanalyse sollten auch die Zellen im Überstand analysiert werden. Daher wurde der Überstand nicht verworfen, sondern entweder direkt der Zellsuspension aus gerade trypsinierten Zellen zugeführt – im Falle von Messungen am frühen Zeitpunkt (96 h) – oder in ein Falcon überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bis zur Ernte der Zellen am späten Zeitpunkt (144 h). Nach dem Zählen der Zellen wurden zur Fixierung 500.000 Zellen jeder Kontroll- und Behandlungsprobe pro Vertiefung auf eine 96 Deep-Well-Platte übertragen. Darüber hinaus wurden vier weitere Kontrollen angelegt, in denen Zellen aller Proben gepoolt wurden: (i) keine Färbung, (ii) nur 7-AAD, (iii) nur BrdU, (iv) 7-AAD und BrdU. Dafür wurden die Zellen in 100 μL pro Vertiefung BD Cytotfix/Cytoperm Puffer suspendiert und für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden sie mit 200 μL pro Vertiefung BD Perm/Wash Puffer gewaschen und für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Es folgten die Permeabilisierung mit 100 μL pro Vertiefung BD Cytoperm Permeabilization Puffer Plus für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie ein Waschschrift, eine erneute Fixierung und ein weiterer Waschschrift. Danach wurden die Zellen in 100 μL pro Vertiefung DNase (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie erneut gewaschen wurden. Anschließend wurde der anti-BrdU-Antikörper zugegeben, welcher im Waschpuffer 1:50 verdünnt wurde; in 50 μL pro Vertiefung dieser Antikörperlösung wurden die Zellen für 20 min auf Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und in 20 μL pro Vertiefung 7-AAD-Lösung suspendiert, bevor sie nach 5 min Inkubationszeit ein letztes Mal gewaschen wurden. Bis zur Analyse wurden sie in 0,5 % BSA-haltigem PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Messungen wurden am LSR II und die erste Analyse mit der Software DIVA durchgeführt. Um nur Einzelzellen zu messen, wurden zunächst lebende Zellen gegatet und Dubletten ausgeschlossen. Die unterschiedlichen Spitzen beim 7-AAD spiegeln Zellen mit einem einfachen (G1), doppelten (G2/M), oder vielfachen Chromosomensatz ($> 4n$) wider. Die Darstellung der BrdU-Inkorporation bildet die Zellen ab, welche sich in der S-Phase befinden. Die

weitere Analyse und Darstellung der Durchflusszytometrie-Daten wurde mit der Software FlowJo durchgeführt.

2.2.10 RNA-Isolation

Die Ribonucleinsäure (RNA) eines Zelllysats wird mithilfe der RNA-Isolation von der genomischen DNA getrennt und anschließend in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben.

Die RNA-Isolation wurde mithilfe des Nucleo Spin RNA II-Kits gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden Zellpellets von Proben am späten Messzeitpunkt (144 h; s. **Abschnitt 2.2.3**) im mitgelieferten Lysispuffer lysiert, wobei in den Pellets mindestens 500.000 und maximal 3.000.000 Zellen waren. Die RNA wurde anschließend mithilfe der Säulen des Kits von der genomischen DNA nahezu vollständig getrennt. In den folgenden Schritten wurde die RNA mit verschiedenen Waschpuffern behandelt und schließlich in destilliertem Wasser eluiert.

Zur Nachverfolgung der Aufreinigungseffizienz wurden zunächst photometrisch drei Werte bestimmt: Die RNA-Konzentration, die optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge (OD^{260}) welche die RNA-Menge zeigt, sowie die $OD^{260:280}$, welche das RNA-Protein-Verhältnis anzeigt. Bei reinen RNA-Proben liegt die OD^{260} nicht über 1 und die $OD^{260:280}$ zwischen 1,8 – 2,0. Als weitere Qualitätskontrolle wurden die verschiedenen RNA-Proben gelelektrophoretisch in einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Bei reinen RNA-Proben sind die 28S- und die 18S-ribosomalen Untereinheiten als abgegrenzte Banden sichtbar.

2.2.11 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese dient dem Umschreiben von RNA zu cDNA. Dieser Vorgang wird durch eine reverse Transkriptase vermittelt.

Zur cDNA-Synthese wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Der Versuch wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. In Kürze: Bis zu 1 µg RNA wurde mit dem Reaction Mix und der reversen Transkriptase gemischt; die anschließende Reaktion, bei der die cDNA synthetisiert wird, wurde nach Protokoll in einem Polymerase(PCR)-Thermocycler durchgeführt. Als

Qualitätskontrolle wurde eine PCR von *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)* durchgeführt.

2.2.12 Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient zur Vervielfältigung von DNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode nur zur Qualitätskontrolle der synthetisierten cDNA genutzt (Friedrich et al. 2001). Neben der cDNA wurden folgende Substanzen verwendet: Taq-DNA-Polymerase, Taq-Puffer, dNTPs, Wasser, sense- und antisense-Primer. Für die Kontrolle der cDNA-Synthese wurde die Expression von *HPRT* untersucht; als Haushaltsgen wird die Expression von *HPRT* in der Theorie nicht durch eine Behandlung verändert. Die Primersequenz ist **Tabelle 12** zu entnehmen. In **Tabelle 10** ist das Programm für die *HPRT*-PCR angegeben. Das PCR-Produkt wurde nach der PCR auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 10: PCR-Programm zur Durchführung der HPRT-PCR.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiales Schmelzen	94	5 min	1
Schmelzen	94	30 s	25
Annealing	56	30 s	
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	72	3 min	1

2.2.13 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative PCR (qPCR) dient nicht nur der Vervielfältigung, sondern auch der Quantifizierung von DNA. Die qPCR wurde angelehnt an die Beschreibung von Rentschler et al. 2018 durchgeführt. Vor der qPCR wurden Präamplifikate der einzelnen cDNA-Proben gebildet, mit denen die Standardreihen für das jeweilige Gen erstellt wurden. Für die qPCR wurde die cDNA 1:5 in Wasser verdünnt, bevor pro Vertiefung je 1 µL cDNA mit 5µL KAPA SYBR Mix, 2 µL Wasser und je 1µL sense- und antisense-Primer als Duplikate auf eine 96-Well-qPCR-Platte pipettiert wurden. Bei der qPCR kommen ganz allgemein Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, welche mit der DNA interkalieren. Die DNA-

Menge ist dabei proportional zur Stärke des Fluoreszenzsignals. **Tabelle 11** zeigt das Programm zur Durchführung einer qPCR; im Anschluss an die Amplifikation wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Länge des PCR-Produkts zu bestimmen und damit die Spezifität der PCR-Primer zu bestätigen.

Tabelle 11: Programm zur Durchführung der qPCR im LightCycler® 480 II.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl Zyklen
Präinkubation	95	5 min	1
Denaturierung	95	10 s	45
Annealing	60	10 s	
Elongation	72	10 s	
Schmelzkurvenanalyse	95	10 s	1
	65	1 min	
	Erhitzen auf 95 mit 0,06/s		

Die relative Quantifizierung der Expression eines Zielgens in einer Behandlungsgruppe erfolgte in dieser Arbeit nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Kurzum: Es wurde im ersten Schritt die Differenz der unterschiedlichen Ct-Werte von Zielgen und Referenz bestimmt (ΔCt), bevor im zweiten Schritt die ΔCt -Werte von Behandlungs- und Kontrollgruppe voneinander abgezogen wurden ($\Delta\Delta Ct$). Als Referenz wurden drei Haushaltsgene (s.u.) verwendet. Dieser $\Delta\Delta Ct$ -Wert wurde in die folgende Gleichung eingesetzt, um die relative Expression zu berechnen:

$$n - \text{fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Im Kontext dieser Arbeit wurde diese Methode, ähnlich wie die im **Abschnitt 2.2.12** beschriebene PCR, zur Qualitätskontrolle der cDNA-Proben eingesetzt. Als Haushaltsgene (s.o.) wurden *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta (YWHAZ)*, *Ribosomal Protein L13 (RPL13)* und *RPL31* verwendet. Um zu kontrollieren, ob die Melanomzellen auf

die Zytokine angesprochen haben, wurde die Expression von *CXCL10* bestimmt. Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen (**Tabelle 12**):

Tabelle 12: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten humanen Primer.

Gen	Sense	Antisense
<i>HPRT</i>	5'-AAGATGGTCAAGGTCGC-3'	5'-ACAATCCGCCCAAAGGG-3'
<i>YWHAZ</i>	5'-ACTTTTGGTAC- ATTGTGGCTTCAA-3'	5'-CCGCCAGGAC- AAACCAGTAT-3'
<i>RPL13</i>	5'-TCAAAGCCTT- CGCTAGTCTCC-3'	5'-GGCTCTTTTTG- CCCGTATGC-3'
<i>RPL31</i>	5'CTCGGGCACTC- AAAGAGATTC-3'	5'-CGGATTCGGT- ATGGCACATTC-3'
<i>CXCL10</i>	5'-GAAAGCAGTTA- GCAAGGAAAGGT-3'	5'-GACATATACTCCA- TGTAGGGAAGTGA-3'

2.2.14 qPCR-Arrays

Für die qPCR-Array-Analysen wurden PrimerPCR Arrays „Cytokines and Chemokines (SAB Target List) H96“ (Bio-Rad) verwendet. Diese Arrays bestehen aus einer 96-Well-Platte mit lyophilisierten Primern für 84 Gene von Zytokinen und Chemokinen sowie für sieben Haushaltsgene; die übrigen fünf Vertiefungen werden für die internen Kontrollen jeder einzelnen Arrayplatte verwendet. **Tabelle 13** zeigt schematisch den Aufbau einer Array-Platte. Die hellblau unterlegten Felder zeigen potenzielle Haushaltsgene, deren Expression aber durch eine oder mehrere Behandlungen verändert wurde. Dunkelblau unterlegt sind die Haushaltsgene, die für die Auswertung verwendet wurden. Die internen Array-Kontrollen sind grün unterlegt.

Tabelle 13: Bestückung einer PrimePCR Array Platte „Cytokines and Chemokines (SAB Target List) H96“ mit Markierung der Haushaltsgene und internen Arraykontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACTB	CCL1	CCL21	CNTF	CXCL12	GUSB	IL15	IL2	IL5	MIF	THPO	TBP
B	ADIPOQ	CCL11	CCL22	CSF1	CXCL13	IFNA2	IL16	IL21	IL6	MSTN	TNF	GAPDH
C	B2M	CCL13	CCL24	CSF2	CXCL16	IFNG	IL17A	IL22	IL7	NODAL	TNFRSF11B	HPRT1
D	BMP2	CCL17	CCL3	CSF3	CXCL2	IL10	IL17F	IL23A	IL8	OSM	TNFSF10	gDNA
E	BMP4	CCL18	CCL5	CX3CL1	CXCL5	IL11	IL18	IL24	IL9	PPBP	TNFSF11	PCR
F	BMP6	CCL19	CCL7	CXCL1	CXCL9	IL12A	IL1A	IL27	LIF	RPLP0	TNFSF13B	RQ1
G	BMP7	CCL2	CCL8	CXCL10	FASLG	IL12B	IL1B	IL3	LTA	SPP1	VEGFA	RQ2
H	C5	CCL20	CD40LG	CXCL11	GPI	IL13	IL1RN	IL4	LTB	TGFB2	XCL1	RT

Die Methode wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Nachdem wie in den **Abschnitten 2.2.10 – 2.2.13** dargestellt die RNA aus Melanomzellen, welche wie im **Abschnitt 2.2.3** beschrieben behandelt wurden, isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, erfolgte die Qualitätskontrolle der cDNA mittels PCR und qPCR. Für die qPCR-Arrays wurde anschließend ein Master Mixes vorbereitet; in jede Vertiefung der Array-Platten wurden 20 µL dieses Master Mix pipettiert, welcher sich pro Vertiefung aus folgenden Komponenten zusammensetzte: 10 µL 2X SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, X µL cDNA (das Volumen an cDNA, welches 25 µg cDNA enthielt) und (10 – X) µL Nuklease-freies Wasser.

Für die qPCR-Array-Analysen wurde, wie auch für die einzelnen qPCRs, ein LightCycler® 480 II genutzt. **Tabelle 14** zeigt das Protokoll für diese Methode.

Tabelle 14: Protokoll für die Durchführung der qPCR-Array-Analysen in einem LightCycler® 480 II.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl Zyklen
Aktivierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	5 s	40
Annealing/Extension	60	30 s	
Schmelzkurve	65-95 (0,5-Schritte)	5 s/Schritt	1

Die qPCR-Arrays wurden mit der Originalsoftware nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (s. **Abschnitt 2.2.13**) ausgewertet. Als Haushaltsgene wurden für diesen Versuch *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)*, *HPRT1* und *TATA Box Binding Protein (TBP)* verwendet. Die Zytokin-behandelte Gruppe wurde auf die Mediumkontrolle, die Doxorubicin- und Palbociclib-behandelten Gruppen auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Als Cut-Off-Wert für eine Regulation wurde ein mindestens zweifacher Unterschied zur entsprechenden Kontrolle gewählt. Wurde ein bestimmtes PCR-Produkt bei einer Behandlungsprobe gemessen, bei der entsprechenden Kontrollprobe aber nicht, wurde für die Kontrollprobe ein Ct-Wert von 35,00 angenommen, da andernfalls die relative Expression dieses Gens nicht hätte berechnet werden können.

2.2.15 Proteome Profiler Arrays

Für die Protein-Array-Analysen wurde das Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) verwendet. Mit dieser Methode wurden die Überstände behandelter und unbehandelter Melanomzellen auf 105 verschiedene Zytokine und Chemokine hin untersucht. Der Versuch wurde gemäß dem Herstellerprotokolls durchgeführt, wobei anstatt Streptavidin-HRP der fluoreszierende Antikörper IRDye 800 CW Streptavidin als alternative Methode zur Detektion verwendet wurde. Die Überstände wurden wie im **Abschnitt 2.2.4** geschildert generiert. Nach dem Blocken wurden die verschiedenen Array-Membranen mit den unterschiedlichen Überständen über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen gewaschen, woraufhin die Inkubation mit dem Detection Antibody Cocktail für 1 h und ein weiterer Waschschrift folgten. Anschließend wurden die Membranen mit dem Streptavidin-Antikörper in entsprechender Verdünnung für 30 min inkubiert, bevor ein finaler Waschschrift und die Auswertung mithilfe des Li-Cor Odyssey SA Imaging Systems und der Software Image Studio Lite erfolgten. Auf den Membranen der Proteome Profiler Arrays (**Tabelle 15**) sind auf 105 Spots Antikörper gegen die verschiedenen Zytokine und Chemokine gebunden. Je mehr von einem bestimmten Protein im zu messenden Überstand vorhanden ist, desto stärker ist letztlich das Signal durch den Streptavidin-

Antikörper. Somit wurde wie bei der Auswertung der Western Blots die Dichte der einzelnen Spots gemessen. Die Zuordnung der verschiedenen Spots zu den verschiedenen Zielproteinen oder Kontrollspots ist **Tabelle 15** zu entnehmen. Abschließend wurden die densitometrischen Messwerte der Behandlungsgruppen auf die Messwerte der Mediumkontrolle bezogen.

Tabelle 15: Bestückung einer Membran aus einem „Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit“. Markiert sind die Positivkontrollen (grün), die Negativkontrolle (rot) und die Blank Spots (grau).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Pos.			Groα	IL-4	IL-19	Leptin	Myeloperoxidase	Serpine1	Pos.
2	Ktrl.									Ktrl.
3	Adiponectin	CD40 Ligand	ENA-78	Growth Hormone	IL-5	IL-22	LIF	Osteopontin	SHBG	
4										
5	Apolipoprotein A-I	Chitinase 3-like 1	Endoglin	HGF	IL-6	IL-23	Lipocalin-2	PDGF-AA	ST2	Vitamin D BP
6										
7	Angiogenin	Complement Factor D	Fas Ligand	ICAM-1	IL-8	IL-24	MCP-1	PDGF-AB/BB	TARC	CD31
8										
9	Angiopoietin-1	CRP	FGF basic	IFN-γ	IL-10	IL-27	MCP-3	Pentraxin 3	TFF3	TIM-3
10										
11	Angiopoietin-2	Cripto-1	FSF-7	IGFBP-2	IL-11	IL-31	M-CSF	PF4	TfR	VCAM-1
12										
13	BAFF	Cystatin C	FGF-19	IGFBP-3	IL-12 p70	IL-32	MIF	RAGE	TGF-α	
14										
15	BDNF	Dkk-1	Flt-3 Ligand	IL-1α	IL-13	IL-33	MIG	RANTES	Thrombospondin-1	
16										
17	C5/C5a	DPPIV	G-CSF	IL-1β	IL-15	IL-34	MIP-1α/ MIP-1β	RBP-4	TNF-α	
18										
19	CD14	EGF	GDF-15	IL-1ra	IL-16	IP-10	MIP-3α	Relaxin-2	uPAR	
20										
21	CD30	Emmprin	GM-CSF	IL-2	IL-17A	I-TAC	MIP-3β	Resistin	VEGF	
22										
23	Pos.			IL-3	IL-18 Bpa	Kallikrein 3	MMP-9	SDF-1α		Neg.
24	Ktrl.									Ktrl.

2.2.16 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zur exakten Quantifizierung der Proteine IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12A wurden die entsprechenden spezifischen ELISAs genutzt (Bauer et al. 2017). Dabei wurde jeweils das entsprechende DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet. In Kürze: Über Nacht fand das Coating der 96-Well-Platten mit dem entsprechenden Antikörper statt. Am Folgetag wurden die Platten gewaschen, geblockt und erneut gewaschen, bevor die zu analysierenden Überstandsproben und Proteinstandards auf die Platten pipettiert wurden. Anschließend wurde der Detektionsantikörper zusammen mit Streptavidin-HRP und der Substratlösung genutzt, um den Farbwechsel in jeder einzelnen Vertiefung mit einem ELISA-Reader zu messen. Um die Konzentration des jeweiligen Zielproteins zu bestimmen, wurden zunächst die Messwerte der Absorption bei 540 nm (Hintergrund) von den Messwerten bei 450 nm Wellenlänge abgezogen. Mithilfe der Four Parameter Logistic Regression, welche die Standardkurve miteinbezieht, wurde schließlich die spezifische Konzentration der einzelnen Proteine bzw. Zytokine berechnet.

2.2.17 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden GraphPad Prism 9 und SPSS Statistics genutzt. Wenn nicht anders angegeben, werden die Daten als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) gezeigt. Ein Sternchen (*) zeigt einen p-Wert $< 0,05$ an, was als statistisch signifikanter Unterschied gewertet wurde. Zum Vergleich einer Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle wurde der Unpaired Student's t-test eingesetzt (**Abbildungen 4 – 8, 15, 16**). Zum Vergleich von derselben Gruppe zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mit derselben Kontrolle wurde der Paired Student's t-test verwendet (**Abbildung 2 und Abbildung 3**). Zum Vergleich einer Behandlung mit der Kontrolle und den anderen Behandlungen wurde die One-way ANOVA eingesetzt (**Abbildung 14**), während die Two-way ANOVA bei entsprechenden Vergleichen an verschiedenen Zeitpunkten verwendet wurde (**Abbildung 11**).

3 Ergebnisse

Einleitend sei darauf hingewiesen, dass sämtliche der hier gezeigten Daten schon im April 2022 veröffentlicht wurden (Homann et al. 2022).

3.1 IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib induzieren Seneszenz-Marker in Melanomzellen

3.1.1 Induktion der SA- β -Gal-Aktivität und Seneszenz-typischer Veränderungen der Zellmorphologie nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib

Zunächst sollte in den humanen Melanomzelllinien SK-MEL-28 und WM115 die Seneszenz mit dem Zytokin-Cocktail IFN- γ und TNF sowie den Therapeutika Doxorubicin und Palbociclib induziert werden. Die Aktivität der SA- β -Gal, ein typischer Seneszenz-assoziiertes Marker, wurde hierzu am Ende der 96-stündigen Behandlung und 48 h nach Wegnahme der Seneszenzinduktoren mit einer Färbung dargestellt. Anschließend wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt, um die Gesamtzellzahl der jeweiligen Probe zu ermitteln. Die Behandlungen mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib verstärkten bei beiden Zelllinien zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant die Aktivität der SA- β -Gal (**Abbildung 2** und **Abbildung 3**); ca. 30 – 55 % der behandelten Zellen waren zum frühen Zeitpunkt (96 h) SA- β -Gal-positiv (**Abbildung 2b** und **Abbildung 3b**). Bei den Kontrollen waren höchstens 10 % der Zellen SA- β -Gal-positiv (**Abbildung 2b** und **Abbildung 3b**). Zu beachten ist ebenfalls, dass die verstärkte Aktivität dieses Enzyms stabil blieb für weitere 48 h nach Ende der jeweiligen Behandlung (144 h; **Abbildung 2** und **Abbildung 3**). Vergleicht man die Intensität der Färbungen bei den einzelnen Induktoren miteinander, fällt auf, dass die Therapeutika in beiden Zelllinien eine kräftigere Färbung induzierten als die Zytokine. Stellt man beide Zelllinien gegenüber, ist zu beobachten, dass in den Kontrollen der WM115-Zellen geringfügig mehr Zellen SA- β -Gal-positiv waren als in den Kontrollen der SK-MEL-28-Zellen (**Abbildung 2** und **Abbildung 3**).

Weiterhin zeigten die behandelten Zellen eine verringerte Zelldichte und sie entwickelten einen flacheren und größeren Zelleib im Vergleich zu den Kontrollen (**Abbildung 2a** und **Abbildung 3a**), was der typischen Morphologie seneszenter Zellen entspricht (s. **Abschnitt 1.3.1**). Auch kennzeichnete manche seneszente Zellen Polyplodie oder Multinukleation; dieses Phänomen trat insbesondere nach Behandlung mit Doxorubicin auf (**Abbildung 2a** und **Abbildung 3a**).

Insgesamt geben die Ergebnisse der SA- β -Gal-Färbung erste klare Hinweise auf eine stabile Seneszenzinduktion in allen Behandlungsgruppen nach 96 h Inkubation und weitere 48 h nach dem Wirkstoffentzug.

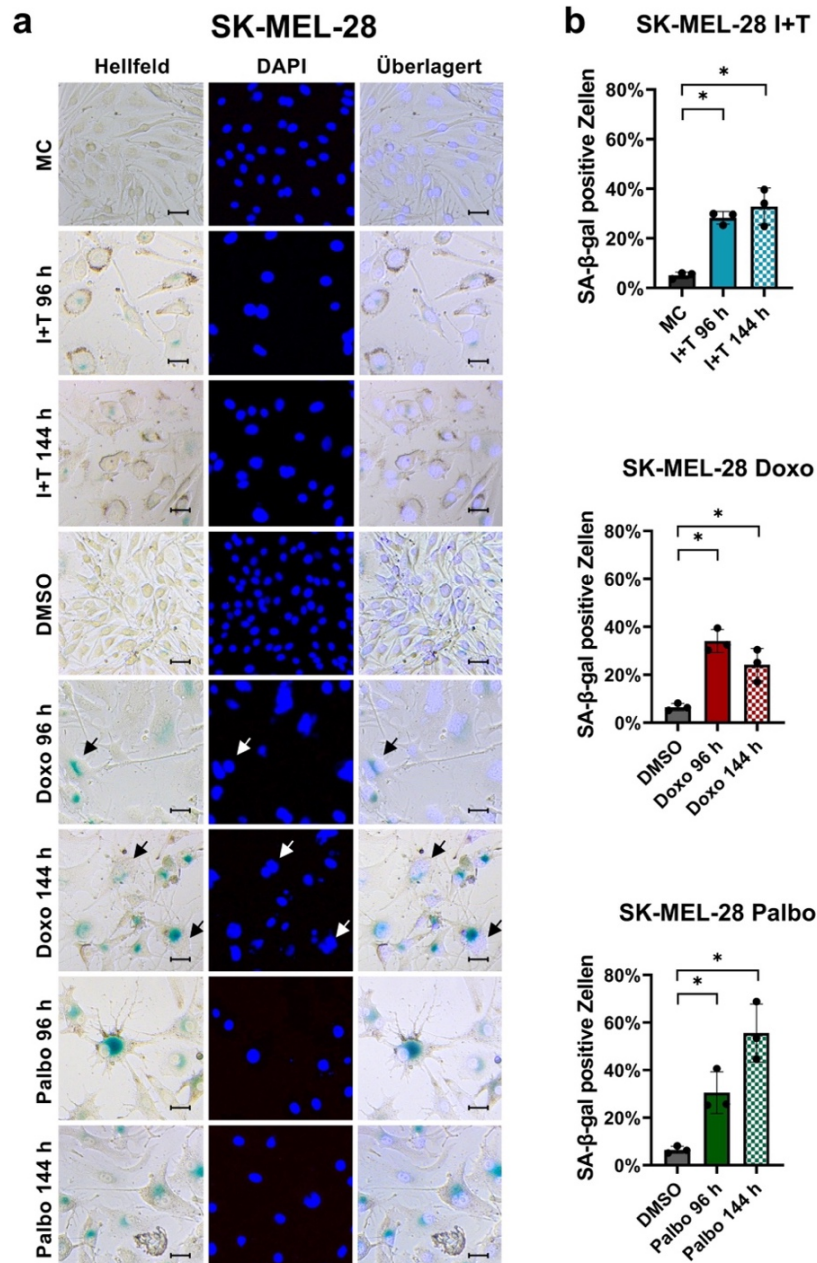


Abbildung 2: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in SK-MEL-28-Zellen durch Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). **a**, Repräsentative Bilder der SA-β-Gal-Färbung von SK-MEL-28-Melanomzellen nach 96-stündiger Behandlung (96 h) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h). Die linke Spalte zeigt Aufnahmen im Hellfeld, die mittlere Spalte im DAPI-Kanal und die rechte Spalte eine Überlagerung beider Kanäle. Maßstabsbalken = 50 μm. Schwarze Pfeile deuten auf polyploide Zellen. Es werden Bilder von einem von drei (n=3) Durchgängen gezeigt. **b**, Quantifizierung SA-β-Gal-positiver Zellen; es wurde dieselbe DMSO-Kontrolle für Doxo und Palbo verwendet, weswegen dieselben Werte gezeigt werden. MW ± SD; n=3; Paired student's t-test; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

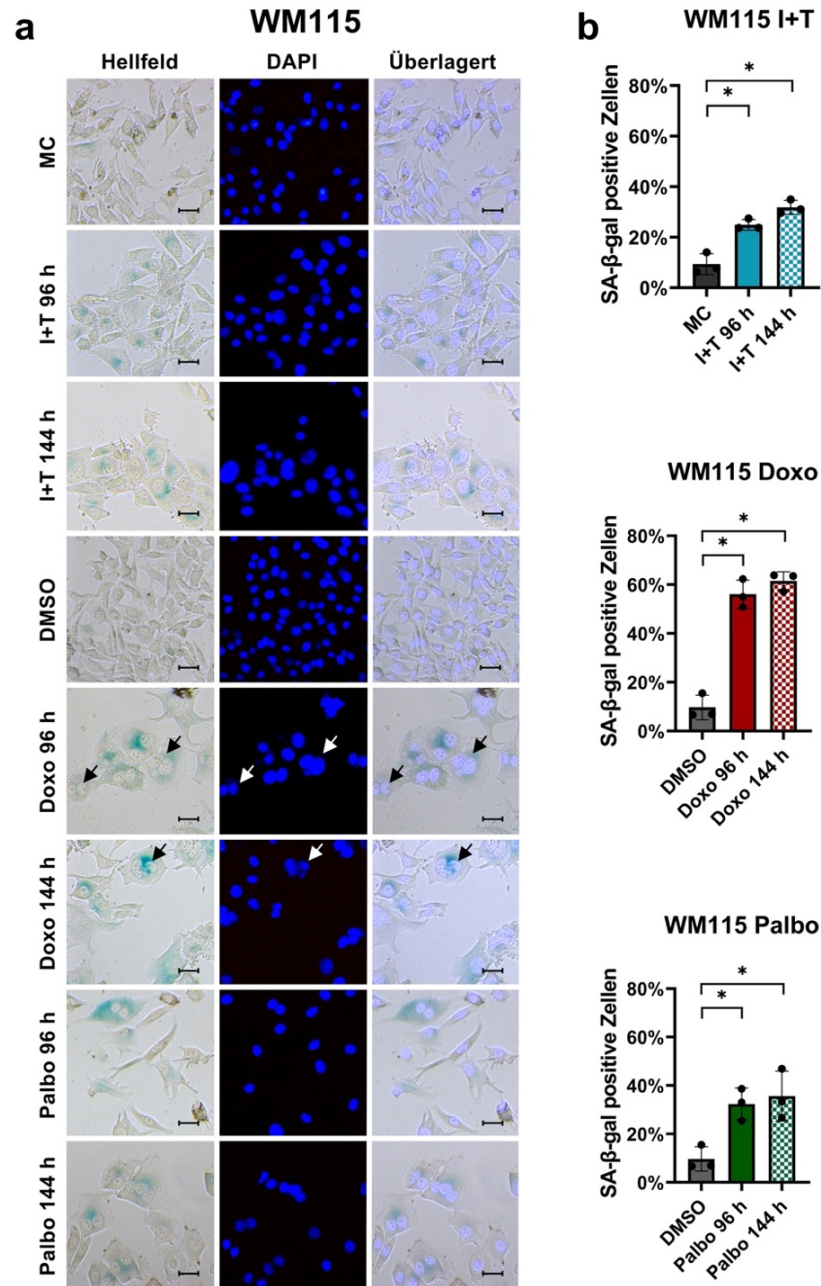


Abbildung 3: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in WM115-Zellen durch Behandlung mit IFN-γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). **a**, Repräsentative Bilder der SA-β-Gal-Färbung von WM115-Melanomzellen nach 96stündiger Behandlung (96 h) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h). Die linke Spalte zeigt Aufnahmen im Hellfeld, die mittlere Spalte im DAPI-Kanal und die rechte Spalte eine Überlagerung beider Kanäle. Maßstabsbalken = 50 μm. Schwarze Pfeile deuten auf polyploide Zellen. Es werden Bilder von einem von drei (n=3) Durchgängen gezeigt. **b**, Quantifizierung SA-β-Gal-positiver Zellen; es wurde dieselbe DMSO-Kontrolle für Doxo und Palbo verwendet, weswegen dieselben Werte gezeigt werden. MW ± SD; n=3; Paired student's t-test; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

3.1.2 Induktion eines stabilen Wachstumsarrests in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib

Ein Kernmerkmal seneszenten Zellen ist die Ausbildung eines stabilen Wachstumsarrests. Daher wurden die Zellzahlen beider Zelllinien am Ende jeder 96-stündigen Behandlung und für zwei weitere Passagen bestimmt. Die einzelnen Behandlungen mit IFN- γ und TNF (**Abbildung 4a**), Doxorubicin (**Abbildung 4b**), und Palbociclib (**Abbildung 4c**) hemmten im Behandlungszeitraum die Proliferation der Melanomzellen. Auch während der zwei folgenden Passagen wurde unter Wirkstoffentzug das exponentielle Wachstum der Zellen geblockt, so dass alle drei Behandlungen einen stabilen Wachstumsarrest in den untersuchten Melanomzellen auslösten (**Abbildung 4a – 4c**).

3.1.3 Geringe bis keine zytotoxischen Effekte durch Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib

Die Seneszenz wird als Mechanismus der Tumorkontrolle mit geringem toxischem Anteil beschrieben (s. **Abschnitt 1.3.2**). Folglich wurde nach Ende der 96-stündigen Seneszenzinduktion die durch jede Behandlung ausgelöste Zytotoxizität analysiert, indem die LDH-Freisetzung in die verschiedenen Überstände bestimmt wurde. LDH ist ein zytosolisches Enzym, welches bei Defekten der Zellmembran (bspw. nach dem Zelltod) in die Umgebung freigesetzt wird. Auf die WM115-Zelllinie hatte keine Behandlung einen zytotoxischen Effekt (**Abbildung 4d**, rechts). Allein bei Zytokin- und Doxorubicin-behandelten SK-MEL-28-Zellen zeigte sich eine signifikant stärkere LDH-Freisetzung im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle, aber die Zytotoxizität war nicht größer als 15% (**Abbildung 4d**, links). Im Unterschied dazu hatte die Behandlung der SK-MEL-28-Zellen mit Palbociclib keine direkten zytotoxischen Effekte. Die Ergebnisse der Gruppe, die mit 0,1 % Triton X-100 behandelt worden ist, wurden als 100% definiert; die Messungen der anderen Gruppen wurden darauf bezogen.

Zusammenfassend hatten die Behandlungen in den beiden Zelllinien einen geringen oder gar keinen zytotoxischen Effekt, so dass die Ergebnisse des LDH

Release Assays nicht gegen eine Seneszenzinduktion in sämtlichen Bedingungen sprechen.

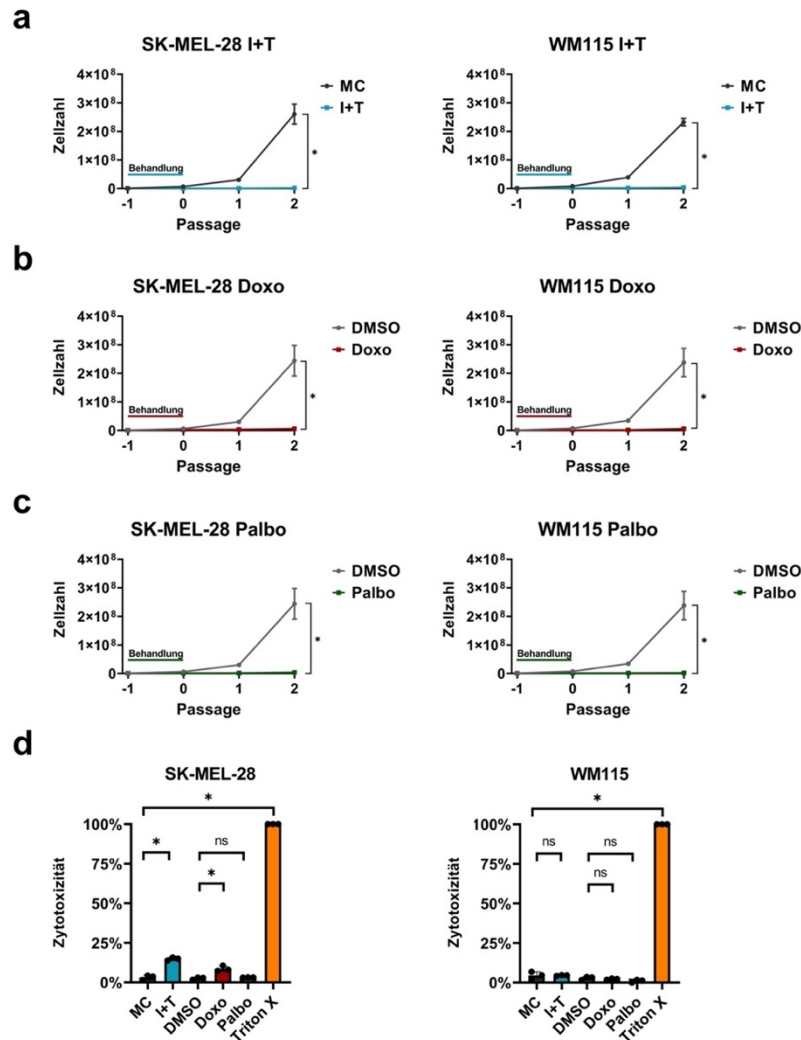


Abbildung 4: Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) induzierte einen stabilen Wachstumsarrest und wenig bis keine Zytotoxizität (nach Homann et al. 2022). a – c, Wachstumskurven von SK-MEL-28- (linke Spalte) und WM115-Melanomzellen (rechte Spalte). MC, Mediumkontrolle (a). DMSO, Vehikelkontrolle (b, c); es wurde dieselbe DMSO-Kontrolle für Doxo und Palbo verwendet, weswegen dieselben Werte gezeigt werden. d, Die Zytotoxizität jeder Behandlung wurde untersucht, indem die induzierte LDH-Freisetzung nach 96 h zur maximalen LDH-Freisetzung in Relation gesetzt wurde. Die Messwerte der Behandlungen und Kontrollen wurden normalisiert auf die der Positivkontrolle Triton X. a – d, MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; ns, nicht signifikant; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

3.2 Charakterisierung des Wachstumsarrests von seneszenten Melanomzellen

3.2.1 Stabile Induktion von p21 nach Behandlung mit IFN- γ und TNF sowie mit Doxorubicin, aber nicht mit Palbociclib

Im nächsten Schritt wurde mittels Western Blot der Zellzyklusregulator bestimmt, welcher den im **Abschnitt 3.1.2** beschriebenen Wachstumsarrest am ehesten auslöste. Die prominentesten Zellzyklusbremsen sind p16, p21 und p27; die Bedeutung der einzelnen Regulatoren wurde im **Abschnitt 1.3.1** bereits ausführlich beschrieben. Es sei an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen, dass p16 oder der p16-Signalweg im Melanom häufig mutiert sind, dass p21 nicht ausschließlich durch p53 reguliert werden kann, und dass p27 eher mit Quieszenz als mit Seneszenz assoziiert ist (s. **Abschnitt 1.3.1**).

Zuerst wurde die Expression von p16 in SK-MEL-28- und WM115-Zellen nach Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib bestimmt. Die Expression von p16 in der SK-MEL-28-Zelllinie wurde durch keinen Induktor verändert (**Abbildung 5a**), weder am Ende der Behandlung (96 h) noch zwei Tage nach Wegnahme der Seneszenztrigger (144 h). Für die WM115-Zelllinie wurde eine homozygote Deletion von *CDKN2A* beschrieben (s. **Tabelle 9**). Auch in dieser Arbeit konnte das Protein in keiner Bedingung und zu keinem Zeitpunkt in dieser Zelllinie nachgewiesen werden (**Abbildung 5b**). Im Gegensatz dazu reagierten Zellen beider Zelllinien nach der Behandlung mit Zytokinen sowie Doxorubicin mit einer Hochregulation von p21, während die Behandlung mit Palbociclib keine solche Wirkung hatte (**Abbildung 6a** und **b**). Diese Effekte ließen sich zum frühen (96 h) und auch zum späten (144 h) Zeitpunkt beobachten. Weiterhin hatte keine Behandlung mit den verschiedenen Induktoren eine gesteigerte Expression von p27 zur Folge (**Abbildung 7a** und **b**). Im Gegenteil, Zytokin-behandelte SK-MEL-28-Zellen reagierten zu beiden Zeitpunkten mit einer verringerten Expression dieses mit Quieszenz assoziierten Faktors (**Abbildung 7**). Die Behandlung mit Palbociclib löste in beiden Zelllinien zum späten Zeitpunkt (144 h) ebenfalls eine Herunterregulation des Zellzyklusregulators aus (**Abbildung 7a** und **b**).

Insgesamt wurde der Wachstumsarrest in den beiden Melanomzelllinien indirekt durch die verstärkte Expression vom CDK-Inhibitor p21 nach Behandlung mit Zytokinen und Doxorubicin oder direkt durch den synthetischen CDK4/6-Inhibitor Palbociclib vermittelt.

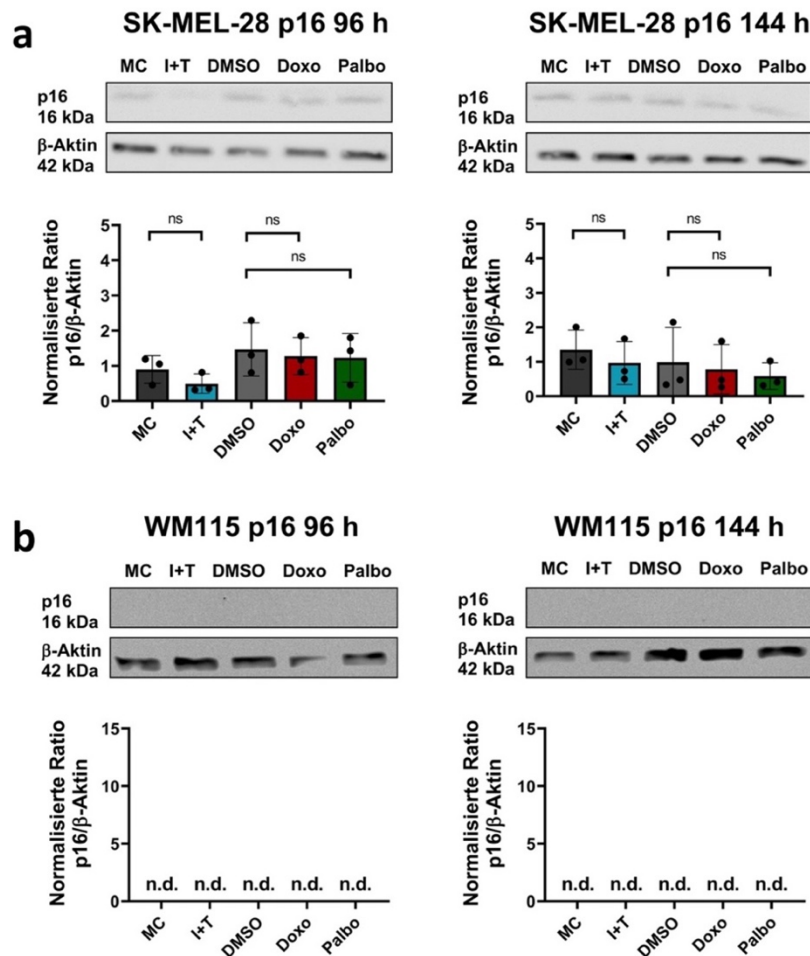


Abbildung 5: Regulation des Zellzyklusinhibitors p16 in Melanomzellen nach Behandlung mit $IFN-\gamma$ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Western Blots von p16 in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung für 96 h (links) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h; rechts). MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die semiquantitative densitometrische Analyse der Expression von p16 wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert; diese p16/ β -Aktin-Ratio wurde anschließend normalisiert auf die Mediumkontrolle bei 0 h (untere Reihe; Daten von MC 0 h werden nicht gezeigt). MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; ns, nicht signifikant; n.d., nicht determinierbar. Das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

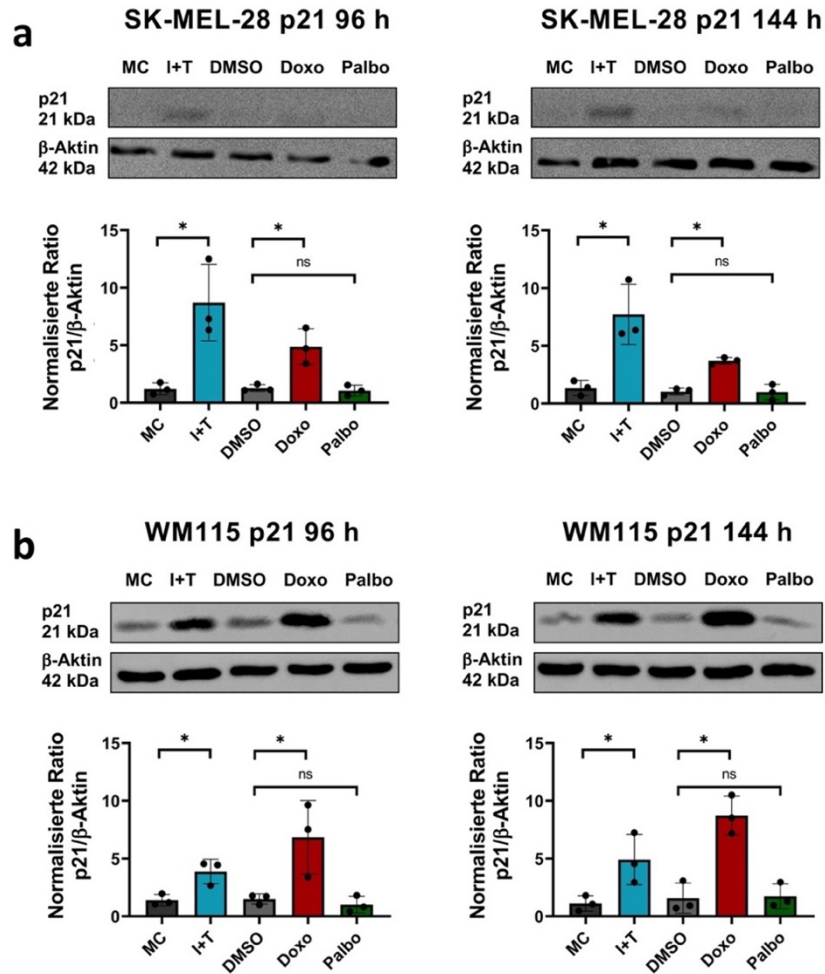


Abbildung 6: Regulation des Zellzyklusinhibitors p21 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Western Blots von p21 in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung für 96 h (links) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h; rechts). MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die semiquantitative densitometrische Analyse der Expression von p21 wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert; diese p21/ β -Aktin-Ratio wurde anschließend normalisiert auf die Mediumkontrolle bei 0 h (untere Reihe; Daten von MC 0 h werden nicht gezeigt). MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; ns, nicht signifikant; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

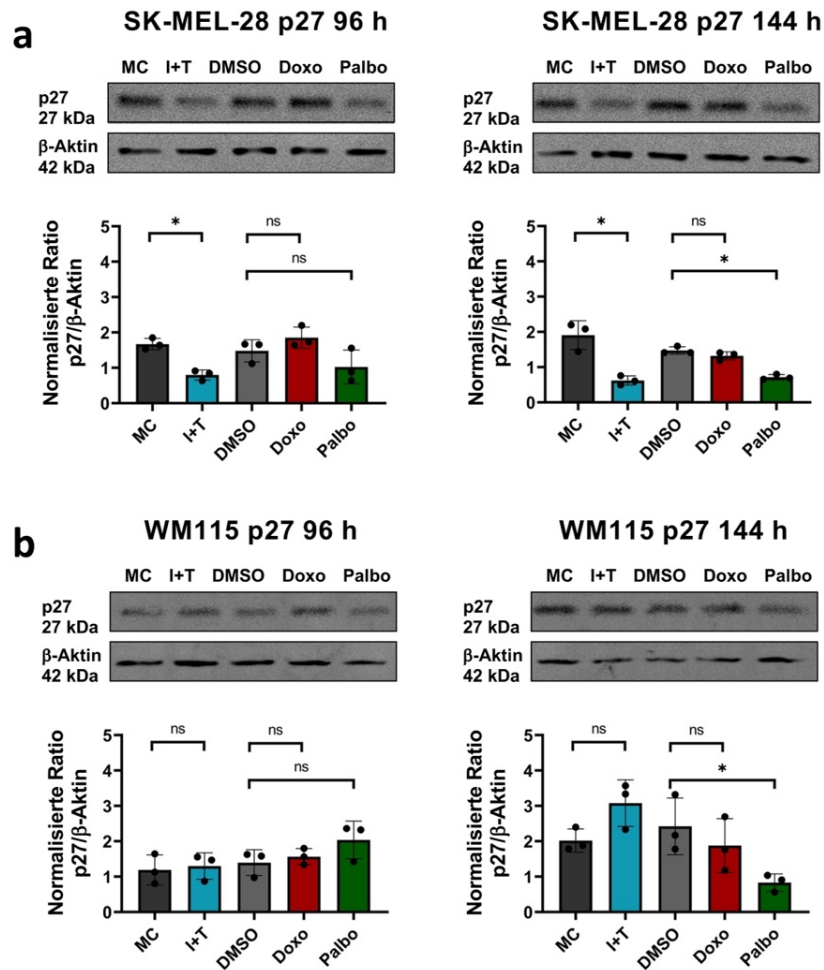


Abbildung 7: Regulation des Zellzyklusinhibitors p27 in Melanomzellen nach Behandlung mit $IFN-\gamma$ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Western Blots von p27 in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung für 96 h (links) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h; rechts). MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die semiquantitative densitometrische Analyse der Expression von p27 wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert; diese p27/ β -Aktin-Ratio wurde anschließend normalisiert auf die Mediumkontrolle bei 0 h (untere Reihe; Daten von MC 0 h werden nicht gezeigt). MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; ns, nicht signifikant; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

3.2.2 Erhöhte p21-Expression von seneszenten Melanomzellen geht nicht zwingend mit verstärkter Expression von p53 einher

Die Hochregulation des Zellzyklusregulators p21 wird typischerweise durch p53 vermittelt, kann aber auch über andere Mechanismen ausgelöst werden (s. **Abschnitt 1.3.1**). Zu beiden Zeitpunkten war keine der Behandlungsmethoden in der Lage, eine Hochregulation des p53-Gesamtproteins in der SK-MEL-28-Melanomzelllinie hervorzurufen; im Gegenteil war die p53-Expression 48 h nach der 96-stündigen Behandlung (144 h) mit Zytokinen und Palbociclib verringert im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (**Abbildung 8a**, rechts). Die WM115-Zelllinie allerdings reagierte zu beiden Zeitpunkten auf eine Doxorubicin-Behandlung mit einer Hochregulation von p53; zum späten Zeitpunkt (144 h) bewirkte auch die Behandlung mit Zytokinen eine Steigerung der Expression des p53-Gesamtproteins im Vergleich zur Mediumkontrolle (**Abbildung 8b**, rechts).

Alles in allem ließ sich aufgrund der Western Blot Analysen feststellen, dass sich die Expression von p21 und p53 in Melanomzellen nach Behandlung mit den entsprechenden Seneszenzinduktoren uneinheitlich und teilweise gegensätzlich verhält, so dass eine p53-vermittelte p21-Induktion insgesamt nicht beschrieben werden kann.

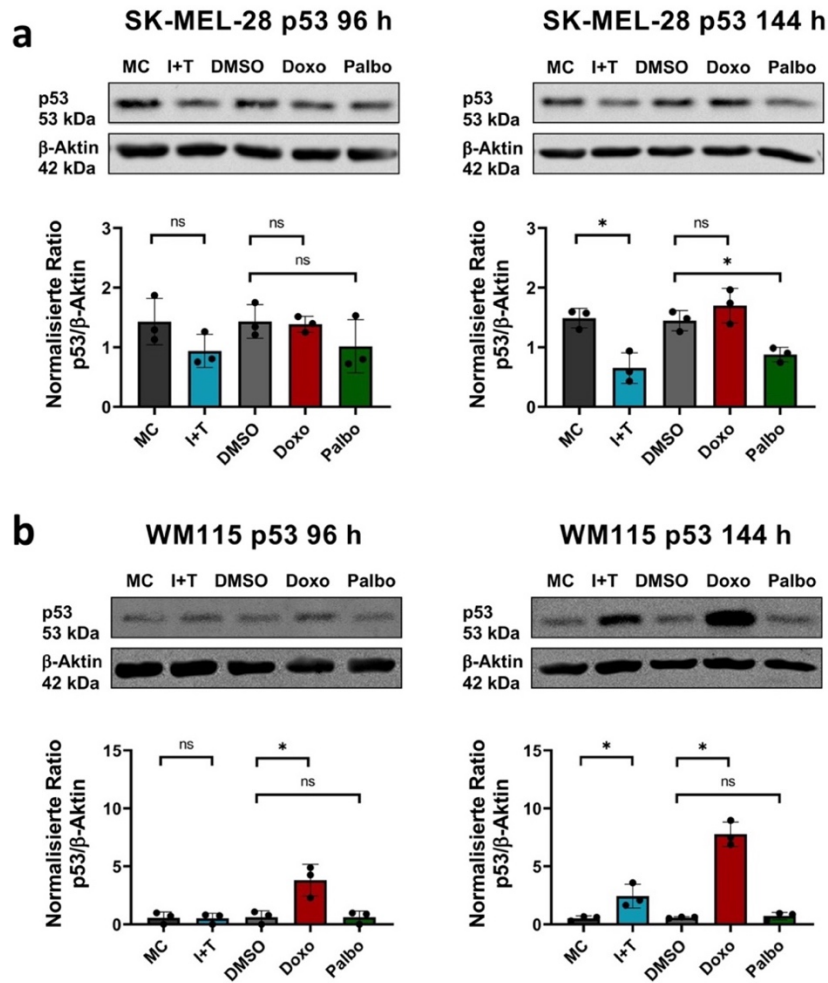


Abbildung 8: Regulation des Zellzyklusinhibitors p53 in Melanomzellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Western Blots von p53 in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung für 96 h (links) sowie 48 h nach Ende der Behandlung (144 h; rechts). MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die semiquantitative densitometrische Analyse der Expression von p53 wurde auf die Expression von β -Aktin normalisiert; diese p53/ β -Aktin-Ratio wurde anschließend normalisiert auf die Mediumkontrolle bei 0 h (untere Reihe; Daten von MC 0 h werden nicht gezeigt). MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; ns, nicht signifikant; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

3.2.3 Stabiler Zellzyklusarrest vor allem in der G1-Phase nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib

Anschließend wurde untersucht, in welcher Phase des Zellzyklus sich die wachstumsarretierten Melanomzellen nach Behandlung mit IFN- γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib befanden.

Zu diesem Zweck wurde eine 7AAD-BrdU-FACS-Analyse von Zytokin-, Doxorubicin- und Palbociclib-behandelten SK-MEL-28- und WM115-Zellen durchgeführt. Jede dieser Behandlungen verringerte den Anteil der SK-MEL-28- (**Abbildung 9 a – c** und **Abbildung 11a**) und WM115-Melanomzellen (**Abbildung 10 a – c** und **Abbildung 11b**) in der S-Phase des Zellzyklus, wodurch die erfolgreiche Induktion eines stabilen Wachstumsarrests durch alle drei Seneszenztrigger bestätigt wurde. Außerdem nahm der Anteil an Zellen in der SubG1-Phase als Reaktion auf die Behandlung mit Zytokinen und Doxorubicin zu. Nach 96 h und 144 h war die Mehrheit der Zytokin-behandelten Melanomzellen in der G1-Phase, während der Prozentsatz an Zellen sowohl in der SubG1- als auch in der G2-Phase zunahm. Die Seneszenzinduktion durch das genotoxische Medikament Doxorubicin war mit einem bemerkenswerten Anteil von Zellen in der SubG1-Phase verbunden, welche auch mit Apoptose assoziiert ist; der Unterschied zur DMSO-Kontrolle war in der Two-way ANOVA allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Behandlung mit Palbociclib hingegen hatte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keinen vergleichbaren Effekt wie Doxorubicin. In Einklang mit den Ergebnissen, welche in **Abbildung 2** und **Abbildung 3** gezeigt wurden, führte die Behandlung mit Doxorubicin zu deutlich mehr polyploiden Zellen ($> 4n$) als die Behandlung mit Zytokinen und Palbociclib (**Abbildung 9b** und **c**, Mitte; **Abbildung 10b** und **c**, Mitte); aber auch dieser Unterschied erreichte in der Two-way ANOVA nicht das Signifikanzniveau ($p > 0,05$).

Zusammenfassend arretierten seneszente Melanomzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus, wobei sich gewisse Unterschiede in der individuellen Ausprägung des Zellzyklusarrests in Abhängigkeit vom Induktor zeigten.

SK-MEL-28

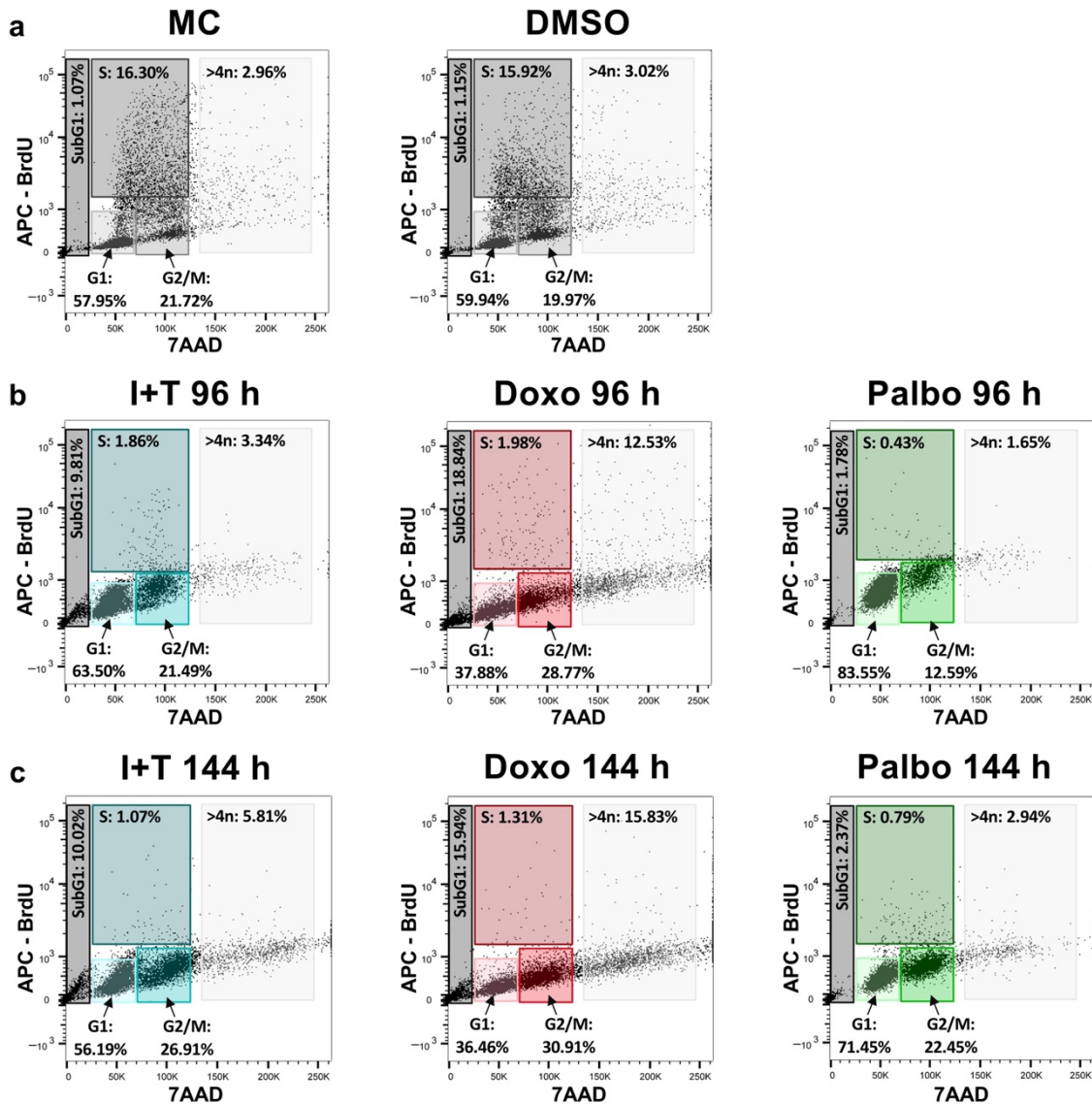


Abbildung 9: Charakterisierung des durch Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib ausgelösten Zellzyklusarrests in SK-MEL-28-Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). Repräsentative zweidimensionale Histogramme, welche die Verteilung von SK-MEL-28-Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (SubG1, G1, S, G2/M und > 4n) nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) sowie die entsprechenden Kontrollen zeigen. MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden nach der 96-stündigen Behandlung (**a**, **b**) sowie 48 h nach Wegnahme der Induktoren (144 h; **c**) durchgeführt. Repräsentative Abbildungen von einem von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

WM115

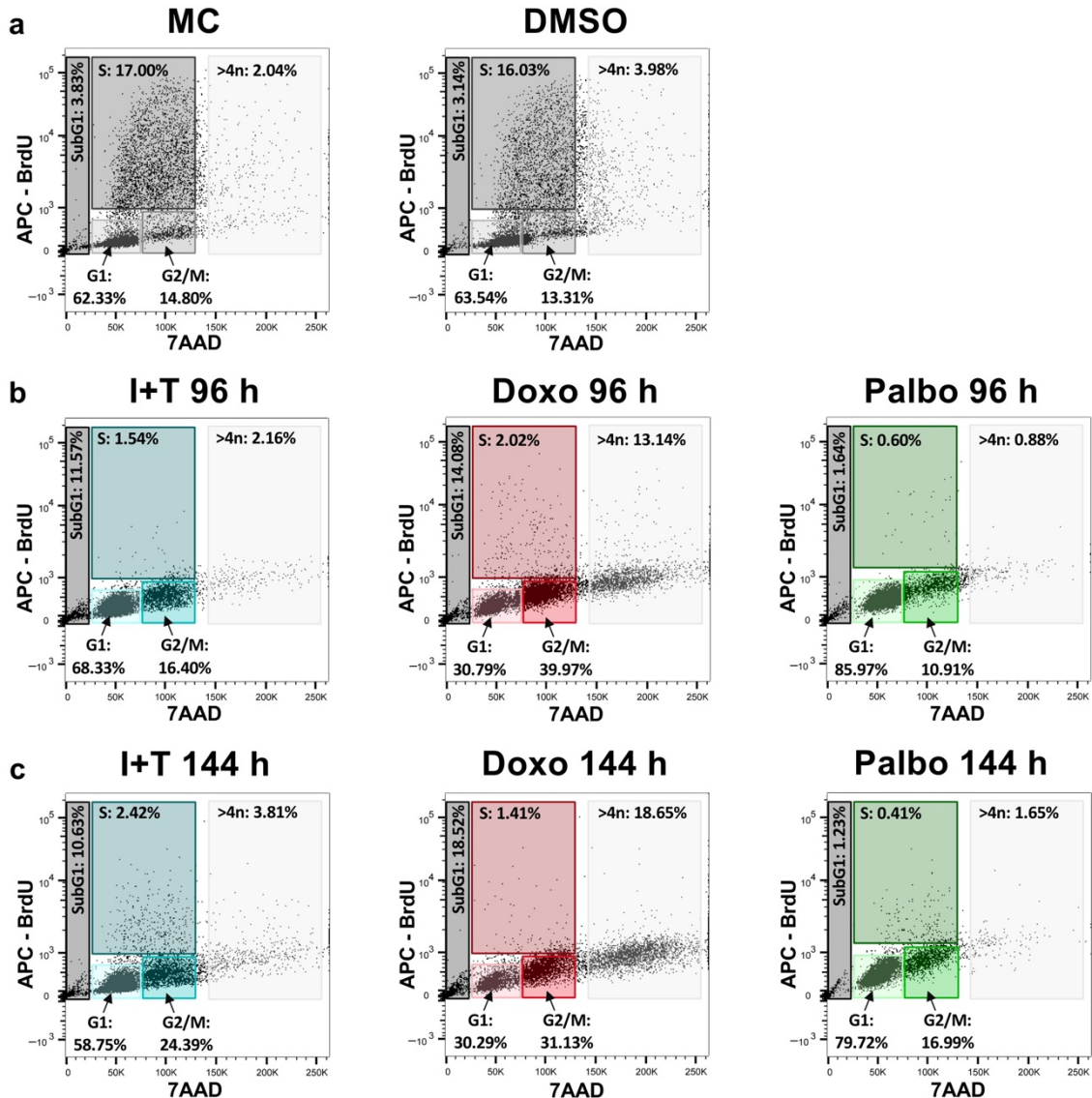


Abbildung 10: Charakterisierung des durch Behandlung mit Zytokinen, Doxorubicin und Palbociclib ausgelösten Zellzyklusarrests in WM115-Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). Repräsentative zweidimensionale Histogramme, welche die Verteilung von WM115-Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (SubG1, G1, S, G2/M und > 4n) nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) sowie die entsprechenden Kontrollen zeigen. MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden nach der 96-stündigen Behandlung (**a**, **b**) sowie 48 h nach Wegnahme der Induktoren (144 h; **c**) durchgeführt. Repräsentative Abbildungen von einem von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

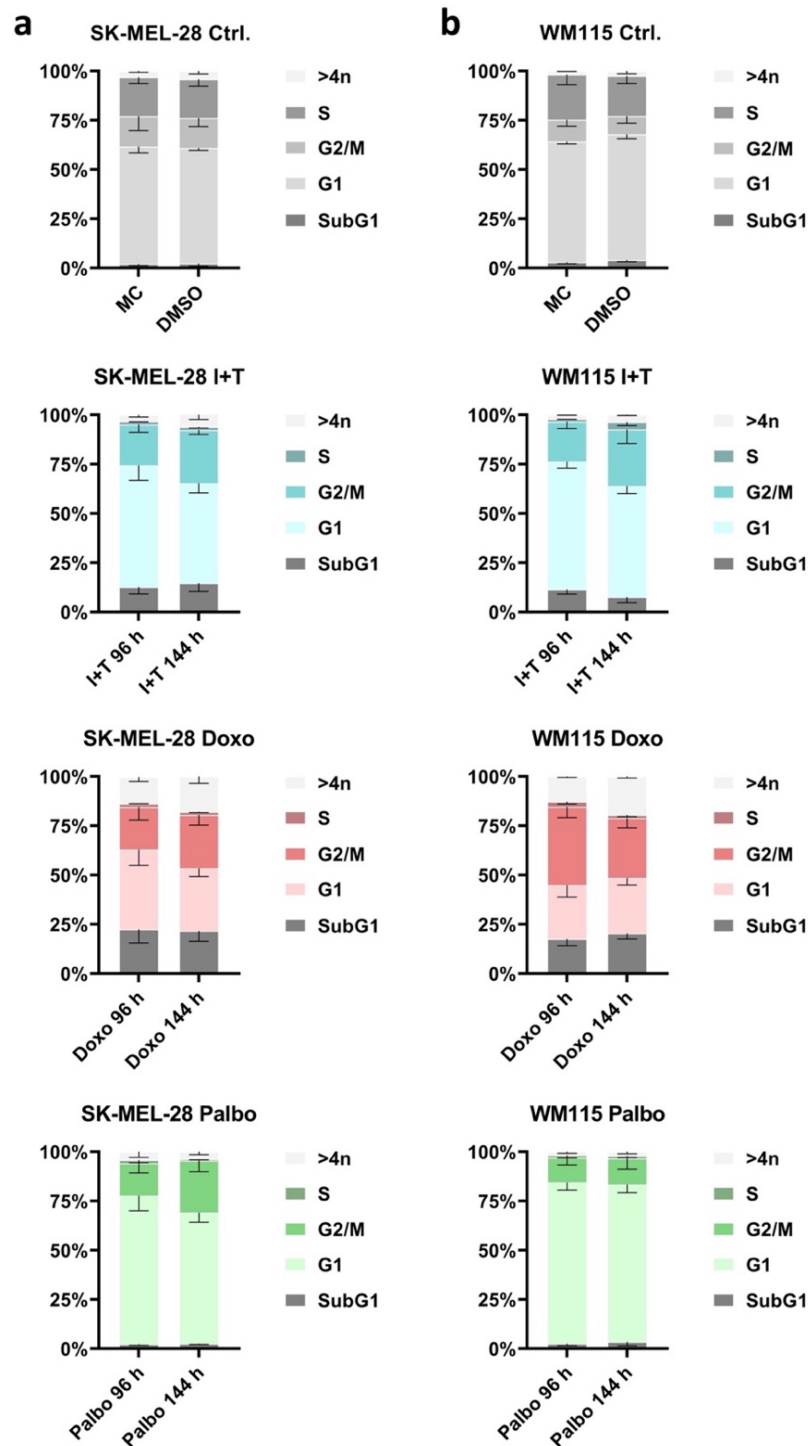


Abbildung 11: Quantifizierung von SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) sowie entsprechende Kontrollen (Ctrl.) (nach Homann et al. 2022). MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle. MW \pm SD; n=3; die statistische Analyse mittels Two-way ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen der S-Phase jeder Behandlung zu beiden Zeitpunkten und der entsprechenden Kontrolle (die p-Werte sind in **Tabelle 16** angegeben).

In **Tabelle 16** sind die p-Werte der statistischen Analyse von **Abbildung 11a** und **b** angegeben, bei der mittels Two-way ANOVA ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der S-Phase jeder Behandlung zu beiden Zeitpunkten sowohl bei SK-MEL-28- (**Abbildung 11a**) als auch bei WM115- (**Abbildung 11b**) Melanomzellen im Vergleich zur S-Phase der entsprechenden Kontrolle ermittelt wurde.

Tabelle 16: Statistische Analyse der Zellzyklusanalyse (Abbildung 11) mittels Two-way ANOVA, Angabe der p-Werte beim Vergleich der S-Phase der Behandlungen mit den entsprechenden Kontrollen (nach Homann et al. 2022).

Zelllinie	96 h	144 h
SK-MEL-28	I+T: < 0,0001 Doxo: 0,0003 Palbo: 0,00003	I+T: 0,0001 Doxo: 0,0002 Palbo: 0,0002
WM115	I+T: < 0,0001 Doxo: < 0,0001 Palbo: < 0,0001	I+T: < 0,0001 Doxo: < 0,0001 Palbo: < 0,0001

3.3 Zwischenfazit

Bisher wurde untersucht, wie sich die Expression typischer Seneszenz-assoziiierter Marker (SA- β -Gal-Aktivität, Zellmorphologie, Wachstumsarrest, p16-/p21-Regulation, Zellzyklusarrest) in Melanomzellen durch die Behandlung mit dem Zytokin-Cocktail IFN- γ und TNF sowie den Therapeutika Doxorubicin und Palbociclib veränderten, ob diese Veränderungen nach Ende der Behandlung stabil blieben und ob die Seneszenzinduktoren zytotoxische Effekte hatten. Jede Behandlung steigerte die Aktivität der SA- β -Gal, induzierte einen stabilen Wachstums- und Zellzyklusarrest, und veränderte die Zellmorphologie auf eine für die Seneszenz charakteristische Art. Eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung hatte keiner der Seneszenztrigger. Die Expression von p21 wurde durch die Behandlung mit Zytokinen und Doxorubicin verstärkt, während die Palbociclib-Behandlung keinen solchen Effekt hatte. In den anschließenden Abschnitten dieser Arbeit wird nun das

Sekretom der behandelten Melanomzellen untersucht. Da in den Vorversuchen etabliert wurde, dass die Melanomzellen mit einer Induktion der Seneszenz auf jede der einzelnen Behandlungen reagierten, können diese Sekretome als SASP bezeichnet werden. Wie sich die verschiedenen SASPs der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im Detail zusammensetzten, galt es in den folgenden Versuchen herauszufinden.

3.4 Zytokin-induzierte Seneszenz in Melanomzellen ist mit einem stärker proinflammatorischen SASP assoziiert im Vergleich zur Therapie-induzierten Seneszenz

Nach der Untersuchung und Beschreibung der unterschiedlichen Behandlungs-abhängigen Charakteristika seneszenten SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen wurde der SASP im Kontext der ZIS mit dem SASP im Kontext der TIS verglichen. Damit tatsächlich das Sekretom seneszenten Zellen und nicht die unmittelbaren Effekte der Zytokin- oder Therapeutika-Behandlung gemessen werden, wurden die folgenden Analysen 48 h nach Ende jeder Behandlung durchgeführt; zum Zeitpunkt der Analysen standen die Zellen also seit zwei Tagen nicht mehr unter dem direkten Einfluss der verschiedenen Seneszenzinduktoren.

3.4.1 Zytokin-induzierte Seneszenz erhöht die Genexpression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in größerem Umfang als Therapie-induzierte Seneszenz

Als erstes Screening wurde die Genexpression von 84 Faktoren untersucht, welche typischerweise mit dem SASP assoziiert sind, darunter zahlreiche Zytokine aus der Familie der Interleukine oder Chemokine aus der CCL- oder CXCL-Reihe. Hierfür wurden PrimePCR Profiler Arrays der Firma Bio-Rad verwendet. Als Cut-Off-Wert für eine Hoch- bzw. Downregulation wurde ein mindestens zweifacher Unterschied bzw. eine Halbierung im Vergleich zur Medium- bzw. DMSO-Kontrolle festgelegt. Als Haushaltsgene wurden *GAPDH*, *HPRT1* und *TBP* verwendet. Die Analysen mit den qPCR-Arrays zeigten, dass in allen Versuchsgruppen mit Behandlung die Genexpression von Zytokinen

und Chemokinen auf mRNA-Ebene gesteigert wurde; bei ZIS allerdings fiel diese Steigerung in beiden Melanomzelllinien deutlich stärker und umfangreicher aus als bei TIS (**Abbildung 12a** und **b**). Insbesondere Interleukine wie *IL1B* und *IL8* oder Chemokine wie *CXCL10* und *CXCL11* wurden bei ZIS auf deutlich höherem Niveau exprimiert. Weiterhin reagierten die WM115-Zellen mit einer gesteigerten Expression von *CCL2*, während bei den SK-MEL-28-Zellen die Expression dieses Zytokins nicht verändert wurde (vergleiche **Abbildung 12a** und **b**). Ein sogar gegensätzliches Expressionsverhalten zeigten die beiden Zelllinien in Bezug auf *IL24*, welches sowohl nach Behandlung mit Zytokinen als auch mit Doxorubicin von den SK-MEL-28 vermehrt (**Abbildung 12a**), aber von den WM115-Zellen vermindert exprimiert wurde (**Abbildung 12b**). Von den untersuchten Genen war in beiden Zelllinien und in allen Versuchsgruppen mit Behandlung allein die Expression von *IL1B* einheitlich gesteigert.

Obwohl WM115-Melanomzellen nach Doxorubicin-Behandlung ebenso viele Faktoren hoch- wie herunterregulierten, war der Betrag der Hochregulation höher als der Betrag der Herunterregulation, so dass auch hier eine Steigerung der Zytokin- und Chemokinexpression beschrieben werden konnte (**Abbildung 12b**).

Insgesamt zeichnete sich ab, dass Melanomzellen im Kontext der ZIS mit einer deutlich gesteigerten Expression von in der Mehrzahl proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen reagierten als im Kontext der TIS.

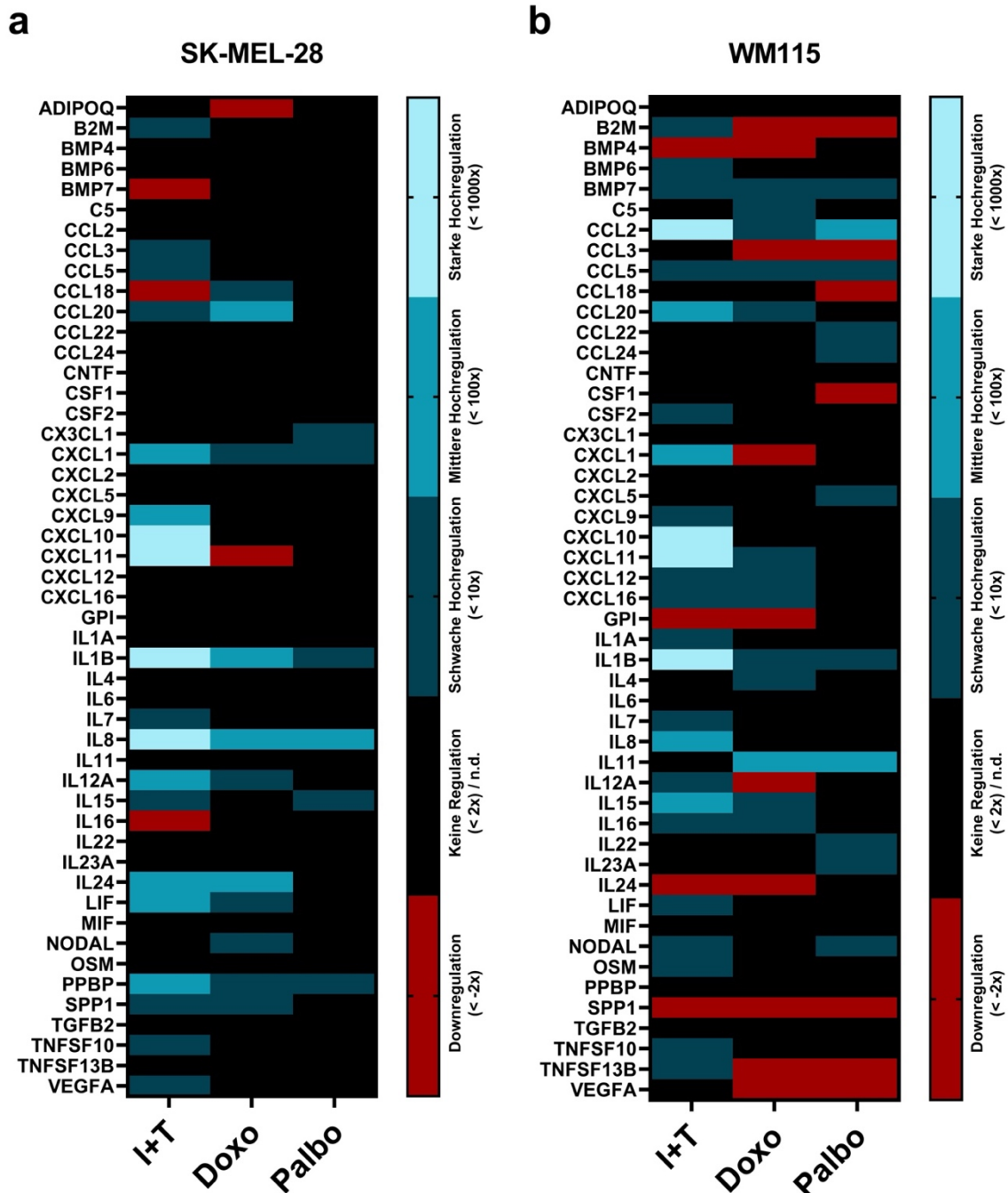


Abbildung 12: Genexpression von Zytokinen und Chemokinen in SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung mit $IFN-\gamma$ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Die qPCR-Array-Analysen wurden 48 h nach Ende der Behandlung durchgeführt. Die Genexpression der Zytokin-behandelten Zellen wurde normalisiert zur Mediumkontrolle, während die Genexpression der Doxorubicin- und Palbociclib-behandelten Zellen zur DMSO-Kontrolle normalisiert wurde. Die Ergebnisse sind von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$) und zeigen den Mittelwert; n.d., nicht determinierbar.

3.4.2 Zytokin-induzierte Seneszenz verstärkt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in größerem Umfang als Therapie-induzierte Seneszenz

Im Anschluss an die Analysen auf RNA-Ebene (**Abbildung 12**) wurde die Sekretion von Proteinen in den Überstand seneszenten Zellen untersucht. Die Generierung der Überstände wurde bereits in **Abschnitt 2.2.4** beschrieben. Es sei an dieser Stelle nochmals an den Begriff „Konditioniertes Medium“ erinnert; KM beschreibt hier das Medium der seneszenten Zellen 48 h nach Ende der Behandlung. Mit der Wegnahme der Seneszenzinduktoren war auch ein Mediumwechsel verbunden. Das analysierte KM wurde somit auch durch die seneszenten Zellen verändert, bspw. durch Sekretion von SASP-Molekülen oder Vesikeln. Während der SASP also Bestandteil des KM ist, umfasst das KM sämtliche durch seneszenten Zellen ausgelöste Veränderungen im Kulturmedium.

Auch für die Proteinuntersuchungen wurden zunächst Array-Analysen durchgeführt. Mithilfe von Proteome Profiler Arrays der Firma R&D Systems wurden die Überstände seneszenten SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen auf 105 Zytokine und Chemokine untersucht. Die densitometrisch ermittelten Messwerte der behandelten Melanomzellen wurden auf die Mediumkontrolle normalisiert. Im Vorfeld sei darauf hingewiesen, dass die analysierten Überstände von Zellpopulationen gewonnen wurden, welche versuchsbedingt enorme Unterschiede hinsichtlich ihrer Zellzahlen aufwiesen (**Tabelle 17**).

Die Tendenz, welche sich bei den RNA-Analysen (**Abbildung 12**) zeigte, spiegelte sich auch bei den Protein-Analysen wider: ZIS bewirkte in beiden Melanomzelllinien eine deutlich gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Moleküle als TIS (**Abbildung 13a** und **b**). Seneszenten Zellen beider Zelllinien sezernierten im Rahmen der ZIS verstärkt u.a. IL-1 β , IL-4, CXCL9, -10, -11 und CCL2. Die SK-MEL-28-Zellen setzten sowohl bei ZIS als auch bei TIS verstärkt Dickkopf-Related Protein 1 und Serpin E1 an ihre Umgebung frei (**Abbildung 13a**). Ausschließlich bei ZIS sezernierten SK-MEL-28-Zellen verstärkt u.a. CCL5 und TNF- α ; TNF- α wurde neben IFN- γ zur Induktion der ZIS verwendet,

wobei die Sekretion von IFN- γ weder durch ZIS noch durch TIS in keiner der beiden Zelllinien verändert wurde. Kein Faktor wurde allein bei TIS und nicht bei ZIS vermehrt ausgeschüttet. Auch wurde kein Protein von SK-MEL-28 Zellen einheitlich nach jeder der drei Behandlungen weniger freigesetzt als bei der Kontrolle. Während bei dieser Zelllinie die Behandlung mit Therapeutika die vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Proteinen bewirken konnte, so hatte bei den WM115-Zellen weder die Behandlung mit Doxorubicin noch mit Palbociclib eine gesteigerte Freisetzung der analysierten SASP-Faktoren zur Folge (**Abbildung 13b**).

Die in **Abbildung 13** dargestellten Ergebnisse der Analysen der Überstände seneszenten Zellen sind dadurch limitiert, dass die Überstände von unterschiedlich großen Zellpopulationen (**Tabelle 17**) gewonnen wurden. Um die exakte Sekretionsleistung von jeder Behandlungs- und Kontrollgruppe zu messen, wurden anschließend individuelle ELISA-Analysen von ausgewählten Faktoren durchgeführt, die im Rahmen der RNA- oder Protein-Untersuchungen auffällig hochreguliert waren und häufig als SASP-Bestandteile beschrieben wurden: IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12. Gleichzeitig wurde die Zellzahl jeder Zellpopulation ermittelt und die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden auf 500.000 Zellen normalisiert. Auch in diesen Experimenten bestätigte sich die in **Abbildung 12** und **Abbildung 13** beobachtete Tendenz: Zytokin-behandelte SK-MEL-28- und WM115-Zellen sezernierten signifikant mehr IL-1 β (**Abbildung 14a**), IL-6 (**Abbildung 14b**) und IL-8 (**Abbildung 14c**) als die Kontroll- und Therapeutika-behandelten Melanomzellen ($p < 0,05$). Die Behandlung mit Doxorubicin bewirkte in SK-MEL-28-Zellen ebenfalls eine signifikant stärkere Sekretion der untersuchten Interleukine (**Abbildung 14a – c**, linke Spalte), aber nicht in den WM115-Zellen (**Abbildung 14a – c**, rechte Spalte). Nach Palbociclib-Behandlung wurde in beiden Zelllinien nur IL-8 vermehrt freigesetzt, während der Zellzyklusinhibitor bei den WM115-Zellen die Sekretion von IL-6 noch steigerte, wenn auch zu einem deutlich geringeren Ausmaß als die Zytokinbehandlung. Weder die Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40 noch das Gesamtprotein IL-12p70 wurden von den Melanomzellen ausgeschüttet. Eine Sekretion von IL-12 wurde auch nicht durch Einleitung der ZIS oder TIS

ausgelöst (**Abbildung 14d**). Lediglich die Genexpression der p35-Untereinheit (*IL12A*) war im Kontext der ZIS hochreguliert (**Abbildung 12a und b**), aber nicht die Expression der p40-Untereinheit, so dass das Gesamtprotein nicht gebildet und sezerniert werden konnte. Eine Sekretion der einzelnen Untereinheiten wurde bisher nicht beobachtet.

Sowohl die Protein-Array- wie auch die ELISA-Analysen zeigten, dass sich der SASP nach Doxorubicin-Behandlung nur gering vom SASP nach Palbociclib-Behandlung unterschied. Die Zusammenfassung beider Seneszenz-Phänotypen als „Therapie-induzierte Seneszenz“ ist daher nach wie vor als sinnvoll zu erachten. Die klare Abgrenzung der ZIS von diesem Seneszenzphänotyp erscheint aber aufgrund der Analyse des SASPs als dringend geboten.

Zusammenfassend setzte sich der SASP von Melanomzellen während ZIS aus einer Vielzahl verschiedener Chemokine und Zytokine zusammen, welche in verhältnismäßig hoher Konzentration vorlagen. Im Vergleich dazu bestand der SASP von Melanomzellen während TIS aus einem schmaleren Spektrum proinflammatorischer Faktoren, welche in geringeren Konzentrationen freigesetzt wurden. Insgesamt zeichnete sich die ZIS also durch die Sekretion eines SASPs mit einem starken proinflammatorischen Profil aus.

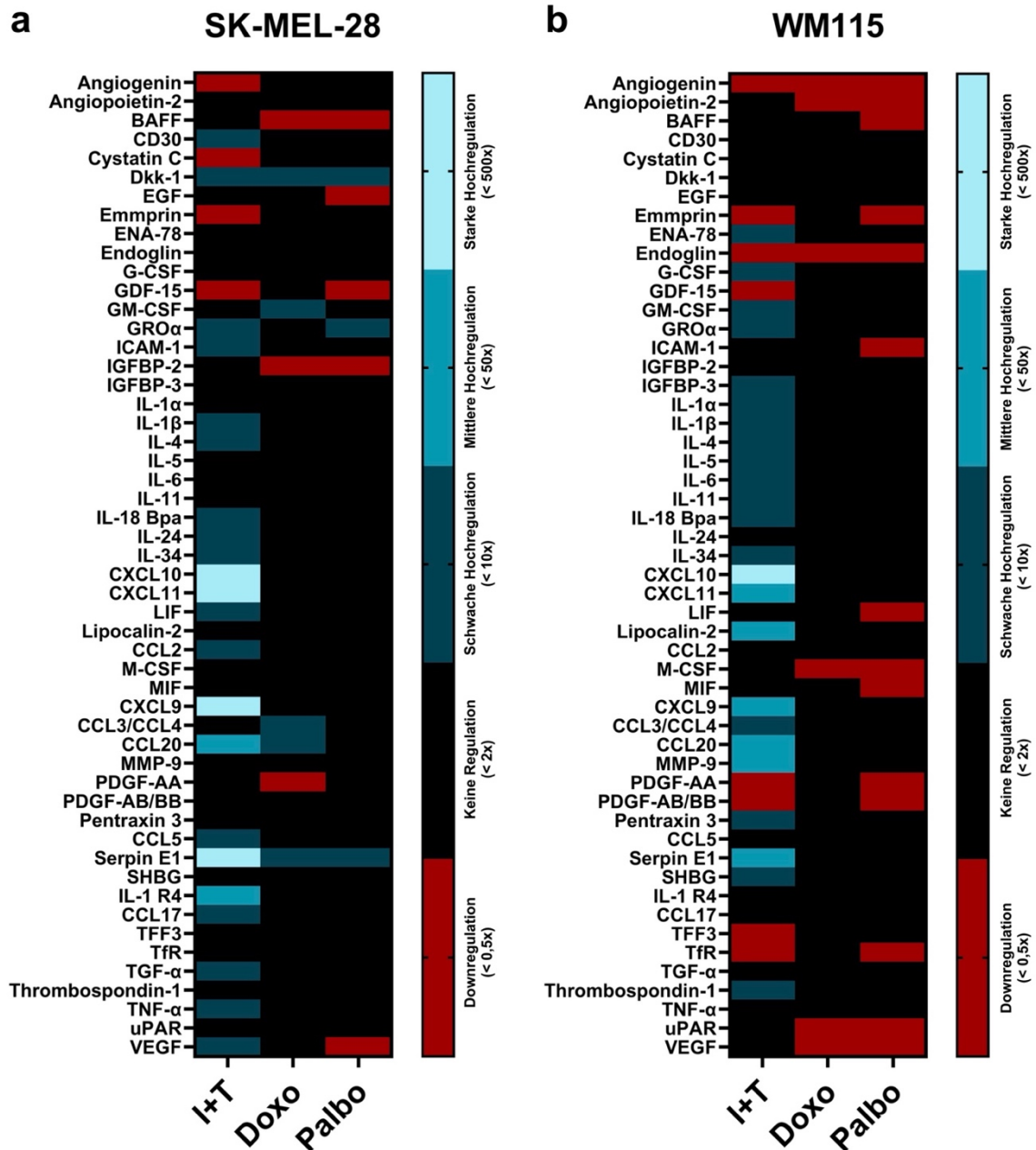


Abbildung 13: SASP-Analyse von seneszenten SK-MEL-28- (a) und WM115-Melanomzellen (b) nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo) (nach Homann et al. 2022). Die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen von seneszenten Melanomzellen wurde mithilfe von Proteome Profiler Arrays bestimmt. Die Überstände wurden 48 h nach Ende der Behandlung und damit zwei Tage nach Wegnahme der Induktoren analysiert. Die Zellzahlen in den verschiedenen Behandlungen und Kontrollen haben sich versuchsbedingt deutlich unterschieden und sind in **Tabelle 17** angegeben. Die densitometrischen Messungen von Proteinen in den Überständen von Zytokin-, Doxorubicin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen wurden auf die Mediumkontrolle normalisiert. Die Ergebnisse sind von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) und zeigen den jeweiligen Mittelwert.

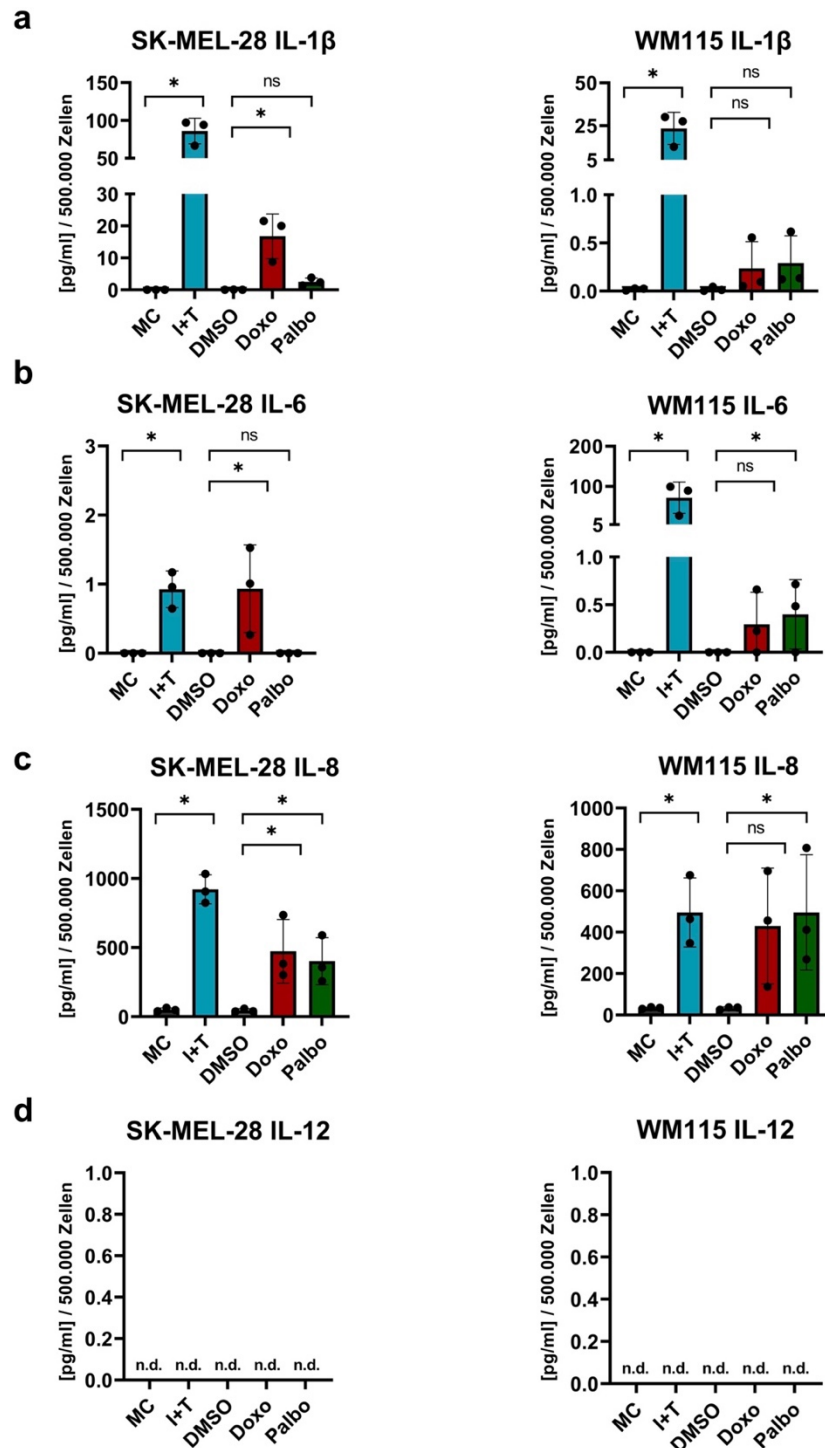


Abbildung 14: Quantifizierung von ausgewählten Zytokinen im Überstand seneszenten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). ELISA-Analysen von IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-12 (d) im Überstand von SK-MEL-28- (links) und WM115-Zellen (rechts) 48 h nach Behandlung mit IFN- γ und TNF (I+T), Doxorubicin (Doxo) und Palbociclib (Palbo). Die Messwerte wurden normalisiert auf 500.000 Zellen. a – c, MW \pm SD; n=3; One-way ANOVA; ns, nicht signifikant; n.d.; nicht determinierbar; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

In **Tabelle 17** sind die Mittelwerte der Zellzahlen ($\times 10^6$) derjenigen SK-MEL-28- und WM115-Zellen sowie die entsprechenden Standardabweichungen angegeben, deren Überstände mittels Proteome Profiler Arrays (**Abbildung 13**) und ELISA (**Abbildung 14**) im **Abschnitt 3.4.2** analysiert wurden.

Tabelle 17: Zellzahlen ($\times 10^6$) der in diesem Abschnitt untersuchten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). MW \pm SD; n=3.

Zelllinie	Ktrl.	I+T	Doxo	Palbo
SK-MEL-28	15,64 (\pm 1,21)	0,70 (\pm 0,04)	1,45 (\pm 0,09)	1,27 (\pm 0,04)
WM115	18,26 (\pm 1,50)	1,34 (\pm 0,08)	1,50 (\pm 0,08)	1,32 (\pm 0,04)

3.5 Seneszente Melanomzellen können in Abhängigkeit vom Induktor eigenständig Seneszenz induzieren

Nach der deskriptiven Charakterisierung des SASPs im Kontext von ZIS und TIS sollte in einem funktionellen Experiment untersucht werden, ob die unterschiedlichen SASPs in bis dahin unbehandelten Melanomzellen Seneszenz induzieren können. Daher wurde nach 96-stündiger Behandlung von SK-MEL-28- und WM115-Zellen mit den im **Abschnitt 3.4.2** untersuchten Überständen, welche im Folgenden auch als KM bezeichnet werden, die Induktion der Aktivität der SA- β -Gal färberisch untersucht. Sowohl die Behandlung mit I+T-KM wie auch mit Palbo-KM steigerte die Aktivität der SA- β -Gal signifikant in SK-MEL-28- und WM115-Zellen (**Abbildung 15a** und **b**; **Abbildung 16a** und **b**). Auch reagierten diese behandelten Zellen mit der Ausbildung des für die Seneszenz typischen breiten, flachen Zelleibs. Im Gegensatz dazu konnten keine Effekte auf die SA- β -Gal-Aktivität nach Behandlung mit Doxo-KM beobachtet werden. Obwohl Doxo-KM und Palbo-KM eine grundsätzlich ähnlich niedrige Konzentration proinflammatorischer und potenziell Seneszenz-induzierender Faktoren aufwiesen (**Abbildung 13** und **Abbildung 14**), zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen KMs.

Kurzum konnte das KM von seneszenten Melanomzellen nach Behandlung mit Zytokinen bzw. Palbociclib, aber nicht nach Behandlung mit Doxorubicin,

eigenständig Seneszenz in anderen, vorher unbehandelten Melanomzellen induzieren.

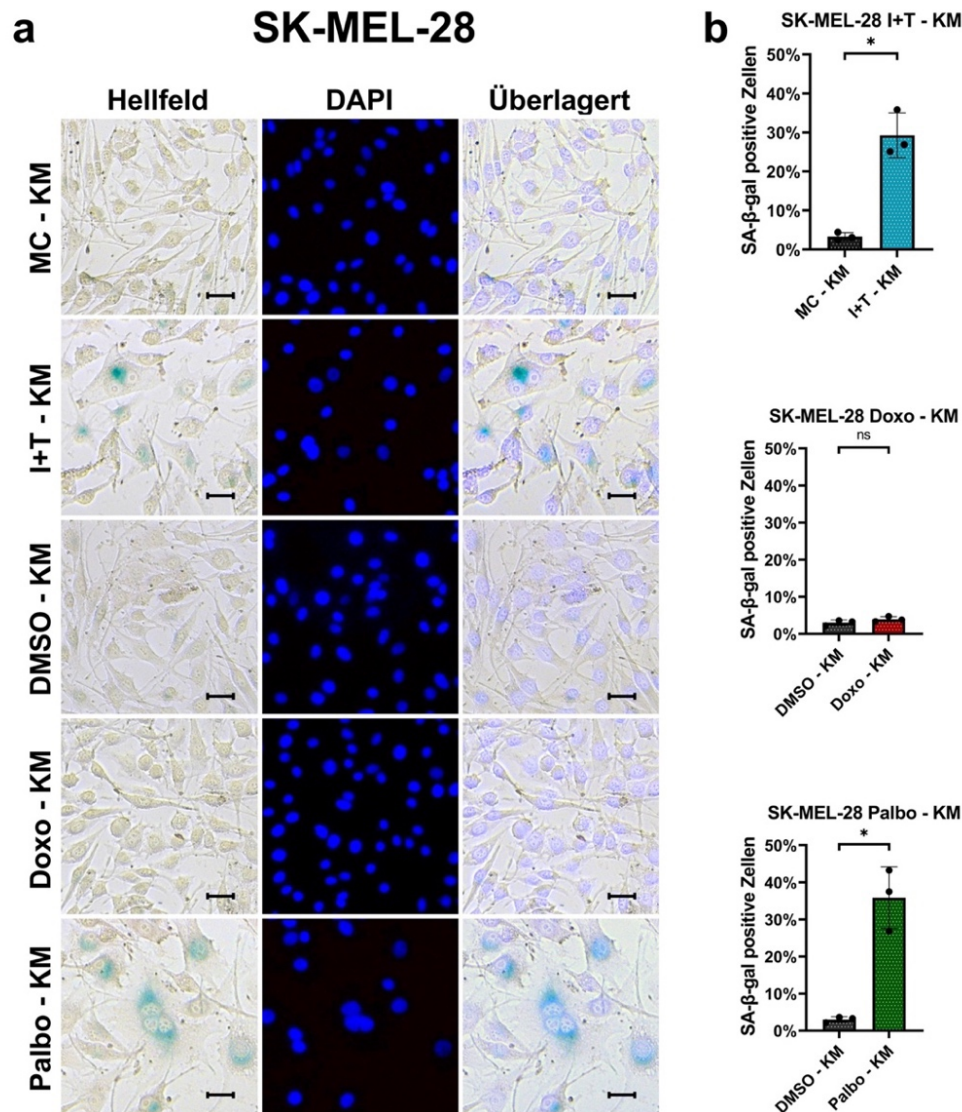


Abbildung 15: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in naiven SK-MEL-28-Melanomzellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium von Zytokin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). **a**, Repräsentative Bilder der SA-β-Gal-Färbung 96 h nach Behandlung mit den konditionierten Medien (KM) von Zytokin (I+T)-, Doxorubicin (Doxo)-, und Palbociclib (Palbo)-behandelten SK-MEL-28-Melanomzellen. **b**, Quantifizierung der SA-β-Gal-positiven Zellen. MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle; es wurde dieselbe DMSO-KM-Kontrolle für Doxo-KM und Palbo-KM verwendet, weswegen dieselben Werte gezeigt werden. Maßstabsbalken = 50 μ m. MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

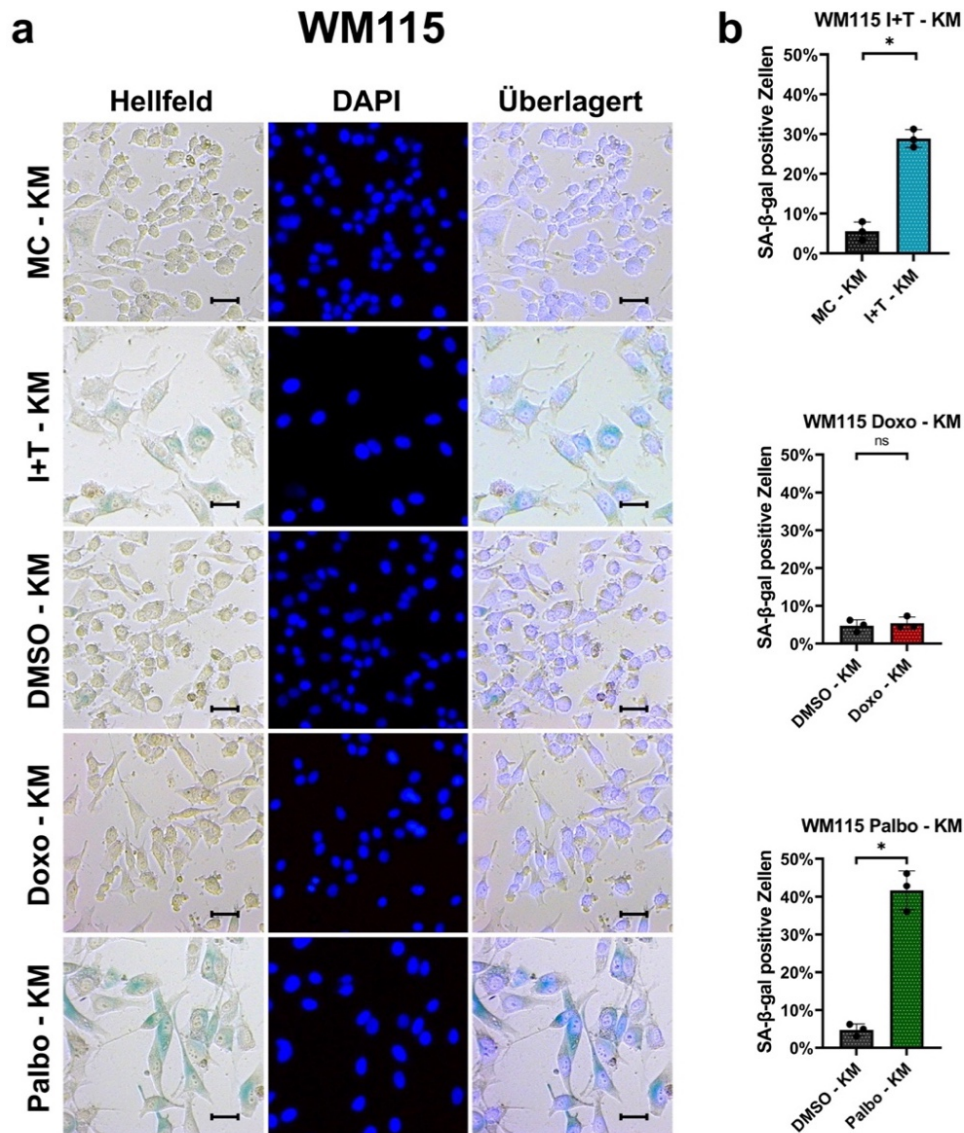


Abbildung 16: Induktion der SA-β-Gal-Aktivität in naiven WM115-Melanomzellen nach Behandlung mit konditioniertem Medium von Zytokin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen (nach Homann et al. 2022). **a**, Repräsentative Bilder der SA-β-Gal-Färbung 96 h nach Behandlung mit den konditionierten Medien (KM) von Zytokin (I+T)-, Doxorubicin (Doxo)-, und Palbociclib (Palbo)-behandelten WM115-Melanomzellen. **b**, Quantifizierung der SA-β-Gal-positiven Zellen. MC, Mediumkontrolle. DMSO, Vehikelkontrolle; es wurde dieselbe DMSO-KM-Kontrolle für Doxo-KM und Palbo-KM verwendet, weswegen dieselben Werte gezeigt werden. Maßstabsbalken = 50 μ m. MW \pm SD; n=3; Unpaired Student's t-test; das Sternchen (*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur entsprechenden Kontrolle an mit $p < 0,05$.

4 Diskussion

Diese komparative Analyse zeigte, dass seneszente Melanomzellen während ZIS wesentlich mehr Zytokine und Chemokine an ihre Umgebung freisetzen als während TIS. Weiterhin wurde demonstriert, dass seneszente Melanomzellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus verharrten, abhängig vom Seneszenzinduktor. Außerdem wurde dargestellt, dass der Zellzyklusregulator p21 am ehesten den Wachstumsarrest der Zytokin- und Doxorubicin-behandelten Melanomzellen ausgelöst hat. Abschließend wurde gezeigt, dass die KM von Zytokin- und Palbociclib-behandelten Melanomzellen in naiven Melanomzellen Seneszenz induzieren konnten, während das KM von Doxorubicin-behandelten Melanomzellen keinen solchen Effekt hatte.

4.1 ZIS und ICB

ZIS kann auch unabhängig von der Immuntherapie beobachtet werden (Braumüller et al. 2013; Homann et al. 2022; Rentschler et al. 2022; Rentschler et al. 2018). Auch ohne eine Disinhibition durch ICB werden im Rahmen einer natürlichen Immunantwort die Zytokine IFN- γ und TNF von T_H1-Zellen freigesetzt, wenn auch in niedrigeren Konzentrationen (Braumüller et al. 2013; Brenner et al. 2020), bspw. gegen Tumorzellen oder gegen mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierte Makrophagen (Orme et al. 1993). Auch NK-Zellen sezernieren nach Stimulation durch Typ-I-IFN die Seneszenz-induzierenden Zytokine IFN- γ und TNF (Wang et al. 2012; Welsh 1978).

Im Kontext der ICB mit T_H1-Zell-Zytokinen konnte demonstriert werden, dass Tumor-infiltrierende DZ eine erhöhte IL12/IL-10-Ratio aufwiesen und mehr co-stimulatorische Moleküle exprimieren (Scheuerpflug et al. 2021). Indem DZ effizienter Antigene präsentieren, wird die T-Zell-Antwort gefördert, was zu einer verstärkten Sekretion der Seneszenz-induzierenden Effektor-Zytokine IFN- γ und TNF durch T_H1-Zellen führt (Scheuerpflug et al. 2021).

4.2 Zellzyklusregulatoren

Im Melanom ist die Funktion von p16 (kodiert von *CDKN2A*) oder des p16-Signalwegs häufig gestört (Young et al. 2014). Die SK-MEL-28-Zelllinie

exprimiert WT *CDKN2A*, trägt aber eine Punktmutation im Gen *CDK4*, welche für ein nachgeschaltetes Ziel von p16 kodiert (Castellano et al. 1997). Die WM115-Zelllinie hingegen exprimiert WT *CDK4*, ist aber *CDKN2A*-defizient (Castellano et al. 1997; Young et al. 2014). Die Gene *CDKN1A* und *CDKN2A*, welche für p21 und p27 kodieren, werden in beiden Zelllinien als WT exprimiert (Aliwaini et al. 2019; Ciołczyk-Wierzbicka et al. 2012; Lee et al. 2019; Rizzolio et al. 2020); p27 ist eher mit Quieszenz assoziiert als mit Seneszenz (Gorgoulis et al. 2019). Daher entsprach es den Erwartungen, dass der Wachstumsarrest bei Zytokin- und Doxorubicin-behandelten Melanomzellen mit einer Hochregulation von p21 einherging und p27 in keiner Bedingung stabil reguliert wurde (**Abbildung 6** und **Abbildung 7**). Die Behandlung mit dem CDK4/6-Inhibitor Palbociclib hatte keine Hochregulation von p21 zu Folge; p21 selbst entfaltet seine Wirkung durch Inhibition verschiedener CDKs, darunter auch CDK4/6 (Sobhani et al. 2019). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in der Seneszenz die Funktion von p16 oder p21 durch extrinsische CDK-Inhibitoren ersetzt werden kann, wodurch eine Zelle die intrinsischen CDK-Inhibitoren p16 und p21 nicht benötigt (Leontieva und Blagosklonny 2013; Pennycook und Barr 2021). Dadurch allein wird aber nicht ausreichend erläutert, wieso 48 h nach Wegnahme des CDK4/6-Inhibitors weiterhin ein stabiler Zellzyklusarrest bei fehlender p21-Hochregulation vorlag (**Abbildung 6** und **Abbildung 11**). Die ausbleibende Expression eines Zellzyklusregulators könnte darauf zurückzuführen sein, dass Palbociclib während der Behandlungsphase lysosomal eingelagert und anschließend parakrin in Vesikeln freigesetzt wurde (Llanos et al. 2019). Bezüglich p53, dem prominentesten Regulator von p21, wurde nur bei Doxorubicin-behandelten WM115-Melanomzellen eine stabile Hochregulation beobachtet. Dies war unerwartet, da p21 in beiden Zelllinien sowohl nach Zytokin- als auch nach Doxorubicin-Behandlung als zentraler Zellzyklusregulator fungierte. Diese Ergebnisse deuten auf eine p53-unabhängige Regulation von p21 hin, möglicherweise durch NF- κ B (Galanos et al. 2016; Macleod et al. 1995; Nicolae et al. 2018).

4.3 Mögliche Effekte des SASPs und einzelner Zytokine

Der SASP wird häufig als unerwünschte Nebenwirkung der Seneszenz beschrieben (Campisi 2013). Dabei sind seine möglichen Effekte auf benachbarte Zellen und das Tumor Microenvironment (TME) so vielschichtig wie seine Zusammensetzung (Rentschler et al. 2022). So kann der SASP das Tumorwachstum fördern, die epithelial-mesenchymale Transition fördern oder die Motilität benachbarter (Tumor-)Zellen steigern; allerdings kann der SASP die Seneszenz auf autokrinem oder parakrinem Weg verstärken, Immunzellen stimulieren und anlocken, welche seneszente Zellen gezielt erkennen und zerstören können, sowie die Reparatur von defektem Gewebe und die Wundheilung induzieren (Campisi 2013; Coppé et al. 2010; Homann et al. 2022; Sagiv und Krizhanovsky 2013). Der SASP erzeugt durch die Sekretion zahlreicher Zytokine und Chemokine ein proinflammatorisches Milieu. Es muss berücksichtigt werden, dass die Auswirkungen eines entzündlichen Milieus auch von dessen Dauer abhängig sind. In diesem Kontext kann eine therapeutische Induktion einer kurzzeitigen Entzündung, z.B. durch adoptiven Transfer von Immunzellen (Braumüller et al. 2013; Brenner et al. 2020), das Krebswachstum wirksam kontrollieren und als antitumoral angesehen werden.

Die wichtigsten Komponenten des SASPs von Zytokin-behandelten Melanomzellen waren IL-1 β , IL-6 und IL-8 (**Abbildung 14**). Die Effekte dieses SASPs sind kontextabhängig. Auf der einen Seite könnte dieses Sekretom schädliche Effekte haben, da IL-1 β die vaskuläre Permeabilität steigern (Tucci et al. 2014), IL-6 im Kontext vom malignen Melanom DZ und damit eine wichtige Schaltstelle der adaptiven Immunantwort inhibieren (Tucci et al. 2014), die Migration von Tumorzellen fördern (Shurin et al. 2006) und – wie IL-8 – das Tumorwachstum begünstigen könnte (Shoshan et al. 2016; Yu et al. 2014). Weiterhin sprechen Melanom-Patienten mit hohem Serum-IL-8-Level schlechter auf eine ICB an als solche mit niedrigem IL-8-Serum-Level (Sanmamed et al. 2017). In Mäusen, denen ein Melanom transplantiert wurde, konnte nach Gabe von Cisplatin durch intratumoral injizierte neutralisierende Antikörper gegen die SASP-Faktoren IL-1 α und IL-8 eine Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt werden (Sun et al. 2018). Auf der anderen Seite könnte der SASP auch

positive Effekte haben. So hemmt IL-1 β das Melanomwachstum *in vivo* (Lázár-Molnár et al. 2000; Pezzella et al. 1990), und IL-6 und IL-8 können autokrin bzw. parakrin Seneszenz verstärken oder gar induzieren (Hubackova et al. 2012; Ortiz-Montero et al. 2017) und so potenziell zur Tumorkontrolle beitragen. Die Chemokine CXCL10 und CXCL11 wirken anti-angiogen und können so Tumorwachstum und Metastasierung hemmen (Braumüller et al. 2013). In SK-MEL-28-Melanomzellen war außerdem die Sekretion von CCL2 gesteigert (**Abbildung 13a**), welches über die Rekrutierung von myeloischen Zellen zur Beseitigung seneszenten Tumorzellen im hepatozellulären Karzinom beiträgt (Eggert et al. 2016).

4.4 Verschiedene Mechanismen der parakrinen Seneszenzinduktion

Bei der Behandlung naiver SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen mit den verschiedenen KM, welche die SASPs beinhalten, wurde beobachtet, dass die SASPs sowohl nach Zytokin- als auch nach Palbociclib-Behandlung Seneszenzmarker induzierten, während der SASP nach Doxorubicin-Behandlung keinen vergleichbaren Effekt hatte (**Abbildung 15** und **Abbildung 16**). Es war unerwartet, dass Doxorubicin und Palbociclib trotz eines sehr ähnlichen SASPs (**Abbildung 13**) so unterschiedliche Wirkung hatten. Dies liegt möglicherweise an in dieser Arbeit nicht untersuchten Faktoren, die infolge einer Behandlung mit Zytokinen und Palbociclib, aber nicht nach einer Doxorubicin-Behandlung freigesetzt wurden. Wie bereits im **Abschnitt 4.2** beschrieben, können Melanomzellen während der Behandlung Palbociclib lysosomal speichern und anschließend in Vesikeln an ihre Umgebung freisetzen. Über diesen Mechanismus lässt sich sowohl die Seneszenzinduktion in Abwesenheit von p21 (**Abbildung 6**) als auch die parakrine Seneszenzinduktion nach Wegnahme von Palbociclib erklären. Somit können seneszente Melanomzellen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung über verschiedene Mechanismen parakrin Seneszenz in benachbarten Melanomzellen induzieren.

4.5 Therapeutische und wissenschaftliche Ausblicke

Die Induktion von Seneszenz durch IFN- γ und TNF könnte über die SASP-vermittelte Seneszenzinduktion zu einer verbesserten Tumorkontrolle durch das Immunsystem führen. Nachdem NK-Zellen seneszente Zellen beseitigen, produzieren sie die Zytokine IFN- γ und TNF, wodurch Makrophagen angelockt und aktiviert werden (Antonangeli et al. 2019; Soriani et al. 2014; Wang et al. 2012). Diese Zytokinsekretion könnte ebenfalls zu einer parakrinen Seneszenzinduktion führen. Sollten seneszente Zellen allerdings nicht zeitig abgeräumt und die proinflammatorischen Faktoren (der SASP) dadurch kontinuierlich über einen langen Zeitraum freigesetzt werden, könnte der SASP das Tumorwachstum und die Entwicklung degenerativer Erkrankungen fördern (Campisi 2013). Eine rechtzeitige Immunabwehr von SASP-produzierenden seneszenten Tumorzellen stoppt jedoch die Freisetzung proinflammatorischer Faktoren (Antonangeli et al. 2019). Durch diesen Mechanismus verschiebt das Immunsystem das Gleichgewicht zugunsten der positiven Auswirkungen des entzündlichen Milieus (Campisi 2013). Aber nicht nur Immunzellen, sondern auch Senolytika wie B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2)-Inhibitoren können selektiv seneszente Zellen eliminieren und so den potenziell protumoral wirkenden SASP abschwächen (Omer et al. 2020; Zhu et al. 2015). Ein therapeutischer „one-two punch“, bei dem Tumorpatienten zunächst mit Seneszenz-induzierenden und anschließend mit senolytischen Medikamenten behandelt werden, könnte die Tumorthherapie positiv beeinflussen und gleichzeitig die durch Langzeitfreisetzung von SASP-Faktoren verursachten Nebenwirkungen abmildern (Cuollo et al. 2020; Demaria et al. 2017; Prasanna et al. 2021). In Anbetracht der unterschiedlichen und teilweise gegensätzlichen Effekte der diskutierten Zytokine und Chemokine auf das TME sind weitere Studien *in vivo* erforderlich, um festzustellen, ob die Tumormunkontrolle durch die starke Sekretion der proinflammatorischen SASP-Faktoren im Kontext der ZIS vermittelt wird.

5 Zusammenfassung

Die ICB hat die Therapie des metastasierten malignen Melanoms revolutioniert und zeichnet sich durch vergleichsweise hohe Ansprechraten aus. Notwendig für das Ansprechen auf die ICB ist, dass zentrale Signalwege der Zellzyklusregulation durch schwere Mutationen nicht so sehr beeinträchtigt sind, dass in den Tumorzellen die Seneszenz nicht mehr induziert werden kann. In diesem Kontext wird die Seneszenz durch die T_H1-Zell-Zytokine IFN- γ und TNF ausgelöst und als ZIS bezeichnet. Bei Nichtansprechen auf die ICB können beim metastasierten malignen Melanom auch Zellzyklusinhibitoren oder Zytostatika eingesetzt werden, wobei Letztere dem Patienten nur bei Versagen jeder höherwertigen Therapie als Option angeboten werden sollten. Auch durch diese Therapeutika kann Seneszenz im Melanom induziert werden, welche als TIS bezeichnet wird. Die Seneszenz wird häufig als Stressreaktionsprogramm einer Zelle bezeichnet und ist durch einige Merkmale definiert, bspw. Wachstumsarrest, SA- β -Gal-Aktivität, Hochregulation von Zellzyklusregulatoren wie p16 oder p21, modifizierte Genexpression, morphologische Veränderungen und makromolekularen Schaden. Die Effekte von seneszenten Zellen auf ihre Umgebung können je nach Umgebung sehr variabel und sogar gegensätzlich sein; vermittelt werden diese Effekte durch die Sekretion zahlreicher v.a. proinflammatorischer Faktoren, welche als SASP zusammengefasst werden. Dabei ist der SASP enorm kontextabhängig. Über den SASP von Melanomzellen im Kontext der ZIS und TIS ist wenig bekannt. Dabei könnten Erkenntnisse über die Zusammensetzung und die Effekte des SASPs in diesem Bereich entscheidende Hinweise dafür liefern, wieso das Melanom so gut auf die ICB anspricht, und warum die Seneszenzinduktion eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Ansprechen dieser Therapie ist.

In dieser Arbeit wurden die beiden Melanomzelllinien SK-MEL-28 und WM115 mit den Zytokinen IFN- γ und TNF, dem Zytostatikum Doxorubicin und dem Zellzyklusinhibitor Palbociclib für jeweils 96 h behandelt. Zum Zeitpunkt nach Behandlungsende (96 h) wurde für einige Versuche ein Mediumwechsel durchgeführt, dem entsprechende Analysen 48 h später folgten. Um die Seneszenzinduktion zu verifizieren und zu charakterisieren, wurden zunächst

die SA- β -Gal-Aktivität, der Wachstumsarrest, die LDH-Freisetzung, die Regulation von p16, p21, p27 und p53 sowie der Zellzyklusarrest untersucht. Dabei stellte sich färberisch in allen Behandlungsgruppen eine gesteigerte Aktivität der SA- β -Gal gegenüber der Kontrollgruppe dar. Weiterhin erzielte jede Behandlung einen Wachstums- sowie Zellzyklusarrest. Letzterer wurde mittels 7-AAD-BrdU-APC-FACS untersucht. Analysen mittels Western Blot zeigten, dass dieser Wachstumsarrest nach Zytokin- und Doxorubicin-Behandlung durch Hochregulation von p21 vermittelt wurde; die Wachstums-arretierten, Palbociclib-behandelten Melanomzellen zeigten keine stabile Hochregulation von einem der untersuchten Zellzyklusregulatoren. Für die anschließende Charakterisierung des SASPs wurden Analysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Die Untersuchungen von über 80 Zytokinen und Chemokinen mit qPCR- und Proteome Profiler-Arrays zeigten bei der ZIS eine Hochregulation zahlreicher proinflammatorischer Faktoren, welche bei der TIS deutlich geringer ausfiel. Die Sekretion einzelner Faktoren (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12) wurde mittels ELISA exakt quantifiziert: Nur bei ZIS wurden IL-1 β , IL-6 und IL-8 von beiden Zelllinien stärker freigesetzt im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. IL-12 wurde überhaupt nicht freigesetzt. In einem abschließenden funktionellen Experiment wurden die Effekte der freigesetzten Faktoren auf naive Melanomzellen untersucht, indem SK-MEL-28- und WM115-Melanomzellen 96 h mit den verschiedenen SASPs behandelt wurden, bevor die SA- β -Gal-Aktivität färberisch dargestellt wurde. Die Behandlung mit den SASPs nach Behandlung mit IFN- γ und TNF sowie Palbociclib bewirkte über unterschiedliche Mechanismen eine Seneszenzinduktion, während der SASP nach Behandlung mit Doxorubicin keinen solchen Effekt hatte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es therapeutisch von Vorteil sein könnte, im Rahmen eines „one-two punch“ Therapieversuchs, Tumorpatienten zunächst mit Seneszenz-induzierenden und anschließend mit senolytischen Medikamenten zu behandeln. Dadurch könnte man die Vorteile des SASPs ausnutzen, welche tendenziell eher bei vorübergehendem Vorhandensein eines entzündlichen Milieus überwiegen, und die schädlichen Nebenwirkungen einer länger andauernden Sekretion proinflammatorischer Faktoren vermeiden.

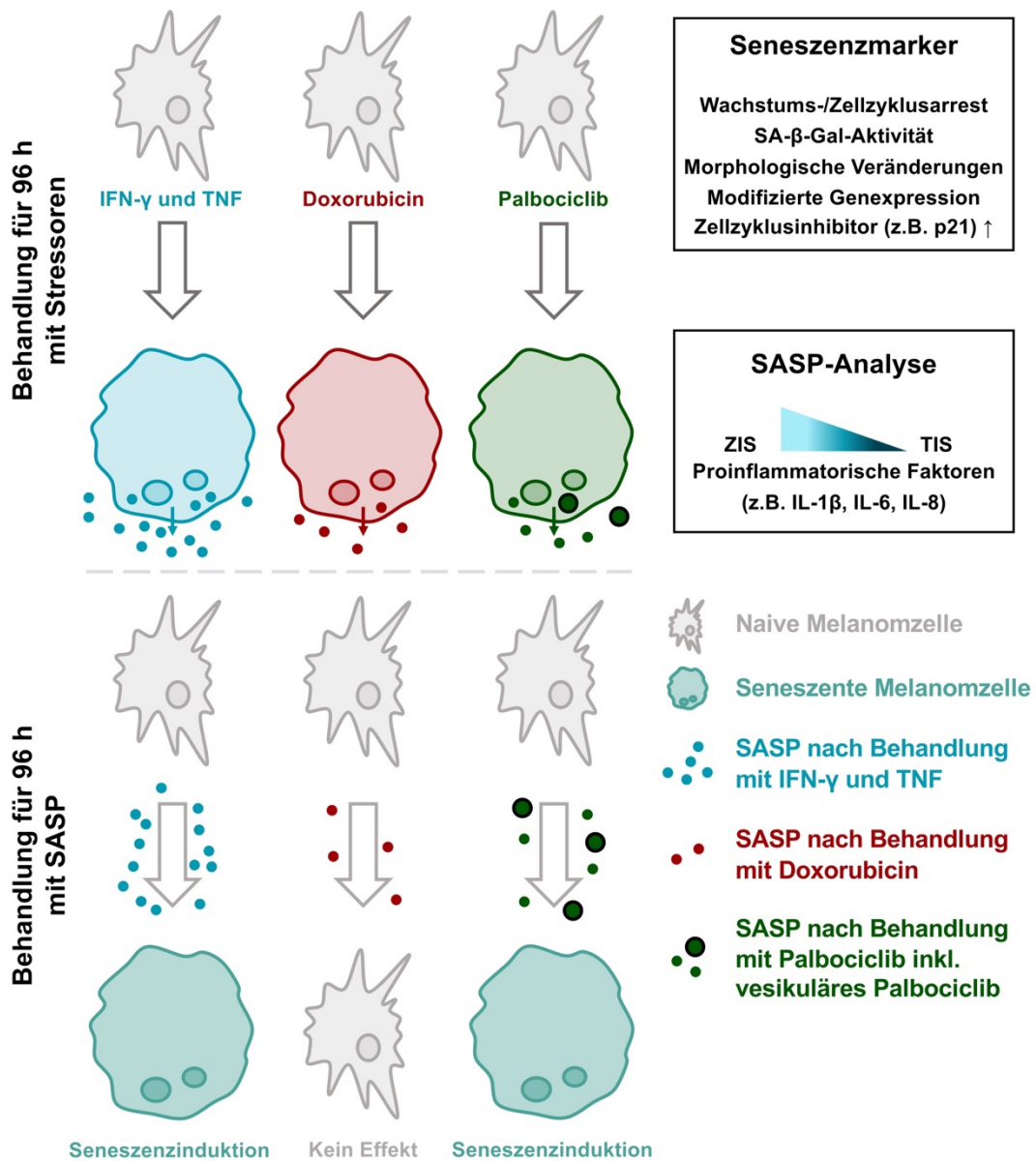


Abbildung 17: Grafische schematische Zusammenfassung der Seneszenzinduktion im Melanom mit den Zytokinen IFN-γ und TNF, Doxorubicin und Palbociclib sowie der Effekte der SASP-Behandlung.

6 Literaturverzeichnis

- Aliwaini, S., A. M. Awadallah, R. Y. Morjan, M. Ghunaim, H. Alqaddi, A. Y. Abuhamad, E. A. Awadallah, and Y. M. Abughefra. 2019. Novel imidazo[1,2-a]pyridine inhibits AKT/mTOR pathway and induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma and cervical cancer cells. *Oncol Lett* 18 (1):830-837.
- Allison, J. P., and M. F. Krummel. 1995. The Yin and Yang of T cell costimulation. *Science* 270 (5238):932-933.
- Antonangeli, F., A. Zingoni, A. Soriani, and A. Santoni. 2019. Senescent cells: Living or dying is a matter of NK cells. *J Leukoc Biol* 105 (6):1275-1283.
- Arnold, M., D. Singh, M. Laversanne, J. Vignat, S. Vaccarella, F. Meheus, A. E. Cust, E. de Vries, D. C. Whiteman, and F. Bray. 2022. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* 158 (5):495-503.
- Bauer, B., A. L. Göderz, H. Braumüller, J. M. Neudörfl, M. Röcken, T. Wieder, and H. G. Schmalz. 2017. Methyl Fumarate-Derived Iron Carbonyl Complexes (FumET-CORMs) as Powerful Anti-inflammatory Agents. *ChemMedChem* 12 (23):1927-1930.
- Bayer, A. L., J. Pietruska, J. Farrell, S. McRee, P. Alcaide, and P. W. Hinds. 2022. AKT1 Is Required for a Complete Palbociclib-Induced Senescence Phenotype in BRAF-V600E-Driven Human Melanoma. *Cancers (Basel)* 14 (3).
- Bi, H., J. Shang, X. Zou, J. Xu, and Y. Han. 2021. Palbociclib induces cell senescence and apoptosis of gastric cancer cells by inhibiting the Notch pathway. *Oncol Lett* 22 (2):603.
- Birch, J., and J. Gil. 2020. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* 34 (23-24):1565-1576.
- Bonilla, F. A., and H. C. Oettgen. 2010. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2):S33-40.
- Braumüller, H., T. Wieder, E. Brenner, S. Assmann, M. Hahn, M. Alkhaled, K. Schilbach, F. Essmann, M. Kneilling, C. Griessinger, F. Ranta, S. Ullrich, R. Mocikat, K. Braungart, T. Mehra, B. Fehrenbacher, J. Berdel, H. Niessner, F. Meier, M. van den Broek, H. U. Haring, R. Handgretinger, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend, M. Pesic, J. Bauer, L. Zender, M. Schaller, K. Schulze-Osthoff, and M. Rocken. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494 (7437):361-365.
- Brenner, E., and M. Röcken. 2022. A Commotion in the Skin: Developing Melanoma Immunotherapies. *J Invest Dermatol*.
- Brenner, E., B. F. Schorg, F. Ahmetlic, T. Wieder, F. J. Hilke, N. Simon, C. Schroeder, G. Demidov, T. Riedel, B. Fehrenbacher, M. Schaller, A. Forschner, T. Eigentler, H. Niessner, T. Sinnberg, K. S. Bohm, N. Homberg, H. Braumüller, D. Dauch, S. Zwirner, L. Zender, D. Sonanini, A. Geishauser, J. Bauer, M. Eichner, K. J. Jarick, A. Beilhack, S. Biskup, D. Docker, D. Schadendorf, L. Quintanilla-Martinez, B. J. Pichler, M. Kneilling, R. Mocikat, and M. Rocken. 2020. Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours. *Nat Commun* 11 (1):1335.

- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 (5663):1532-1535.
- Campisi, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75:685-705.
- Carey, T. E., T. Takahashi, L. A. Resnick, H. F. Oettgen, and L. J. Old. 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (9):3278-3282.
- Castellano, M., P. M. Pollock, M. K. Walters, L. E. Sparrow, L. M. Down, B. G. Gabrielli, P. G. Parsons, and N. K. Hayward. 1997. CDKN2A/p16 is inactivated in most melanoma cell lines. *Cancer Res* 57 (21):4868-4875.
- Chu, I. M., L. Hengst, and J. M. Slingerland. 2008. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8 (4):253-267.
- Ciołczyk-Wierzbicka, D., D. Gil, and P. Laidler. 2012. The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. *Curr Med Chem* 19 (1):145-151.
- Coppé, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5:99-118.
- Coppé, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Muñoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez, and J. Campisi. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6 (12):2853-2868.
- Cudejko, C., K. Wouters, L. Fuentes, S. A. Hannou, C. Paquet, K. Bantubungi, E. Bouchaert, J. Vanhoutte, S. Fleury, P. Remy, A. Tailleux, G. Chinetti-Gbaguidi, D. Dombrowicz, B. Staels, and R. Paumelle. 2011. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* 118 (9):2556-2566.
- Cuollo, L., F. Antonangeli, A. Santoni, and A. Soriani. 2020. The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology (Basel)* 9 (12).
- Demaria, M., M. N. O'Leary, J. Chang, L. Shao, S. Liu, F. Alimirah, K. Koenig, C. Le, N. Mitin, A. M. Deal, S. Alston, E. C. Academia, S. Kilmarx, A. Valdovinos, B. Wang, A. de Bruin, B. K. Kennedy, S. Melov, D. Zhou, N. E. Sharpless, H. Muss, and J. Campisi. 2017. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* 7 (2):165-176.
- Eggert, T., K. Wolter, J. Ji, C. Ma, T. Yevsa, S. Klotz, J. Medina-Echeverz, T. Longerich, M. Forgues, F. Reisinger, M. Heikenwalder, X. W. Wang, L. Zender, and T. F. Greten. 2016. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* 30 (4):533-547.
- Eigentler, T. K., U. M. Caroli, P. Radny, and C. Garbe. 2003. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 4 (12):748-759.

- Elmore, L. W., C. W. Rehder, X. Di, P. A. McChesney, C. K. Jackson-Cook, D. A. Gewirtz, and S. E. Holt. 2002. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* 277 (38):35509-35515.
- Engeland, K. 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*.
- Ewald, J. A., J. A. Desotelle, G. Wilding, and D. F. Jarrard. 2010. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 102 (20):1536-1546.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192 (7):1027-1034.
- Friedrich, K., T. Wieder, C. Von Haefen, S. Radetzki, R. Jänicke, K. Schulze-Osthoff, B. Dörken, and P. T. Daniel. 2001. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 20 (22):2749-2760.
- Fulda, S., A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010:214074.
- Funck, F., J. Pahl, L. Kyjacova, L. Freund, S. Oehrl, G. Grabe, S. Pezer, J. C. Hassel, J. Sleeman, A. Cerwenka, and K. Schakel. 2020. Human innate immune cell crosstalk induces melanoma cell senescence. *Oncoimmunology* 9 (1):1808424.
- Galanos, P., K. Vougas, D. Walter, A. Polyzos, A. Maya-Mendoza, E. J. Haagenen, A. Kokkalis, F. M. Roumelioti, S. Gagos, M. Tzetis, B. Canovas, A. Igea, A. K. Ahuja, R. Zellweger, S. Havaki, E. Kanavakis, D. Kletsas, I. B. Roninson, S. D. Garbis, M. Lopes, A. Nebreda, D. Thanos, J. J. Blow, P. Townsend, C. S. Sørensen, J. Bartek, and V. G. Gorgoulis. 2016. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat Cell Biol* 18 (7):777-789.
- Gorgoulis, V., P. D. Adams, A. Alimonti, D. C. Bennett, O. Bischof, C. Bishop, J. Campisi, M. Collado, K. Evangelou, G. Ferbeyre, J. Gil, E. Hara, V. Krizhanovsky, D. Jurk, A. B. Maier, M. Narita, L. Niedernhofer, J. F. Passos, P. D. Robbins, C. A. Schmitt, J. Sedivy, K. Vougas, T. von Zglinicki, D. Zhou, M. Serrano, and M. Demaria. 2019. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179 (4):813-827.
- Guy, G. P., Jr., C. C. Thomas, T. Thompson, M. Watson, G. M. Massetti, and L. C. Richardson. 2015. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64 (21):591-596.
- Haferkamp, S., A. Borst, C. Adam, T. M. Becker, S. Motschenbacher, S. Windhövel, A. L. Hufnagel, R. Houben, and S. Meierjohann. 2013. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol* 133 (6):1601-1609.
- Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2014. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 26 (3):253-266.

- Hayflick, L., and P. S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Herlyn, M., G. Balaban, J. Bannicelli, D. t. Guerry, R. Halaban, D. Herlyn, D. E. Elder, G. G. Maul, Z. Stepkowski, P. C. Nowell, and et al. 1985. Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst* 74 (2):283-289.
- Homann, L., M. Rentschler, E. Brenner, K. Böhm, M. Röcken, and T. Wieder. 2022. IFN- γ and TNF Induce Senescence and a Distinct Senescence-Associated Secretory Phenotype in Melanoma. *Cells* 11 (9).
- Hoyer, K. K., H. Doms, L. Barron, and A. K. Abbas. 2008. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226:19-28.
- Huang, P., L. Bai, L. Liu, J. Fu, K. Wu, H. Liu, Y. Liu, B. Qi, and B. Qi. 2021. Redd1 knockdown prevents doxorubicin-induced cardiac senescence. *Aging (Albany NY)* 13 (10):13788-13806.
- Hubackova, S., K. Krejčíková, J. Bartek, and Z. Hodny. 2012. IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* 4 (12):932-951.
- Hwang, H. J., Y. R. Lee, D. Kang, H. C. Lee, H. R. Seo, J. K. Ryu, Y. N. Kim, Y. G. Ko, H. J. Park, and J. S. Lee. 2020. Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells. *Cancer Lett* 490:100-110.
- Jacobson, N. G., S. J. Szabo, R. M. Weber-Nordt, Z. Zhong, R. D. Schreiber, J. E. Darnell, Jr., and K. M. Murphy. 1995. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 181 (5):1755-1762.
- Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13.
- Jost, T., L. Heinzerling, R. Fietkau, M. Hecht, and L. V. Distel. 2021. Palbociclib Induces Senescence in Melanoma and Breast Cancer Cells and Leads to Additive Growth Arrest in Combination With Irradiation. *Front Oncol* 11:740002.
- Jun, J. I., and L. F. Lau. 2010. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* 12 (7):676-685.
- Kang, T. W., T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479 (7374):547-551.
- Kirkland, J. L., and T. Tchkonja. 2020. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med* 288 (5):518-536.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.

- Larkin, J., V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez, J. J. Grob, P. Rutkowski, C. D. Lao, C. L. Cowey, D. Schadendorf, J. Wagstaff, R. Dummer, P. F. Ferrucci, M. Smylie, D. Hogg, A. Hill, I. Márquez-Rodas, J. Haanen, M. Guidoboni, M. Maio, P. Schöffski, M. S. Carlino, C. Lebbé, G. McArthur, P. A. Ascierto, G. A. Daniels, G. V. Long, L. Bastholt, J. I. Rizzo, A. Balogh, A. Moshyk, F. S. Hodi, and J. D. Wolchok. 2019. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 381 (16):1535-1546.
- Lázár-Molnár, E., H. Hegyesi, S. Tóth, and A. Falus. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12 (6):547-554.
- Leach, D. R., M. F. Krummel, and J. P. Allison. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271 (5256):1734-1736.
- Lee, J. J., I. H. Park, W. J. Rhee, H. S. Kim, and J. S. Shin. 2019. HMGB1 modulates the balance between senescence and apoptosis in response to genotoxic stress. *FASEB J* 33 (10):10942-10953.
- Lee, S., and C. A. Schmitt. 2019. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* 21 (1):94-101.
- Leonardi, G. C., S. Candido, L. Falzone, D. A. Spandidos, and M. Libra. 2020. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *Int J Oncol* 57 (3):609-618.
- Leontieva, O. V., and M. V. Blagosklonny. 2013. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. *Cell Cycle* 12 (18):3063-3069.
- Leung, S., X. Liu, L. Fang, X. Chen, T. Guo, and J. Zhang. 2010. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 7 (3):182-189.
- Liu, R. M. 2022. Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23 (4).
- Llanos, S., D. Megias, C. Blanco-Aparicio, E. Hernández-Encinas, M. Rovira, F. Pietrocola, and M. Serrano. 2019. Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications. *Oncogene* 38 (20):3886-3902.
- Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein, and T. Jacks. 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9 (8):935-944.
- Maraskovsky, E., W. F. Chen, and K. Shortman. 1989. IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *J Immunol* 143 (4):1210-1214.
- Mikuła-Pietrasik, J., A. Niklas, P. Uruski, A. Tykarski, and K. Książek. 2020. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 77 (2):213-229.
- Müller-Hermelink, N., H. Braumüller, B. Pichler, T. Wieder, R. Mailhammer, K. Schaak, K. Ghoreschi, A. Yazdi, R. Haubner, C. A. Sander, R. Mocikat, M. Schwaiger, I. Förster, R. Huss, W. A. Weber, M. Kneilling, and M. Röcken. 2008. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine

- whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* 13 (6):507-518.
- Nicolae, C. M., M. J. O'Connor, D. Constantin, and G. L. Moldovan. 2018. NFκB regulates p21 expression and controls DNA damage-induced leukemic differentiation. *Oncogene* 37 (27):3647-3656.
- Nik Nabil, W. N., Z. Xi, Z. Song, L. Jin, X. D. Zhang, H. Zhou, P. De Souza, Q. Dong, and H. Xu. 2021. Towards a Framework for Better Understanding of Quiescent Cancer Cells. *Cells* 10 (3).
- Okazaki, T., Y. Iwai, and T. Honjo. 2002. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* 14 (6):779-782.
- Omer, A., M. C. Barrera, J. L. Moran, X. J. Lian, S. Di Marco, C. Beausejour, and I. E. Gallouzi. 2020. G3BP1 controls the senescence-associated secretome and its impact on cancer progression. *Nat Commun* 11 (1):4979.
- Orme, I. M., A. D. Roberts, J. P. Griffin, and J. S. Abrams. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 151 (1):518-525.
- Ortiz-Montero, P., A. Londono-Vallejo, and J. P. Vernot. 2017. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal* 15 (1):17.
- Ou, H. L., R. Hoffmann, C. González-López, G. J. Doherty, J. E. Korkola, and D. Muñoz-Espín. 2021. Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. *Mol Oncol* 15 (10):2634-2671.
- Patras, L., A. E. Ionescu, C. Munteanu, R. Hajdu, A. Kosa, A. Porfire, E. Licarete, V. F. Rauca, A. Sesarman, L. Luput, P. Bulzu, P. Chiroi, R. A. Tranca, M. S. Meszaros, G. Negrea, L. Barbu-Tudoran, M. Potara, S. Szedlacsek, and M. Banciu. 2022. Trojan horse treatment based on PEG-coated extracellular vesicles to deliver doxorubicin to melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 23 (1):1-16.
- Pennycook, B. R., and A. R. Barr. 2021. Palbociclib-mediated cell cycle arrest can occur in the absence of the CDK inhibitors p21 and p27. *Open Biol* 11 (11):210125.
- Pezzella, K. M., M. E. Neville, and J. J. Huang. 1990. In vivo inhibition of tumor growth of B16 melanoma by recombinant interleukin 1 beta. I. Tumor inhibition parallels lymphocyte-activating factor activity of interleukin 1 beta proteins. *Cytokine* 2 (5):357-362.
- Prasanna, P. G., D. E. Citrin, J. Hildesheim, M. M. Ahmed, S. Venkatachalam, G. Riscuta, D. Xi, G. Zheng, J. V. Deursen, J. Goronzy, S. J. Kron, M. S. Anscher, N. E. Sharpless, J. Campisi, S. L. Brown, L. J. Niedernhofer, A. O'Loughlen, A. G. Georgakilas, F. Paris, D. Gius, D. A. Gewirtz, C. A. Schmitt, M. E. Abazeed, J. L. Kirkland, A. Richmond, P. B. Romesser, S. W. Lowe, J. Gil, M. S. Mendonca, S. Burma, D. Zhou, and C. N. Coleman. 2021. Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 113 (10):1285-1298.
- Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rötzschke. 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 5 (1):35-44.

- Rastrelli, M., S. Tropea, C. R. Rossi, and M. Alaibac. 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28 (6):1005-1011.
- Rentschler, M., H. Braumüller, P. S. Briquez, and T. Wieder. 2022. Cytokine-Induced Senescence in the Tumor Microenvironment and Its Effects on Anti-Tumor Immune Responses. *Cancers* 14 (6):1364.
- Rentschler, M., Y. Chen, J. Pahl, L. Soria-Martinez, H. Braumüller, E. Brenner, O. Bischof, M. Rocken, and T. Wieder. 2018. Nuclear Translocation of Argonaute 2 in Cytokine-Induced Senescence. *Cell Physiol Biochem* 51 (3):1103-1118.
- Rizzolio, S., S. Corso, S. Giordano, and L. Tamagnone. 2020. Autocrine Signaling of NRP1 Ligand Galectin-1 Elicits Resistance to BRAF-Targeted Therapy in Melanoma Cells. *Cancers (Basel)* 12 (8).
- Sagiv, A., and V. Krizhanovsky. 2013. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* 14 (6):617-628.
- Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta. 2012. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* 24 (4):835-845.
- Salminen, A., J. Ojala, K. Kaarniranta, A. Haapasalo, M. Hiltunen, and H. Soininen. 2011. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci* 34 (1):3-11.
- Sanmamed, M. F., J. L. Perez-Gracia, K. A. Schalper, J. P. Fusco, A. Gonzalez, M. E. Rodriguez-Ruiz, C. Oñate, G. Perez, C. Alfaro, S. Martín-Algarra, M. P. Andueza, A. Gurrpide, M. Morgado, J. Wang, A. Bacchicocchi, R. Halaban, H. Kluger, L. Chen, M. Sznol, and I. Melero. 2017. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 28 (8):1988-1995.
- Santoro, A., C. C. Spinelli, S. Martucciello, S. L. Nori, M. Capunzo, A. A. Puca, and E. Ciaglia. 2018. Innate immunity and cellular senescence: The good and the bad in the developmental and aged brain. *J Leukoc Biol* 103 (3):509-524.
- Scheuerpflug, A., F. Ahmetlić, V. Bauer, T. Riedel, M. Röcken, and R. Mocikat. 2021. The role of dendritic cells for therapy of B-cell lymphoma with immune checkpoint inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 70 (5):1343-1350.
- Shoshan, E., R. R. Braeuer, T. Kamiya, A. K. Mobley, L. Huang, M. E. Vasquez, G. Velazquez-Torres, N. Chakravarti, C. Ivan, V. Prieto, G. J. Villares, and M. Bar-Eli. 2016. NFAT1 Directly Regulates IL8 and MMP3 to Promote Melanoma Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res* 76 (11):3145-3155.
- Shurin, M. R., G. V. Shurin, A. Lokshin, Z. R. Yurkovetsky, D. W. Gutkin, G. Chatta, H. Zhong, B. Han, and R. L. Ferris. 2006. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev* 25 (3):333-356.

- Sobhani, N., A. D'Angelo, M. Pittacolo, G. Roviello, A. Miccoli, S. P. Corona, O. Bernocchi, D. Generali, and T. Otto. 2019. Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer. *Cells* 8 (4).
- Soriani, A., M. L. Iannitto, B. Ricci, C. Fionda, G. Malgarini, S. Morrone, G. Peruzzi, M. R. Ricciardi, M. T. Petrucci, M. Cippitelli, and A. Santoni. 2014. Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *J Immunol* 193 (2):950-960.
- Sultana, R., F. Di Domenico, M. Tseng, J. Cai, T. Noel, R. L. Chelvarajan, W. D. Pierce, C. Cini, S. Bondada, D. K. St Clair, and D. A. Butterfield. 2010. Doxorubicin-induced thymus senescence. *J Proteome Res* 9 (12):6232-6241.
- Sun, X., B. Shi, H. Zheng, L. Min, J. Yang, X. Li, X. Liao, W. Huang, M. Zhang, S. Xu, Z. Zhu, H. Cui, and X. Liu. 2018. Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway. *Cell Death Dis* 9 (3):260.
- Suzuki, K., I. Mori, Y. Nakayama, M. Miyakoda, S. Kodama, and M. Watanabe. 2001. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res* 155 (1 Pt 2):248-253.
- Takaoka, M., H. Harada, T. B. Deramandt, K. Oyama, C. D. Andl, C. N. Johnstone, B. Rhoades, G. H. Enders, O. G. Opitz, and H. Nakagawa. 2004. Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction. *Oncogene* 23 (40):6760-6768.
- Tang, B., X. Sheng, Y. Kong, Z. Chi, L. Si, C. Cui, X. Yan, L. Mao, B. Lian, S. Li, X. Wang, J. Dai, X. Bai, L. Zhou, and J. Guo. 2018. Palbociclib for treatment of metastatic melanoma with copy number variations of CDK4 pathway: case report. *Chin Clin Oncol* 7 (6):62.
- Tchkonia, T., Y. Zhu, J. van Deursen, J. Campisi, and J. L. Kirkland. 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123 (3):966-972.
- Topalian, S. L., F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G. D. Kollia, A. Gupta, J. M. Wigginton, and M. Sznol. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366 (26):2443-2454.
- Tucci, M., S. Stucci, A. Passarelli, G. Giudice, F. Dammacco, and F. Silvestris. 2014. The immune escape in melanoma: role of the impaired dendritic cell function. *Expert Rev Clin Immunol* 10 (10):1395-1404.
- van Vliet, T., M. Varela-Eirin, B. Wang, M. Borghesan, S. M. Brandenburg, R. Franzin, K. Evangelou, M. Seelen, V. Gorgoulis, and M. Demaria. 2021. Physiological hypoxia restrains the senescence-associated secretory phenotype via AMPK-mediated mTOR suppression. *Mol Cell* 81 (9):2041-2052.e2046.

- Victorelli, S., and J. F. Passos. 2017. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* 21:14-20.
- Wang, R., J. J. Jaw, N. C. Stutzman, Z. Zou, and P. D. Sun. 2012. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91 (2):299-309.
- Wang, T., and C. He. 2020. TNF- α and IL-6: The Link between Immune and Bone System. *Curr Drug Targets* 21 (3):213-227.
- Welsh, R. M., Jr. 1978. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J Exp Med* 148 (1):163-181.
- Wieder, T., E. Brenner, H. Braumüller, O. Bischof, and M. Röcken. 2017. Cytokine-induced senescence for cancer surveillance. *Cancer Metastasis Rev* 36 (2):357-365.
- Wieder, T., T. Eigentler, E. Brenner, and M. Röcken. 2018. Immune checkpoint blockade therapy. *J Allergy Clin Immunol* 142 (5):1403-1414.
- Wieder, T., C. E. Orfanos, and C. C. Geilen. 1998. Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem* 273 (18):11025-11031.
- Williams, G. C. 1957. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11 (4):398-411.
- Young, R. J., K. Waldeck, C. Martin, J. H. Foo, D. P. Cameron, L. Kirby, H. Do, C. Mitchell, C. Cullinane, W. Liu, S. B. Fox, K. Dutton-Regester, N. K. Hayward, N. Jene, A. Dobrovic, R. B. Pearson, J. G. Christensen, S. Randolph, G. A. McArthur, and K. E. Sheppard. 2014. Loss of CDKN2A expression is a frequent event in primary invasive melanoma and correlates with sensitivity to the CDK4/6 inhibitor PD0332991 in melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 27 (4):590-600.
- Yu, J., H. Nagasu, T. Murakami, H. Hoang, L. Broderick, H. M. Hoffman, and T. Horng. 2014. Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (43):15514-15519.
- Zhang, P., Y. Kishimoto, I. Grammatikakis, K. Gottimukkala, R. G. Cutler, S. Zhang, K. Abdelmohsen, V. A. Bohr, J. Misra Sen, M. Gorospe, and M. P. Mattson. 2019. Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 22 (5):719-728.
- Zhu, Y., T. Tchkonja, T. Pirskhalava, A. C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A. K. Palmer, Y. Ikeno, G. B. Hubbard, M. Lenburg, S. P. O'Hara, N. F. LaRusso, J. D. Miller, C. M. Roos, G. C. Verzosa, N. K. LeBrasseur, J. D. Wren, J. N. Farr, S. Khosla, M. B. Stout, S. J. McGowan, H. Fuhrmann-Stroissnigg, A. U. Gurkar, J. Zhao, D. Colangelo, A. Dorransoro, Y. Y. Ling, A. S. Barghouthy, D. C. Navarro, T. Sano, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer, and J. L. Kirkland. 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14 (4):644-658.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der AG Tumorimmunologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas Wieder durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Maximilian Rentschler (wissenschaftlicher Mitarbeiter), Dr. Ellen Brenner (wissenschaftliche Mitarbeiterin), Dr. Katharina Böhm (wissenschaftliche Mitarbeiterin) und Prof. Dr. Martin Röcken (Laborleiter).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Maximilian Rentschler, Susanne Weidemann (medizinisch-technische Angestellte), Dr. Ellen Brenner und Dr. Katharina Böhm von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Maximilian Rentschler, Dr. Ellen Brenner und Prof. Dr. Wieder durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 29.03.2023

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Homann, L., M. Rentschler, E. Brenner, K. Böhm, M. Röcken, and T. Wieder. 2022. IFN- γ and TNF Induce Senescence and a Distinct Senescence-Associated Secretory Phenotype in Melanoma. *Cells* 11 (9).

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Wieder für die verständnisvolle, menschliche und kompetente Betreuung bedanken. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass Du mir geholfen hast, sämtliche Hürden bis zur Publikation und nun auch Disputation stets gewissenhaft, besonnen und zügig zu überwinden.

Auch dem Laborleiter und Ärztlichen Direktor der Hautklinik, Herrn Prof. Dr. Martin Röcken, gilt ein besonderer Dank. Ihre große Begeisterung und Ihr Pflichtgefühl für gute Wissenschaft und das Fach Dermatologie sind ansteckend und inspirierend. Ihr Engagement und Optimismus für dieses Projekt haben mich immer wieder Kraft und den richtigen Weg finden lassen.

Mit ganzem Herzen möchte ich meine große Wertschätzung für meine wundervollen Kollegen und Freunde zum Ausdruck bringen, die mich beispiellos fachlich und persönlich während einer sehr intensiven Zeit geleitet, unterstützt und immer im richtigen Maß gefordert haben. In meinem Studium hat mich nichts stärker wachsen lassen als euer immenser Einsatz, eure Geduld und eure Leidenschaft für gutes wissenschaftliches Arbeiten. Herzlichen Dank Dr. Maximilian Rentschler, Susanne Weidemann, Dr. Ellen Brenner, Lars Strohhahn, Dr. Katharina Böhm und Kirsten Deinert.

Liebe Marieke Böcker, Irene Gentzcke, Liv Jentzsch, Barbara Krolik, Franziska Staber und Nicolas Zang, ihr hattet immer ein offenes Ohr, kluge Ratschläge und warme Worte für mich, wofür ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Frau Guenon bedanken.

Zu guter Letzt gilt ein großes Dankeschön dem IZKF-Promotionskolleg, ohne dessen Unterstützung ich mich nicht vollumfänglich auf die Anfertigung dieser Dissertation hätte konzentrieren können.