

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen**

**Die Rolle p16INK4a-gesteuerter Signalwege in der  
Zytokin-induzierten Seneszenz**

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

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

**vorgelegt von**

**Hahn, Matthias Stefan**

**2018**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Wieder  
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

Tag der Disputation: 01.03.2018

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungen .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1 Das Immunsystem und Tumore .....	1
1.2 Immuntherapie von Tumoren .....	3
1.3 Interferone in der Immuntherapie .....	6
1.4 Das RIP1-Tag2 Mausmodell .....	7
1.5 Seneszenz .....	10
1.5.1 Die Merkmale seneszenten Zellen .....	10
1.5.2 Formen der Seneszenz .....	11
1.6 p16INK4a und der Rb/E2F-Signalweg .....	13
1.7 Fragestellung .....	16
2. Material und Methoden .....	18
2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Reagenzien .....	18
2.1.1 Geräte .....	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.1.3 Reagenzien und Kits .....	21
2.1.4 Rezepturen .....	24
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Tierhaltung .....	26
2.2.2 Genotypisierung der Mäuse .....	26
2.2.3 Tumorzellisolierung und Zellkultur .....	28
2.2.4 Tag-Th1- und APC-Gewinnung .....	29
2.2.5 Tag-Th1 Therapie .....	30
2.2.6 Zytokinbehandlung .....	31
2.2.7 Immunhistochemische Färbungen .....	31
2.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen .....	32
2.2.9 Proliferationsanalysen .....	33
2.2.10 Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	35

2.2.11	Western-Blot .....	36
2.2.12	Quantitative PCR .....	40
2.2.13	Lentiviraler p16INK4a-Knockdown .....	42
2.2.14	p16INK4a-Knockdown durch MSCV .....	43
2.3	Statistik.....	44
3.	Ergebnisse .....	45
3.1	Behandlung der RIP1-Tag2 Mäuse mit Tag-Th1 <i>in vivo</i> .....	46
3.1.1	Beeinflussung der Tumorzellproliferation .....	46
3.1.2	Induktion des Zellzyklusinhibitors p16INK4a <i>in vivo</i> .....	47
3.2	Untersuchung der Zytokinwirkung auf $\beta$ -Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	48
3.2.1	Charakterisierung der $\beta$ -Tumorzellen .....	48
3.2.2	Induktion des Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Galaktosidase.....	50
3.2.3	Regulation von p16INK4a <i>in vitro</i> unter Zytokinbehandlung.....	51
3.3	Funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Tumorzellproliferation .....	54
3.3.1	p16INK4a-Knockdown durch lentivirale Transfektion .....	54
3.3.2	p16INK4a-Knockdown durch Transfektion mit MSCV-Partikeln .....	56
3.4	Bedeutung des p16INK4a-Rb-E2F-Signalwegs in humanen Rhabdomyosarkom-Zellen.....	57
3.4.1	Wirkung der Th1 Zytokine auf die Seneszenzinduktion und Proliferation .....	57
3.4.2	RNA-Expression von p16INK4a in Rhabdomyosarkom-Zellen ...	59
4.	Diskussion.....	62
4.1	Proliferationshemmung durch Th1 Zellen und deren Zytokine .....	62
4.2	p16INK4a und Seneszenzinduktion durch die Zytokinbehandlung.....	65
4.3	Funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Zytokinbehandlung im RIP1-Tag2 Mausmodell .....	68
4.4	Mögliche Regulation von p16INK4a durch die Zytokinbehandlung ....	70
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Abbildungsverzeichnis .....	74
7.	Tabellenverzeichnis .....	75
8.	Literaturverzeichnis .....	76
9.	Erklärung zum Eigenanteil .....	96



10.	Veröffentlichung.....	97
11.	Danksagung .....	98

## Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BP	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Cis	Carcinoma in situ
Cox	Cyclooxygenase
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA Damage Response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum

G	Guanin
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray
h	Stunde
IFN	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
IFU	Infectious Units
IRF	Interferon Regulatory Factor
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MC	Mediumkontrolle
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MSCV	Mouse Stem Cell Virus
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Rb	Retinoblastom-Protein
RIP1	Ratteninsulinpromotor 1

---

RNA	Ribonukleinsäure
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
shRNA	Short Hairpin RNA
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription Protein
SV40	Simian-Virus 40
Syn	Synaptophysin
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
Tag	SV40 Large T-Antigen
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th2	T-Helferzelle Typ 2
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor $\alpha$
U/min	Umdrehungen pro Minute
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
V	Volt
VP	Viruspartikel

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem und Tumore

Tumorerkrankungen sind im Jahr 2015 mit 25% nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache und stellen ein großes sozioökonomisches Problem dar (Statistisches Bundesamt, 2017). Betroffene und ihre Angehörigen leiden meist sehr unter der Erkrankung und neue Tumortherapien werden zu einer finanziellen Herausforderung für das Gesundheitssystem. Ein wichtiger Faktor bei der Abwehr und Kontrolle von Tumorerkrankungen ist das Immunsystem. Bereits 1863 identifizierte Rudolf Virchow Leukozyten in Tumorgewebe und stellte damit erstmals ein Zusammenspiel zwischen Tumor und Immunsystem fest (Balkwill and Mantovani, 2001). William Coley nutzte bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts unbewusst die antitumorale Wirkung einer akuten Entzündungsreaktion, die er durch wiederholte Injektion von Bakterientoxinen auslöste (Coley, 1991). Diese Induktion einer akuten Entzündungsreaktion wird immer noch zur Therapie von Harnblasenkarzinomen genutzt, indem die Patienten mit Bacillus Calmette-Guerin behandelt werden (Herr and Morales, 2008).

Heute ist weit mehr über die Mechanismen des Zusammenspiels zwischen Immunsystem und Tumoren und dessen pro- und antitumoralen Effekte bekannt. Wie essentiell die korrekte Funktionsweise des Immunsystems ist, lässt sich beobachten, wenn das Immunsystem beeinträchtigt wird. So weisen Patienten, die nach einer Organtransplantation Ciclosporin A zur Immunsuppression erhalten, eine erhöhte Tumorzinzidenz auf (London et al., 1995). Ebenso können Tumorerkrankungen des Immunsystems wie die chronisch lymphatische Leukämie eine funktionelle Störung des Immunsystems bedingen und dadurch neben der vermehrten Entwicklung von Hauttumoren auch zu schwerwiegenderen Verläufen mit vermehrter Hauttumor-

Metastasierung führen (Otley, 2006). Neben organtransplantierten Patienten kommt es vor allem bei AIDS Patienten zu einer Beeinträchtigung des adaptiven Immunsystems. Entsprechend besteht auch bei diesen Patienten ein erhöhtes Tumorrisiko, beispielsweise für das mit humanem Herpes-Virus 8 assoziierte Kaposi-Sarkom oder für Plattenepithelkarzinome (Gallagher et al., 2001). Ohne die Fähigkeit des Immunsystems, maligne Zellen erkennen zu können und diese zu zerstören, würde es vermutlich zu einer deutlich größeren Anzahl an klinisch nachweisbaren Tumoren kommen.

Andererseits kann das Immunsystem auch die Tumorentstehung und das Fortschreiten einer Tumorerkrankung begünstigen. So sind chronische Entzündungen ein bekannter Risikofaktor für die Tumorentstehung. Mucosa-associated Lymphoid Tissue (MALT)-Lymphome können sich in Zusammenhang mit einer Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* entwickeln (Ferreri et al., 2009). Dabei kann im Frühstadium die alleinige Antibiotika-Therapie zur vollständigen Remission des Lymphoms führen (Wotherspoon et al., 1993). Ebenso begünstigen virale Hepatitiden durch die Unterhaltung einer chronischen Entzündung die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (Beasley et al., 1981). Neben diesen beiden Tumoren gibt es noch viele weitere Beispiele, wie die erhöhte Rate an Darmtumoren bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Cervix-Karzinomen nach einer Infektion mit humanen Papillomaviren (Triantafillidis et al., 2009, Brisson et al., 1994). Generell wird ein proinflammatorisches Milieu als wichtiger Bestandteil der Tumorentstehung angesehen (Coussens and Werb, 2002). Wird diese chronische Entzündungsreaktion beispielweise durch eine längerfristige Entzündungshemmung mittels Aspirin oder Cox-2-Hemmern unterdrückt, kann das Risiko der Tumorentstehung gesenkt werden (Dannenbergh and Subbaramaiah, 2003). Andererseits führt eine chronische Entzündung nicht zwingend zur vermehrten Tumorentstehung. So ist bei Psoriasis-Patienten oder bei Atopikern, die lebenslang an einer chronisch-

entzündlichen Erkrankung leiden, keine vermehrte Tumorentstehung beschrieben (Nickoloff et al., 2005).

Ebenso kann die Infiltration von Tumoren mit Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowohl Tumor-begünstigend als auch antitumoral sein. Die Infiltration mit Tumor-infiltrierenden Makrophagen und Mastzellen wird meist mit einer vermehrten Angiogenese und einer schlechteren Prognose verbunden ebenso wie eine T-Helfer (Th-)2 dominierte Immunreaktion (de Visser et al., 2006, Imada et al., 2000, Leek et al., 1996, Nakamura et al., 2002). Dagegen korreliert eine Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen oder Th1 Zellen bzw. das Auftreten funktionaler T-Zellen im Melanom oder beim kolorektalen Karzinom mit einem verbesserten Überleben (Galon et al., 2006, Clemente et al., 1996, Weide et al., 2012). Ob es durch die Immunreaktion zu einer pro- oder antitumoralen Wirkung kommt, hängt demnach von vielen Faktoren ab, wie etwa dem zeitlichen Verlauf oder der Art der Immunantwort. Zuletzt konnte durch eine Therapie mit dem cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein (CTLA)4-Antikörper Ipilimumab und den Programmed cell death protein (PD)1-Antikörpern Pembrolizumab bzw. Nivolumab eindrucksvoll gezeigt werden, welche Bedeutung dem Immunsystem bei der Tumorkontrolle zukommt und wie effektiv eine auf dem Immunsystem basierende Therapie eingesetzt werden kann (Topalian et al., 2014, Gettinger et al., 2015, Martin-Liberal et al., 2015, Robert et al., 2015).

## **1.2 Immuntherapie von Tumoren**

Zur Immuntherapie von Tumoren stehen heutzutage eine Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Verfügung, die bereits im klinischen Alltag angewendet werden. Dies umfasst zum einen Präventivmaßnahmen wie Impfungen gegen Hepatitis B (Chang, 2009) oder gegen humane Papillomaviren (Van Krieking et al., 2014), zielgerichtete Therapien mit Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Antigene oder Therapien mit Zytokinen

oder Antikörpern gegen CTLA4 und PD1, die sogenannten Immun-Checkpointinhibitoren, die die Funktion des Immunsystems beeinflussen.

Humorale Immuntherapien sind wahrscheinlich die am häufigsten eingesetzte Form der Immuntherapie. Antikörper können gezielt gegen eine breite Anzahl von Antigenen eingesetzt werden. Dadurch kann in für den Tumor wichtige Signalwege eingegriffen werden oder Tumorzellen können durch Oberflächenmarker direkt erkannt werden und deren Zerstörung ausgelöst werden. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist Rituximab, das gegen den B-Zell-Oberflächenmarker CD20 gerichtet ist und unter anderem zur Therapie von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen eingesetzt wird. Eine mit der Chemotherapie kombinierte Rituximab-Therapie kann das Überleben signifikant verlängern im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie und gilt heute als Standard-Therapie bei dieser Tumorentität (Coiffier et al., 2002). Ebenfalls seit längerem in Verwendung sind Antikörper, die sich gegen Rezeptoren der Epidermal-Growth-Factor-Familie richten. Einer dieser Antikörper ist Trastuzumab, das gegen Her2/neu gerichtet ist. Her2/neu wird in bis zu 30% der Mamma-Karzinome überexprimiert. Trastuzumab kann an diesen Rezeptor binden, dadurch die pro-proliferative Signalkaskade unterbrechen und das Überleben verlängern (Hudis, 2007). Vergleichbar hierzu wird Cetuximab, das gegen die extrazelluläre Domäne des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors gerichtet ist, zur Therapie von kolorektalen Karzinomen oder Plattenepithelkarzinomen eingesetzt (Meyerhardt and Mayer, 2005, Wollina, 2012). Darüber hinaus stehen eine Vielzahl weiterer Antikörper zur Verfügung, wie etwa Bevacizumab, das durch Blockade des Vaskular-Endothelial-Growth-Factors die vom Tumor benötigte Angiogenese blockiert (Cobleigh et al., 2003). Eine derzeit sehr erfolgversprechende Form der Immuntherapie ist die sogenannte Checkpoint-Blockade mit den Antikörpern Ipilimumab gegen CTLA4 und Nivolumab bzw. Pembrolizumab gegen PD1 insbesondere beim



Malignen Melanom, aber auch bei anderen Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Reck et al., 2016). CTLA4 und PD1 wirken durch die Hemmung der T-Zellaktivität protumoral (Pardoll, 2012). Eine Blockade beider Signalwege führt zu einer erhöhten T-Zell-Aktivität gegenüber Tumorzellen und geht mit einer deutlichen Verbesserung des Überlebens einher (Topalian et al., 2014, Hodi et al., 2010).

Neben Antikörpern können auch Zytokine zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden. Prominente Beispiele hierfür sind Interferon- $\alpha$  und Interleukin-2 (IL-2), die ebenfalls zur Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt werden (Atkins et al., 1999, Kirkwood et al., 1996).

Eine andere Möglichkeit der Immuntherapie stellt der adoptive Transfer von Tumor-reaktiven T-Zellen dar. Innerhalb von Tumoren wie dem Melanom lassen sich bereits häufig Tumorantigen-spezifische T-Zellen finden (Wu et al., 2012). Diese Tumor-infiltrierenden T-Zellen können isoliert, in Kultur expandiert und anschließend wieder an den Patienten verabreicht werden (Dudley et al., 2003). So konnte durch Transfusion von T-Zell-Rezeptor spezifischen T-Zellen gegen die Melanom-Antigene Mart-1, Melan-A oder gp100 bei Patienten mit metastasiertem Melanom eine Regression der Tumore erzielt werden (Lizee et al., 2013).

Der Effekt der Immuntherapie mittels adoptivem Transfer wird vor allem den zytotoxischen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugeschrieben, die die Tumorzellen erkennen und zerstören. Allerdings konnte auch wiederholt lediglich nur ein geringer Effekt dieser adoptiven Therapien beobachtet werden, was vermutlich an der Induktion einer T-Zell-Toleranz liegt (Willimsky and Blankenstein, 2005, Dudley et al., 2002). Wie man von Autoimmunerkrankungen her weiß, sind Interferon- $\gamma$  (IFN) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF) produzierende CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen deutlich aggressiver als zytotoxische T-Zellen (Racke et al., 1994). Entsprechend zeigen auch CD4<sup>+</sup> Th1 Zellen eine deutliche antitumorale Wirkung gegenüber Tumorzellen und können zur Eradikation von Melanomen beitragen (Shklovskaya et al., 2016, Hunder et al., 2008, Xie et al., 2010). Eine wesentliche Rolle für die antitumorale Funktion der Th1 Zellen scheint dabei

den Th1 Zytokinen IFN und TNF zuzukommen (Mumberg et al., 1999, Müller-Hermelink et al., 2008, Braumüller et al., 2013).

### **1.3 Interferone in der Immuntherapie**

Wie bereits oben beschrieben, haben Interferone eine wichtige Bedeutung bei der Kontrolle von Tumoren. So entwickeln Mäuse mit einem Defekt im IFN Rezeptor (*Ifngr<sup>-/-</sup>*) vermehrt spontane Tumoren und sind empfindlicher gegenüber karzinogeninduzierten Tumoren (Kaplan et al., 1998). Ebenso führt eine Hemmung von Typ I Interferonen (Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$ ) mittels Antikörpern zu einem vermehrten Tumorwachstum von transplantierten murinen Tumorzelllinien (Gresser et al., 1983). In vielen Tumoren wurde ferner eine verminderte Expression oder ein Verlust von Bestandteilen des Interferon-Signalwegs beobachtet, wie etwa STAT1 oder IRF9 im Melanom (Wong et al., 1997).

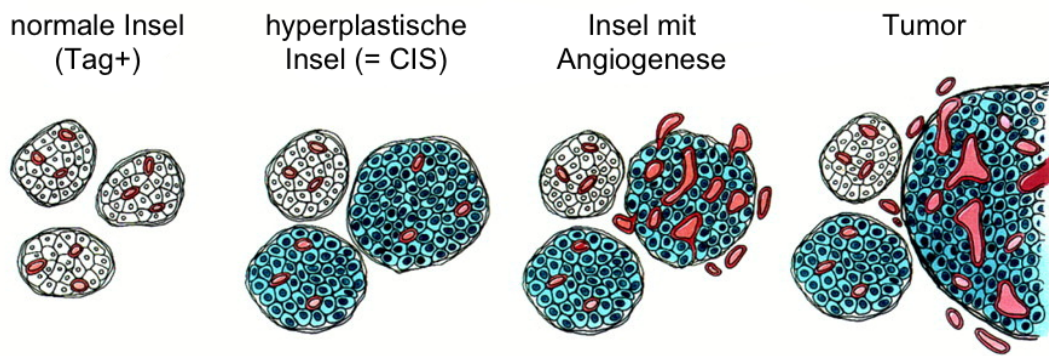
Weiterhin konnte in humanen Brustkrebs-Zelllinien durch Typ I Interferone ein direkter antiproliferativer Effekt mit der Verlängerung sämtlicher Zellzyklus-Phasen beobachtet werden (Balkwill et al., 1978). Auch in hämatologischen Progenitorzellen aus Patienten mit einer Polycythaemia vera kann durch Interferon- $\alpha$  eine Wachstumshemmung erzielt werden, die durch eine Aktivierung des p38 MAP-Kinase Signalwegs vermittelt wird (Lu et al., 2010). In einem murinen Brustkrebsmodell konnte eine vermehrte ossäre Metastasierung mit einer Suppression des Interferon-Signalings assoziiert werden. Durch eine systemische Behandlung mit Interferon- $\alpha$  kann dabei die ossäre Metastasierung vermindert werden (Bidwell et al., 2012).

Erste Erfolge einer Behandlung mit Interferonen konnte insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen wie der Haarzelleukämie erzielt werden (Parker et al., 2016). Durch die Interferon-Behandlung konnte im Gegensatz zu Chemotherapien eine deutliche Überlebensverlängerung erzielt werden

(Platanias, 2013). Auch bei soliden Tumoren wie dem Melanom kann durch eine adjuvante Therapie mit Interferon- $\alpha$  das Überleben verlängert werden (Ascierto et al., 2014). Die Wirkung der Interferon-Therapie scheint dabei von immunmodulatorischen Effekten abhängig zu sein (de La Salmoniere et al., 2000). So kommt es beispielsweise unter der Interferon-Behandlung zu einer vermehrten Aktivität von natürlichen Killer(NK)-Zellen (Ernstoff et al., 1983). Ferner ist der Erfolg einer Interferon-Therapie beim Melanom abhängig von der Anzahl der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Hakansson et al., 1996). Ein Problem bei der Therapie mit Interferonen stellen jedoch Nebenwirkungen wie Grippe-ähnliche Symptome, Depressionen oder die Induktion einer Leukopenie dar (Parker et al., 2016).

## **1.4 Das RIP1-Tag2 Mausmodell**

Das RIP1-Tag2 Mausmodell wurde 1985 von Douglas Hanahan entwickelt (Hanahan, 1985). Dabei wird das Large T-Antigen (Tag) des SV40-Virus hinter dem Ratten-Insulinpromotor 1 (RIP1) in das Genom inseriert. Hierdurch wird Tag exklusiv in den Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ab dem 9. Tag der Embryogenese exprimiert (Alpert et al., 1988). Obwohl Tag in sämtlichen  $\beta$ -Zellen exprimiert wird, sehen die Langerhans-Inseln die ersten 4 bis 6 Wochen unauffällig aus. In einer mehrstufigen Karzinogenese kommt es ab der 4. Woche jedoch zur Entstehung von hyperproliferativen Inseln, die einem Carcinoma in situ (Cis) entsprechen. Ab der 7. Woche zeigen einige dieser hyperproliferativen Inseln eine vermehrte Angiogenese. Nach 12 bis 14 Wochen haben sich schließlich ca. 20% Inseln mit vermehrter Angiogenese zu soliden Tumoren entwickelt, die aber weitgehend abgegrenzt bleiben (Abb. 1). Etwa 1-2% der Tumoren zeigen jedoch einen invasiven Phänotyp (Hanahan, 1985, Hanahan and Folkman, 1996, Bergers et al., 1998).



**Abbildung 1: Darstellung der mehrstufigen Karzinogenese im RIP1-Tag2 Mausmodell (modifiziert nach Hanahan und Folkman, 1996)**

Alle  $\beta$ -Zellen in den Pankreas-Inseln der RT2 Maus exprimieren das SV40 Large T-Antigen und zunächst sehen alle Inseln unverändert aus. Ab der 4. Woche werden ca. 50% der Inseln hyperplastisch. Diese stellen ein Carcinoma in situ dar. In einigen wenigen dieser Inseln kommt es ab der 7. Woche zur Angiogenese, und 20% der Inseln mit vermehrter Angiogenese werden schließlich zu soliden Tumoren. 1-2% der Tumoren zeigen einen invasiven Phänotyp.

Das SV40 Large T-Antigen ermöglicht diese Tumorentstehung, indem es sowohl den p53- als auch den Rb-Signalweg angreift. Dabei hat es große Ähnlichkeiten zum adenoviralen Onkogen E1A und zum E7 der humanen Papillomaviren (Ludlow, 1993).

p53 wird von Tag in einem Komplex gebunden, wodurch seine Funktion vollständig inhibiert wird (Lanford et al., 1985, Mietz et al., 1992). RIP1-Tag2-Mäuse, bei denen zusätzlich p53 ausgeknockt ist, zeigen keine vermehrte Tumorentstehung und keine veränderten Apoptoseeigenschaften (Casanovas et al., 2005). Die Tumormasse und die Tumorzellproliferation war jedoch verringert (Herzig et al., 1999). Dies ist auf die Komplexbildung von p53 mit Tag zurückzuführen mit einer gegenseitigen Stabilisierung beider Proteine. Dabei gibt es eine Korrelation zwischen der Menge an p53 und Tag und dem Fortschreiten der Tumorentstehung (Casanovas et al., 2005).

Wie mit p53 bildet Tag ebenfalls einen Komplex mit hypophosphoryliertem Rb, wodurch dessen Funktion gestört wird, und es zu einer Progression des Zellzyklus in die S-Phase kommt (Ludlow, 1993). Im Gegensatz zu p53 scheint Rb im RIP1-Tag2-Modell jedoch nicht vollständig inaktiviert zu sein. So kommt

es bei einem Knockout von Rb in den  $\beta$ -Zellen von RIP1-Tag2 Mäusen zu einer signifikant vermehrten Tumorentstehung. Dies geht mit einer verstärkten Tumorzellproliferation und einem invasiveren Phänotyp der Tumoren einher (Casanovas et al., 2005).

Insgesamt stellt das RIP1-Tag2 Mausmodell mit dem Übergang von prämaligen hyperplastischen Inseln hin zu soliden Tumoren, die auch metastasieren können, ein typisches mehrstufiges Karzinogenese geschehen nach, das der Tumorentstehung im Menschen ähnelt (Hanahan and Weinberg, 2000).

In vorausgegangenen Arbeiten konnte eine Chemotherapie gemeinsam mit einem Cathepsin-Inhibitor das mittlere Überleben der RIP1-Tag2 Mäuse von 16 auf 20 Wochen verlängern (Bell-McGuinn et al., 2007). Ebenso konnte das Überleben auf bis zu 22 Wochen mittels einer adoptiven Therapie mit Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Zellen verlängert werden, die jedoch zu einer Zerstörung sämtlicher Insulin-produzierender  $\beta$ -Zellen führte, wodurch es zu einem schweren Diabetes kam (Speiser et al., 1997). Auch durch Hemmung der Angiogenese konnte ein Überlebensvorteil gezeigt werden (Bergers et al., 2003, Paez-Ribes et al., 2009). Die besten Ergebnisse zur Tumorthherapie im RIP1-Tag2 Modell konnte aber durch die Therapie mit adoptiv transferierten, Tag-spezifischen Th1 Zellen gezeigt werden. Bei einem frühzeitigen Beginn der Tumorthherapie in der 5. Lebenswoche lebte sogar die Hälfte aller Mäuse mehr als 30 Wochen. Die Wirkungen der Tag-Th1 Zellen wird über die Th1 Zytokine IFN und TNF vermittelt und ist unabhängig vom Einfluss  $CD8^+$  zytotoxischer T-Zellen. Kommt es zu einer Störung des Signalwegs von IFN oder TNF, entfaltet die Tag-Th1 Therapie keine antitumorale Wirkung mehr, sondern beschleunigt stattdessen die Tumorentstehung. Im Gegensatz zur Therapie mit zytotoxischen T-Zellen kam es bei der Th1 Therapie nicht zur Entwicklung eines Diabetes und es konnte keine Apoptose nachgewiesen werden (Müller-Hermelink et al., 2008). Dies zeigt eindrücklich die Möglichkeit der Kontrolle von

Tumoren durch das Immunsystem ohne deren komplette Zerstörung (Dunn et al., 2006, Dunn et al., 2004, Röcken, 2010).

## **1.5 Seneszenz**

### **1.5.1 Die Merkmale seneszenten Zellen**

Das wesentliche Merkmal seneszenten Zellen ist ein irreversibler Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus bei weiterhin bestehender metabolischer Aktivität (Di Leonardo et al., 1994, Herbig et al., 2004, Serrano et al., 1997). Die Feststellung, dass Zellen sich nach einer maximalen Anzahl an Zellteilungen nicht weiter teilen können, wurde bereits 1961 durch Hayflick gemacht, der dieses Verhalten bei Experimenten mit humanen Fibroblasten entdeckte (Hayflick and Moorhead, 1961). Diese als replikative Seneszenz bekannte Seneszenzvariante beruht auf der mit jeder Zellteilung zunehmenden Verkürzung der Telomere. Erreichen diese eine kritische Länge, ist keine weitere Zellteilung mehr möglich (Blasco, 2005, Bodnar et al., 1998).

Neben einem irreversiblen Zellzyklusarrest als grundlegende Voraussetzung für die Seneszenz gibt es noch weitere Marker, durch die sich seneszenten Zellen charakterisieren lassen. Einer der wichtigsten Marker für seneszenten Zellen ist die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). Diese weist in seneszenten Zellen eine verstärkte Aktivität auf (Dimri et al., 1995, Kurz et al., 2000). Seneszenten Zellen konnten mittels SA- $\beta$ -Gal in zahlreichen verschiedenen Tumortypen nachgewiesen werden (Collado and Serrano, 2010). Daneben kommt es in seneszenten Zellen zu typischen Genexpressionsänderungen, insbesondere von Genen, die den Zellzyklus beeinflussen. So wird in seneszenten Zellen meist eine Expression der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p16INK4a gefunden (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Ein typisches Beispiel für solche seneszenten Zellen sind Melanozyten in humanen Nävi. In diesen kommt es häufig zu einer BRAF

V600E Mutation, wodurch der Ras/Raf/Mek-Signalweg überaktiviert wird und Seneszenz induziert wird. Diese seneszenten Melanozyten sind SA- $\beta$ -Gal und p16INK4a positiv (Michaloglou et al., 2005). Typisch hierfür ist auch das klinische Verhalten der Nävi, die zunächst wachsen und dann über viele Jahre konstant groß bleiben.

Auch morphologisch lassen sich charakteristische Veränderungen bei seneszenten Zellen beobachten. Sie erscheinen größer und flacher im Vergleich zu nicht-seneszenten Zellen (Kuilman et al., 2010). Ferner kommt es zu epigenetischen Veränderungen mit Bildung von sogenannten Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF). Diese Foci, die reich an dreifach methyliertem Lysin 9 des Histons H3 sind, befinden sich in Bereichen des Chromatins, die nicht transkribiert werden (Narita et al., 2003).

Ein weiteres Merkmal der Seneszenz ist die Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP). Durch den erhaltenen Zellmetabolismus sind seneszente Zellen in der Lage, eine Vielzahl an Zytokinen wie etwa die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 zu sezernieren (Coppe et al., 2010, Kuilman and Peepers, 2009). Der SASP kann zur weiteren Induktion von Seneszenz beitragen (Acosta et al., 2013) und durch die folgende Immunantwort zu einer Elimination maligner Zellen führen (Hoenicke and Zender, 2012, Kang et al., 2011). Allerdings können auch protumorale Effekte wie eine vermehrte Zellproliferation oder die Begünstigung der epithelialen-mesenchymalen Transition verursacht werden (Coppe et al., 2008).

### **1.5.2 Formen der Seneszenz**

Wie bereits oben erwähnt, wird die erstmals von Hayflick beschriebene, durch die Abnahme der Telomerlänge bedingte Form der Seneszenz als replikative Seneszenz bezeichnet (Hayflick and Moorhead, 1961). Erreicht die

Telomerlänge eine kritische Schwelle, so wird wie bei einem DNA-Schaden der DNA-Damage-Response (DDR) Mechanismus induziert und der Zellzyklus angehalten (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Tumorzellen können diese Begrenzung jedoch umgehen, da sie häufig das Enzym Telomerase exprimieren und somit der Verkürzung der Telomere entgegenwirken (Stewart and Weinberg, 2006). Eine durch den DDR-Mechanismus verursachte Seneszenz kann auch dann ausgelöst werden, wenn die Zellen Stress ausgesetzt sind und dadurch Doppelstrangbrüche der DNA entstehen (Di Leonardo et al., 1994, Parrinello et al., 2003). Dadurch kann auch eine konventionelle Chemotherapie Seneszenz in Tumoren auslösen (Roninson, 2003).

Eine weitere wesentliche Form der Seneszenz ist die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS). Die OIS wurde erstmals in humanen Fibroblasten beobachtet, in denen onkogenes Ras exprimiert wurde. Anstatt der erwarteten Proliferationszunahme kam es zur Entwicklung eines Zellzyklusarrests (Serrano et al., 1997). Bei der OIS spielt meist der Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg eine wichtige Rolle, da es bei einer Deregulation dieses Signalwegs und des daraus folgenden pro-proliferativen Stimulus häufig zur Induktion von Seneszenz kommt. Hierzu gehören auch BRAF Mutationen wie die V600E Mutation, die zur Seneszenz der Melanozyten in Nävi führt (Michaloglou et al., 2005). Auch für weitere Bestandteile des Ras-Raf-Mek-Erk-Signalwegs wurde eine Seneszenz-Induktion beschrieben (Lin et al., 1998, Zhu et al., 1998). Ferner kann der plötzliche Verlust eines Tumor-Suppressors zur Entstehung von Seneszenz führen. So kommt es bei einem Verlust von PTEN ebenfalls zur Seneszenz-Entwicklung (Alimonti et al., 2010). Eine zelluläre Seneszenz kann aber auch durch externe Faktoren ausgelöst werden. So konnte etwa eine Seneszenz-Induktion durch den Chemokin (C-X-C Motif) Liganden (CXCL)1 oder durch Angiotensin II beobachtet werden (Hill et al., 2005, Kunieda et al., 2006). Ebenso ist eine Seneszenz-Induktion durch Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8 oder Transforming Growth Factor (TGF) $\beta$  beschrieben (Hubackova et al., 2012, Kuilman et al., 2008, Acosta et al., 2008). Auch für IFN wurde eine TGF $\beta$



abhängige Seneszenz-Induktion in Tumorzellen gezeigt (Hubackova et al., 2016). Ferner konnte durch IFN beispielsweise in humanen Melanozyten oder in Endothelzellen Seneszenz induziert werden (Wang et al., 2014, Kim et al., 2009).

## 1.6 p16INK4a und der Rb/E2F-Signalweg

Der Tumorsuppressor p16INK4a wurde erstmals 1993 von Serrano beschrieben und gehört zur Familie der INK4 Proteine (Serrano et al., 1993). Codiert wird p16INK4a vom *CDKN2A* Locus, auch *INK4a/ARF* genannt, der auf Chromosom 9p21 beim Menschen bzw. auf Chromosom 4 der Maus liegt (Jiang et al., 1995, Kamb et al., 1994). Neben p16INK4a gehören die Proteine p15INK4b, p18INK4c und p19INK4d zur INK4 Familie. Diesen Proteinen ist allen gemeinsam, dass sie Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK)4 und CDK6 sind (Chan et al., 1995, Guan et al., 1994, Hannon and Beach, 1994, Hirai et al., 1995, Sherr and Roberts, 1995, Ruas and Peters, 1998).

Außerdem wird vom *INK4a/ARF* Locus noch ein weiteres Protein codiert. Das Exon 1 $\beta$  von p19ARF (bzw. p14ARF beim Menschen) unterscheidet sich von Exon 1 $\alpha$  von p16INK4a. Im Anschluss teilen sich p16INK4a und p19ARF Exon 2, das jedoch mit einem alternativen Leseraster (alternative reading frame = ARF) abgelesen wird, wonach p19ARF auch benannt ist (Mao et al., 1995, Quelle et al., 1995). Wie p16INK4a hat auch p19ARF eine Funktion als Tumorsuppressor. Durch Bindung an MDM2 inhibiert p19ARF die Ubiquitylierung von p53 und stabilisiert es dadurch (Michael and Oren, 2003, Gil and Peters, 2006).

Seine Funktion als Tumorsuppressor übt p16INK4a durch Regulation des Retinoblastom (Rb)/E2F-Signalwegs aus. p16INK4a bindet CDK4 und CDK6 und verdrängt diese dadurch aus dem Komplex mit Cyclin D (Pavletich, 1999). Der Komplex aus CDK4/6 und Cyclin D wiederum ist nötig zur Phosphorylierung von Rb (Kato et al., 1993, Ewen et al., 1993). Dabei kommt

dem Rb/E2F-Signalweg eine wichtige Bedeutung bei der Steuerung des Zellzyklus zu. Hypophosphoryliertes Rb bindet die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, insbesondere E2F1, 2 und 3 (Weinberg, 1995, Sherr, 2001). Wird Rb durch den Komplex aus Cyclin D und CDK4 phosphoryliert, kann dieses E2F nicht länger binden (Chellappan et al., 1991). Im Zusammenspiel zwischen Rb, den Cyclinen, den CDKs und den CDK-Inhibitoren wie p16INK4a überschreitet der Zellzyklus schließlich einen Restriktionspunkt von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, der die weitere Zellzyklusprogression unabhängig von externen mitogenen Signalen macht (Pardee, 1989). Eine Überexpression von E2F1-3 führt zum Übergang des Zellzyklus in die S-Phase (Lukas et al., 1996, DeGregori et al., 1997). Wird p16INK4a überexprimiert, bleibt Rb hypophosphoryliert und es kommt zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Hierzu muss aber zwingend funktionell aktives Rb vorhanden sein (Lukas et al., 1995, Medema et al., 1995, Serrano et al., 1995).

Entsprechend seiner Funktion als Tumorsuppressor konnten in vielen Tumorzelllinien und Tumoren Mutationen von p16INK4a gefunden werden (Kamb et al., 1994, Nobori et al., 1994, Okamoto et al., 1994). Deletionen oder Punktmutationen von p16INK4a wurden etwa bei Ösophagus-, Blasen-, Lungen- oder Gallenblasentumoren und in Familien mit hereditär vererbtem Melanom gefunden, aber auch noch bei einer großen Anzahl weiterer Tumoren (Liggett and Sidransky, 1998, Hall and Peters, 1996, Serrano, 1997, Ruas and Peters, 1998). Insbesondere bei Adenokarzinomen kommt es bei bis zu 98% der Fälle zu einer Inaktivierung von p16INK4a (Schutte et al., 1997). Ebenfalls wurden mehr als 50 Keimbahnmutationen von p16INK4a beschrieben, die zu einem erhöhten Tumorrisiko führen (Greenblatt et al., 2003). Ferner konnte in vielen Tumoren eine Hypermethylierung des Promotors von p16INK4a gefunden werden. Damit war p16INK4a eines der ersten Gene, für das eine epigenetische Repression beschrieben wurde (Esteller et al., 2001). Mäuse, die durch Entfernung des INK4a Locus selektiv kein p16INK4a exprimieren, jedoch noch p19ARF besitzen, weisen eine erhöhte Rate an spontanen und

karzinogeninduzierten Tumoren auf (Serrano et al., 1996). Dagegen führt eine Überexpression von p16INK4a zu einer dreifach verminderten Tumorentstehungsrate (Matheu et al., 2004).

Durch die Fähigkeit von p16INK4a über den Rb/E2F-Signalweg einen Zellzyklusarrest auszulösen, kommt diesem auch eine wesentliche Rolle bei der Seneszenz zu. So wird der permanente Zellzyklusarrest der Seneszenz meist entweder über den p53- oder den Rb/E2F-Signalweg induziert (Campisi, 2013, Kuilman et al., 2010). Ebenso scheint p16INK4a bei der Zellalterung beteiligt zu sein. So konnte in vielen verschiedenen Zellarten eine stetige Zunahme der p16INK4a-Level im Laufe der Zeit nachgewiesen werden (Krishnamurthy et al., 2004, Melk et al., 2004). Eine Expression von p16INK4a, vergleichbar mit der bei alternden Zellen, führte zu einer geringeren Proliferation von Inselzellen des Pankreas, wohingegen bei einem Verlust von p16INK4a die Inselzellen auch noch im Alter vermehrt proliferieren können (Krishnamurthy et al., 2006). Dieses Verhalten konnte ebenfalls in hämatopoetischen Stammzellen und neuronalen Stammzellen beobachtet werden (Janzen et al., 2006, Molofsky et al., 2006).

Die Expression von p16INK4a wird von vielen Faktoren beeinflusst. Eine vermehrte Expression wurde unter dem Einfluss multipler Stressfaktoren beobachtet. Dies umfasst die Exposition mit UV-Strahlung oder ionisierender Strahlung, reaktiven Sauerstoffspezies oder Chemotherapeutika, die auch alle die Induktion einer vorzeitigen Seneszenz bedingen können (Ito et al., 2006, Piepkorn, 2000, Robles and Adami, 1998, Wang et al., 2006). Aber auch bereits durch die *in vitro* Kultivierung von Zellen kommt es zu einer vermehrten Expression von p16INK4a (Zindy et al., 1997). Bei der Reaktion auf solche Stressfaktoren kommt es meist über eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur Induktion von p16INK4a (Bulavin et al., 2004, Ito et al., 2006, Iwasa et al., 2003). Beispielhaft hierfür sind die BRAF V600E Mutation oder onkogenes Ras, die beide zu einer unregulierten MAPK-Aktivierung führen und dadurch eine OIS auslösen (Serrano et al., 1995, Michaloglou et al., 2005). Als mögliche Vermittler, die durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur Induktion von

p16INK4a beitragen, zählen p38 oder Ets1 und 2 (Ohtani et al., 2001, Iwasa et al., 2003). Ferner kann der Transkriptionsfaktor JunB aus der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren die Expression von p16INK4a steigern und das Zellwachstum hemmen, da sich drei AP-1 Bindungsstellen im p16INK4a Promoter befinden (Passegue and Wagner, 2000). Eine Hemmung von p16INK4a wurde insbesondere durch Proteine aus dem Polycomb Group Komplex (BMI-1, Cbx7, Me18) oder durch T box Proteine beschrieben (Gil et al., 2004, Jacobs et al., 2000, Jacobs et al., 1999). Daneben kann Id1, das zur Familie der Helix-Loop-Helix Proteine gehört, dem Effekt von Ets1 und 2 entgegenwirken und die Expression von p16INK4a hemmen (Alani et al., 2001, Ohtani et al., 2001). Zudem besteht noch ein Feedback-Loop zwischen p16INK4a und Rb. Ist Rb phosphoryliert, kommt es über E2F zu einer vermehrten Expression von p16INK4a, während hypophosphoryliertes Rb die Expression von p16INK4a hemmt (Khleif et al., 1996, Li et al., 1994). Entsprechend kommt es bei einer Inaktivierung von Rb, etwa durch virale Proteine wie E7 aus humanen Papillomaviren, zu einer vermehrten Expression von p16INK4a (Reuschenbach et al., 2008).

## 1.7 Fragestellung

Im RIP1-Tag2 Mausmodell kommt es bei einer Behandlung mit Tag-spezifischen Th1 Zellen zu einer Verlängerung des Überlebens. Dies ist nicht mit einer Apoptose der T-Zellen zu erklären, sondern durch einen durch die Th1-Zellen vermittelten Wachstumsstopp der  $\beta$ -Tumorzellen (Müller-Hermelink et al., 2008, Braumüller et al., 2013).

Die Induktion eines solchen Wachstumsstopps kann entweder über den p53-Signalweg oder über den Rb/E2F-Signalweg erfolgen. Der p53-Signalweg ist im RIP1-Tag2 Modell jedoch vollständig durch Tag inaktiviert. Hingegen weist der Rb/E2F-Signalweg noch eine Restaktivität auf (Casanovas et al., 2005, Mietz et al., 1992).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Tag-Th1 Therapie bzw. die Therapie mit den Th1-Zytokinen IFN und TNF auf die Regulation des Tumorstwachstums durch den Tumorsuppressor p16INK4a über den Rb/E2F-Signalweg genauer betrachtet werden. Hierfür wurde zunächst die Wirkung der Zytokine auf die Expression von p16INK4a *in vivo* und *in vitro* im Hinblick auf die Hemmung der Proliferation und die Induktion weiterer Seneszenz-Marker bestimmt.

Anschließend sollte die funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Regulation des Tumorzellwachstums und bei der Induktion der Seneszenz im RIP1-Tag2 Modell ermittelt werden. Dazu wurde die Expression von p16INK4a durch einen shRNA-vermittelten Knockdown herunterreguliert. Anschließend wurden die Auswirkungen auf die Tumorzellproliferation und deren Ansprechen auf die Zytokin-Behandlung untersucht.

Um festzustellen, ob die Behandlung mit den Th1-Zytokinen auch einen Effekt auf andere Tumorentitäten hat, wurden zusätzliche Versuche an der humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Reagenzien

#### 2.1.1 Geräte

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

*Tabelle 1: Liste der für diese Arbeit verwendeten Geräte*

<b>Gerät / Typ</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Abzugshaube</b>	
Airflow Controller AC2	Waldner
<b>Beta Counter &amp; Ansaugerät</b>	
MicroBeta FilterMate Harvester	PerkinElmer
1450 MicroBeta TriLux	PerkinElmer
<b>Brutschränke</b>	
Hera Cell 240	Heraeus
<b>ELISA-Reader</b>	
Multiskan EX	Thermo Scientific
<b>Entwicklergerät</b>	
Optimax	Protec
<b>Gelelektrophorese</b>	
Sub-Cell GT	Bio-Rad
Protean II	Bio-Rad
Mini-Protean Tetra	Bio-Rad
<b>Semidry Blot</b>	
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
<b>Heizblöcke</b>	
Thermomixer Comfort	Eppendorf
HB-LS2	VLM
<b>Lichtquelle</b>	
KL 1500 LCD	Leica

**Mikroskope**

Axiovert 25	Zeiss
Axiovert 200	Zeiss
Binokular S6 E	Leica Microsystems
Leica TCS-Sp / Leica DM RB	Leica Microsystems

**Neubauer Zählammern**

Glaswarenfabrik Karl Hecht

**Netzteile**

PowerPac 300	Bio-Rad
PowerPac Basic	Bio-Rad
EPS 300	Biometra

**PCR-Cycller**

Primus 96 advanced	Peqlab
Primus 96 plus	Biotech
Mastercycler gradient	Eppendorf
LightCycle 480 II	Roche

**pH-Meter**

Modell CG842	Schott
--------------	--------

**Photometer**

BioPhotometer 6131	Eppendorf
--------------------	-----------

**Pipettierhilfen**

Modell Reference	Eppendorf
Modell Research	Eppendorf
Pipette boy	Hirschmann

**Spritzen**

Hamilton	Hamilton Company
----------	------------------

**Sterilwerkbank**

HeraSafe KS 18	Heraeus
----------------	---------

**Transilluminator**

RH-5.1 Dunkelraum mit Easy 442K Kamera	Herolab
--	---------

**Vortexer**

Reax Top	Heidolph
----------	----------

**Waage**

Präzisionswaage CP224SOCE	Sartorius
Laborwaage EW 1500-2M	Kern
Laborwaage Kern 770	Kern

**Wasserbad**

Wasserbad Typ 1003	GFL
--------------------	-----

**Wippe**

STR8 Rocking Platform	Stuart Scientific
Sky Line DRS-12	ELMI

**Zellsorter**

Auto MACS	Miltenyi Biotech
-----------	------------------

**Zentrifugen**

Biofuge pico	Thermo Scientific
Biofuge fresco	Thermo Scientific
Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Die in Tabelle 2 aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden für diese Arbeit verwendet.

*Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Pipetten</b>	
Ungestopfte Pipettenspitzen	
10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Gestopfte Pipettenspitzen	
Safe Seal Tips 10 µl, 100 µl	Biozym
Biosphere Filter Tips 1000 µl	Sarstedt
Glaspipetten (steril)	



Corning Costar Stripette	Corning Costar
2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	

### Gefäße

CELLSTAR Polypropylen Röhren	Greiner
15 ml, 50 ml	

### Zellkultur

CELLSTAR Cell Culture Plates	Greiner
CELLSTAR Cell Culture Flasks	Greiner
Microtest 96 well flat bottom	BD Bioscience
Chamberslides (8 chambers)	BD Bioscience

## 2.1.3 Reagenzien und Kits

Die in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien wurden in dieser Arbeit verwendet.

*Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien und Kits*

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Carl Roth
AKC Lysing Buffer	Thermo Fisher
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Beta-Galactosidase Staining Kit	US Biological
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
BetaPlate Scint	PerkinElmer
Bromphenolblau	Fluka
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Applied Science
Collagenase NB 8	Serva

DAPI	Invitrogen
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Ethanol	VWR
Fetal Calf Serum (FCS)	Perbio-Science
Fluorescence Mounting Medium	DAKO
HEPES-Puffer (1M)	Biochrom
IFN- $\gamma$ , rekombinant (murin, human)	R&D Systems
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
dH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
KAPA SYBR <sup>®</sup> FAST qPCR Kit	KAPA Biosystems
Leupeptin	Sigma-Aldrich
LumiGLO	Cell Signaling
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
Medium	
DMEM	Biochrom
RPMI	Biochrom
MACS Microbeads	Miltenyi Biotech
MEM-Aminosäuren (50x)	Biochrom
Methanol	VWR
MgCl	Carl Roth
MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Natriumpyruvat	Biochrom
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel
PBS	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Pepstatin	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Polybrene	Sigma-Aldrich
Poly-L-Ornithin (0,01%)	Sigma-Aldrich

Protein Block	DAKO
Proteinase K Lösung	Invitrogen
Puromycin	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
Roti-Quant universal	Carl Roth
RT2 First Strand Kit	Qiagen
SDS	Carl Roth
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
Starting Block T20	Thermo Fisher
Taq PCR Core Kit	Qiagen
TEMED	Carl Roth
Tissue Tek	Sakura
TNF, rekombinant (murin, human)	R&D Systems
TRIS/HCl	AppliChem
Triton X-100	Carl Roth
Trypsin 0,5% EDTA	Invitrogen
Tween-20	Carl Roth
Yo-Pro	Invitrogen
X-Gal	US Biological

## 2.1.4 Rezepturen

### 2.1.4.1 Zellkulturmedien

Die folgenden Rezepturen wurden für die Kultivierung der Tumorzellen verwendet.

**Tabelle 4: Rezepturen der Zellkulturmedien**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Standard-Medium zur Kultur der $\beta$ -Tumorzellen	500 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	10%	Fetales Kälberserum (FCS)
	1%	HEPES-Puffer
	1%	Natriumpyruvat
	1%	MEM-Aminosäuren
	0,5%	Penicillin/Streptomycin
	0,2%	$\beta$ -Mercaptoethanol
DMEM Medium zur T-Zell-Isolierung	500 ml	DMEM
	10%	Fetales Kälberserum (FCS)
	1%	HEPES-Puffer
	1%	Natriumpyruvat
	1%	MEM-Aminosäuren
	1%	Penicillin/Streptomycin
	0,2%	$\beta$ -Mercaptoethanol
Medium für die Rhabdo- myosarkomzellkultur	500 ml	RPMI 1640
	10%	Fetales Kälberserum (FCS)
	1%	HEPES-Puffer
	1%	Natriumpyruvat
	1%	MEM-Aminosäuren
	0,5%	Penicillin/Streptomycin

### 2.1.4.2 Rezepturen für die Tumorzellpräparation

Die in Tabelle 5 aufgeführten Rezepturen wurden für die Isolation der Tumoren aus Rip1-Tag2 Mäusen benötigt.

**Tabelle 5: Rezepturen für die Isolation der  $\beta$ -Tumorzellen**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
HANKS-Lösung (4x)	32 g/l	NaCl
	1,6 g/l	KCl
	0,74 g/l	CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,8 g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,24 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,24 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,4 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
	9,5 g/l	HEPES
Präparierlösung A	1x	HANKS Salt Solution
	550 mg	Glucose/l
Präparierlösung B	Präparierlösung A	
	1,22g	BSA/350ml
Kollagenase Lösung	1 mg/ml	Kollagenase NB 8
	5,85 $\mu$ l/ml	1M CaCl <sub>2</sub>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden gemäß den Bedingungen des Tierschutzgesetzes und unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Die Versuche wurden unter den Anträgen HT 2/03 und HT 2/07 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

### 2.2.2 Genotypisierung der Mäuse

Aufgrund der kurzen Lebensdauer der RIP1-Tag2-Mäuse, erforderte die Zucht eine heterozygote Verpaarung von C3H-Weibchen mit RIP1-Tag2-Männchen (Hanahan, 1985). Um den Genotyp der Mäuse zu bestimmen, wurden die Mäuse per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genotypisiert.

Zur Isolierung der DNA aus Frischgewebe wurde den Mäusen eine Ohrbiopsie entnommen. Das Gewebe wurde in Lysepuffer unter Zugabe von Proteinase K über Nacht bei 56 °C verdaut. Durch Erhitzen auf 70°C für 20 Minuten wurde die Proteinase K inaktiviert und die DNA mit Isopropanol präzipitiert. Anschließend wurde jede Probe der PCR-Mastermix (Tabelle 6) zugegeben.

**Tabelle 6: PCR-Mastermix für die Genotypisierung**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
PCR-Mastermix (je Probe)	0,5 µl	Primer SV1 (1:10)
	0,5 µl	Primer SV5 (1:10)
	1 µl	dNTPs
	5 µl	10x Puffer
	0,5 µl	Taq-Polymerase
	1 µl	MgCl <sub>2</sub>
	39 µl	H <sub>2</sub> O

Bei der PCR werden spezifische DNA Sequenzen amplifiziert und dadurch detektierbar gemacht (Peake, 1989). Durch eine wiederholte Sequenz aus Denaturierung der DNA, Anlagerung (Annealing) der spezifischen Primer und Elongation der DNA durch die hitzestabile Taq-Polymerase wird das gesuchte Genprodukt vervielfacht (Saiki et al., 1985).

**Tabelle 7: Protokoll für den PCR-Lauf der RIP1-Tag2-Genotypisierung**

**Temperatur / Dauer**

---

1. 94 °C für 3 Minuten
2. 30 Zyklen à: Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden  
                   Annealing bei 59 °C für 30 Sekunden  
                   Elongation bei 72° C für 30 Sekunden
3. 72 °C für 3 Minuten
4. Proben bei 8 ° C halten

Für die PCR wurde das in Tabelle 7 gelistete Protokoll verwendet. Als Primer dienten die in Tabelle 8 gezeigten Oligonukleotide SV1 und SV5.

**Tabelle 8: PCR-Primer zur Genotypisierung der RIP1-Tag2 Mäuse**  
 (A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin)

<b>Primer</b>	<b>Gen</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
SV1	Tag2	CGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG CAG
SV5	Tag2	CAG AGC AGA ATT GTG GAG TGG

Die in der PCR amplifizierten DNA Fragmente wurden dann durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Durch die negative Ladung der DNA wandert diese, je nach Größe des Fragments, unterschiedlich schnell durch das 2%ige Agarosegel zur Anode hin.

Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 50 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Das Gel wurde in die Gelkammern gegossen und ein Kamm zur Bildung der Taschen für die zu testenden Proben eingesetzt.

Zur Darstellung der DNA wurden ein Ladepuffer aus GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) in Orange G (Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis 1:2000 erstellt. Pro Probe à 50 µl wurden 10 µl des Ladepuffers zugegeben. Die Geltaschen des Agarosegels wurden anschließend mit jeweils 10 µl beladen. Zur Größendifferenzierung wurden ferner 0,5 µl einer 1kb DNA Leiter in einer separaten Tasche verwendet. Das in der PCR amplifizierte DNA Fragment hat eine Größe von etwa 500 Basenpaaren. An das Gel wurde für etwa 30 Minuten eine Spannung von 120 Volt angelegt, um die DNA zur Anode hin wandern zu lassen. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels eines Transilluminators.

### **2.2.3 Tumorzellisolierung und Zellkultur**

Zur Durchführung der Experimente *in vitro* wurden  $\beta$ -Tumorzellen aus den Pankreata von RIP1-Tag2 Mäusen isoliert. Hierfür wurden, wenn nicht anderweitig gekennzeichnet, 12 Wochen alte RIP1-Tag2 Mäuse verwendet.

Die Mäuse wurden in einer CO<sub>2</sub> Atmosphäre getötet. Wie beschrieben wurde das Pankreas durch eine Eröffnung des Abdomens freigelegt und anschließend eine Kollagenase-Lösung retrograd über den Ductus pancreaticus injiziert, um die Insulinome vom restlichen Pankreas-Gewebe zu dissoziieren (Müller-Hermelink et al., 2008). Das Pankreas wurde abgesetzt und für weitere 10 Minuten bei 37°C in Kollagenase-Lösung angedaut. Um den Verdauungsvorgang zu beenden, wurde Präparierlösung B im Überschuss hinzugegeben und der Überstand bei 800 U/min abzentrifugiert. Zur weiteren Zerkleinerung der isolierten Inseln wurden diese mechanisch durch das



Pressen durch Spritzen oder Kanülen mit 1,2 mm Durchmesser behandelt. Anschließend wurden die Insulinome unter dem Binocular vom restlichen Gewebe separiert. Zwischenzeitlich wurden die bereits präparierten Tumoren in Präparierlösung B auf Eis gelagert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Insulinome zunächst mit PBS gewaschen und im Anschluss mit vorgewärmtem Trypsin behandelt. Eine weitere mechanische Separation in Trypsin erfolgte über 5 Minuten durch Zerschneiden mittels kleiner Scheren. Die Wirkung von Trypsin wurde nach weiterer Inkubation bei 37°C über 5 Minuten durch Zugabe von RPMI-Medium abgestoppt. Nach der Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau wurden die Zellen in 24 Well-Platten mit ca. 2 Millionen Zellen pro Well ausgesät.

Die weitere Kultivierung der  $\beta$ -Tumorzellen erfolgte in Standard-Medium bei 37°C und 7,5% CO<sub>2</sub>. Vor Verwendung wurden alle Medien auf 37 °C erwärmt. Zum Passagieren der Tumorzellen wurde das jeweilige Behältnis zunächst mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 37 °C warmem Trypsin überschichtet. Nach 5-10 Minuten wurde die Trypsin-Wirkung durch Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellen in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen, die Anzahl lebender Zellen mit einer Neubauer Zählkammer mit Hilfe von Trypanblau ermittelt und die Zellen anschließend je nach Bedarf erneut ausgesät.

#### **2.2.4 Tag-Th1- und APC-Gewinnung**

Um Tag-spezifische T-Zellen zu erhalten, wurden transgenen Mäusen mit einem für das Large-T Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor (Tag-TCR) nach Opferung durch eine CO<sub>2</sub>-Narkose die axillären und inguinalen Lymphknoten

sowie die Milz entnommen (Müller-Hermelink et al., 2008). Zur Dissoziation der Zellen wurden die Lymphknoten und die Milz durch ein Sieb mit 200 µm Porengröße zerrieben, in DMEM Medium aufgenommen und der Überstand bei 1500 U/min über 5 Minuten abzentrifugiert. Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml ACK (Ammoniumchlorid-Kalium) Lysing buffer lysiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) resuspendiert. CD4<sup>+</sup> Tag-Th1-Zellen wurden anschließend durch Kopplung an anti-CD4-Mikrobeads (20 µl) mit Hilfe einer MACS-Säule isoliert.

APC Zellen wurden analog den Tag-Th1 Zellen aus Milz und Lymphknoten gewonnen. CD4 und CD8 Zellen wurden mit Hilfe von anti-CD4 bzw. anti-CD8 Hybridom-Überständen und einer Komplement-Reaktion depletiert. Um eine weitere Zellteilung zu verhindern, wurden die Zellen anschließend mit 3,5 Gy bestrahlt (Gamma Cell, Prof. Rammensee, Immunologie Tübingen).

Zur Stimulation wurden Tag-Th1 und APC im Verhältnis 1:2-1:5 (Tag-Th1:APC) zusammen mit 11B11 (10 µg/ml), CpG-DNA1668 (200 µM), Tag-Peptid 362-384 (4 µM) in DMEM Medium kultiviert (Egeter et al., 2000). Nach 2 Tagen wurde 50 U/ml IL-2 zugefügt und die Zellen über 7 Tage expandiert.

### **2.2.5 Tag-Th1 Therapie**

Zur Tumorthherapie *in vivo* wurden Rip1-Tag2 Mäusen beginnend ab der 7. Lebenswoche nach einer Bestrahlung mit 2 Gy 1 Mal wöchentlich 10<sup>7</sup> Tag-Th1 Zellen in 500 µl NaCl oder 500 µl NaCl als Kontrolle intraperitoneal injiziert. Die Behandlung erfolgte über insgesamt 5-7 Zyklen (Müller-Hermelink et al., 2008).

### **2.2.6 Zytokinbehandlung**

Die  $\beta$ -Tumorzellen wurden *in vitro* mit rekombinantem murinem IFN und TNF behandelt. Analog wurde zur Behandlung der humanen Rhabdomyosarkomzellen rekombinantes humanes IFN und TNF verwendet. Die jeweiligen IFN- und TNF-Stocklösungen wurden zunächst in Medium verdünnt. Dabei wurden in der Regel die folgenden Zytokinkonzentrationen und -kombinationen verwendet: 100 ng/ml IFN, 10 ng/ml TNF, 100 ng/ml IFN und 10 ng/ml TNF.

Anschließend wurde das alte Medium abgenommen, durch zytokinhaltiges Medium ersetzt und für die gewünschte Behandlungsdauer auf den Zellen belassen. Bei einer Behandlungsdauer von mehr als 72h wurde das Medium durch frisches Zytokin-haltiges Medium ersetzt. Es wurden maximal semikonfluente Zellkulturen behandelt. Zur Kontrolle wurde Medium ohne Zytokinzusatz verwendet.

### **2.2.7 Immunhistochemische Färbungen**

Zur Färbung der Tumoren von *in vivo* mit Tag-Th1 Zellen behandelten Mäusen wurden diese zunächst nach obigem Protokoll isoliert und ohne anschließende Zerkleinerung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 3-5  $\mu$ m dicke Serienschnitte angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden nach Herstellerprotokoll (Ventana Medical System) automatisiert mit Hämatoxylin und Eosin und auf den Proliferationsmarker Ki67 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme; Verdünnung 1:50) gefärbt (Kunder et al., 2007).

## 2.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen der *in vivo* behandelten Tumoren wurden das gesamte Pankreas aus den Mäusen präpariert und in Tissue Tek eingebettet. Im Anschluss wurden mit dem Kryotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 2 Minuten mit Periodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Lösung fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit Eselserum (1:20) geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte zunächst mit dem entsprechenden Primärantikörpern und nach einem erneuten Waschschrift mit dem zugehörigen Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Yo-Pro gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und unter dem Lasermikroskop ausgewertet.

Zur Immunfluoreszenzfärbung von Tumorzellen *in vitro* wurden diese in Chamberslides ausgesät. Um eine bessere Bindung der Zellen an die Chamberslides zu ermöglichen, wurden diese zunächst mit Poly-L-Ornithin überschichtet (Poly-L-Ornithin 1:10 in PBS verdünnt, 150 µl je Chamber, 1 Stunde bei 37°C). Anschließend wurden die Tumorzellen mit einer Dichte von 10000 bis 40000 Zellen pro Chamber ausgesät. Die Zytokinbehandlung der Zellen erfolgte frühestens 24 Stunden nach der Aussaat.

Vor der Färbung wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und dann mit einem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert (je Chamber 100 µl Aceton/Methanol im Verhältnis 1:2 für 5 Minuten bei -20 °C). Um eine unspezifische Bindung der Primärantikörper zu vermeiden, wurden die unspezifischen Bindungsstellen nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBSTB (PBS + 0,05% Tween-20 + 0,005% BSA) mit DAKO Protein Block für 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Primärantikörper in PBSTB verdünnt über 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht

(100 µl je Chamber). Zur Negativkontrolle wurde eine Kammer nur mit PBSTB überschichtet. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBSTB wurden die Slides mit dem in PBSTB gelösten, Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (1:360) nach drei weiteren Waschschritten mit PBS verwendet. Anschließend wurden die Slides zweimalig mit PBS gewaschen, mit Fluorescence Mounting Medium beschichtet und eingedeckelt. Die Auswertung der Slides erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Auszählen der aufgenommenen Bilder mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

**Tabelle 9: Liste der für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper und DNA-Farbstoffe**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Host</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Rabbit-Alexa 488	Invitrogen	Ziege	1:400
Ki67 (ab 15580)	Abcam	Hase	1:100
p16INK4a (F-12)	Santa Cruz	Maus	1:50
p16INK4a (M-156)	Santa Cruz	Hase	1:100
Synaptophysin	Lifespan BioSciences	Hase	ready to use
DAPI	Invitrogen		1:3600
Yo-Pro	Invitrogen		1:2000
Cy5-Anti-Rabbit	Dianova	Esel	1:500
Cy3-Anti-Mouse	Dianova	Esel	1:500

## 2.2.9 Proliferationsanalysen

### 2.2.9.1 *3H-Thymidin Proliferationsanalyse*

Da proliferierende Zellen zur DNA Synthese Thymidin benötigen, kann die Proliferationsrate von Zellen mittels Inkorporation von Tritium-markiertem Desoxythymidin ( $^3\text{H}$ -Thymidin) ermittelt werden. Die isolierten Tumorzellen

wurden hierzu in 96 Well Platten ausgesät und sich über Nacht absetzen gelassen. Anschließend wurden je Well 10 µl der 3H-Thymidin Lösung (1:40 in Medium verdünnt) hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Zur Lösung der Zellen wurden die Wells nach dem Waschen mit PBS mit je 100 µl warmem Trypsin überschichtet und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die gelösten Zellen in einer Ansaugvorrichtung mittels einer Vakuumpumpe auf eine zuvor mit destilliertem Wasser benetzte Filtermatte übertragen. Die Filtermatte wurde in der Mikrowelle getrocknet, mit Szintillatorlösung befeuchtet und in eine Klarsichttüte eingeschweißt. Im Anschluss wurde im Beta Counter die Anzahl der Counts bestimmt.

### **2.2.9.2 BrdU Proliferationsassay**

Die BrdU Proliferationsanalyse wurde mit einem BrdU-Kit der Firma Roche Applied Science durchgeführt. Wie 3H-Thymidin wird auch BrdU als Thymidin-Analogon bei der DNA-Synthese inkorporiert (Gratzner, 1982). Anschließend kann BrdU über spezifische Antikörper proportional abhängig zu dessen Einbau in die DNA mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) detektiert werden (Gonchoroff et al., 1985). Pro Gruppe wurden je 6 Wells einer 96-Well-Platte mit 5000 Zellen ausgesät und – wenn nicht anderweitig angeben – für 72 Stunden behandelt. 24 Stunden vor Ende der Behandlung wurde die in Medium verdünnte BrdU-Labeling-Lösung in einer Endkonzentration von 10 µM BrdU hinzugefügt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit der FixDenat-Lösung für 30 Minuten fixiert und die DNA denaturiert, um das Binden des Antikörpers zu ermöglichen. Die FixDenat-Lösung wurde abgeklopft und es wurden 100 µl Antikörper (Anti-BrdU-POD 1:10 verdünnt in Antibody Dilution Solution) je Well für 90 Minuten einwirken gelassen. Nach dreimaligem Waschen mit 1:10 in dH<sub>2</sub>O verdünntem Waschpuffer wurden die

Wells mit 100 µl Substrat überschichtet und nach 15 Minuten die Extinktion bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

### **2.2.10 Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase-Assay**

$\beta$ -Galaktosidasen sind Enzyme zur Hydrolyse der glykosidischen Bindungen von  $\beta$ -Galactopyranosiden. In der Zelle sind sie normalerweise in den Lysomen zu finden. Seneszente Zellen besitzen eine  $\beta$ -Galaktosidase, die nicht im stark saurem Milieu, sondern bei pH 6,0 arbeitet. Diese Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) lässt sich in der ganzen Zelle detektieren (Dimri et al., 1995, Sherwood et al., 1988).

Für diesen Assay wurde ein  $\beta$ -Galactoside Staining Kit von US Biologicals verwendet. Zur Behandlung wurden die Tumorzellen in 96 Well-Platten ausgesät und nach der jeweiligen Behandlungsdauer zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde der Fixierlösungsansatz 1:10 in Reinstwasser verdünnt. Je Well wurden 100 µl der verdünnten Fixierlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und danach erneut zwei Mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden je 100 µl der Färbelösung auf die Zellen gegeben. Die Färbelösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

- Färbelösung aus 1:10 in Reinstwasser verdünnter Färbestocklösung
- je 1:100 in Färbelösung verdünntes Supplement A und Supplement B
- 1:20 verdünnte X-Gal-Stocklösung (20 mg X-Gal in 1000 µl Dimethylformamid)

Anschließend wurde die Platte in Alufolie verpackt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der  $\beta$ -Galaktosidase-positiven Zellen wurde durch Auszählen unter dem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop bestimmt.

## 2.2.11 Western-Blot

Zur Erstellung von Western-Blots wurden zunächst Zellysate hergestellt. Hierfür wurden dem Protein-Lysepuffer zunächst die Protease-Inhibitoren Aprotinin (1,5 µg/ml), Leupeptin (10 µg/ml), Pepstatin (1µg/ml) und PMSF (200mM) und bei Bedarf der Phosphatase-Inhibitor PhosSTOP beigefügt.

Ausgesäte Tumorzellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, anschließend mit 150 µl Lysepuffer pro Well versetzt und die Proteine mechanisch durch Abschaben in Lösung gebracht. Sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

*Tabelle 10: Rezepturen, die für den Western-Blot verwendet wurden*

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Protein-Lysepuffer	20 mM	Tris, pH 8
	137 mM	NaCl
	0,05%	Triton X-100
	1 mM	EDTA
	5 %	Glycerin
2x Lämmli-Puffer	126 mM	Tris
	20%	Glycerin
	4%	SDS
	5%	2-Mercaptoethanol
	0,02%	Bromphenolblau
	pH 6,8	
10x Laufpuffer	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l dH <sub>2</sub> O	
Trenngelpuffer	45,5 g	Tris
	1 g	SDS
	ad 250 ml dH <sub>2</sub> O, pH 8,8	
Sammelgelpuffer	15,1 g	Tris
	1 g	SDS
	ad 250 ml dH <sub>2</sub> O, pH 6,8	



Semi-Dry Puffer	5,8 g	Tris
	2,92 g	Glycin
	3,8 ml	10% SDS
	200 ml	Methanol
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
10x TBS	24,23g	Trizma
	80,06g	NaCl
	ad 1l	H <sub>2</sub> O VE (pH 7,6)
Waschpuffer	TBS	
	0,01%	Tween-20

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe des RotiQuant universal-Assays photometrisch auf einer 96-Well-Platte bestimmt, der auf der Biuretreaktion beruht. Im alkalischen Milieu kommt es zu einer Komplexbildung zwischen Proteinen und Cu<sup>2+</sup> Ionen, die hierdurch reduziert werden und wiederum mit der Bicinchoninsäure einen Farbkomplex bilden (Smith et al., 1985, Wiechelman et al., 1988). Hierfür wurde eine Standardreihe aus einer BSA-Stocklösung (c = 2 mg/ml) mit Proteinkonzentrationen zwischen 5 µg/ml und 2000 µg/ml hergestellt und die Proben 1:10-1:5 in PBS verdünnt. Sowohl von der Standardreihe als auch von den zu messenden Proben wurden je 2 Wells mit insgesamt 50 µl befüllt und 100 µl Färbelösung hinzugegeben. Alle Proben wurden mindestens 2-fach gemessen. Die Platte wurde entweder bei Raumtemperatur für ca. 1,5 Stunden oder bei 37 °C für 30 Minuten gelagert und dann die Extinktion bei 492 nm Wellenlänge im ELISA-Reader gemessen. Die Auswertung wurde in Microsoft Excel durchgeführt.

Mittels der SDS-PAGE Gelelektrophorese wurden die Proteine anschließend nach ihrer Größe separiert (Laemmli, 1970). Durch die Komplexbildung der Proteine mit SDS, abhängig von deren Masse, erhalten diese eine ihrer Proteinmasse entsprechende negative Ladung. Je nach Ladung wandern die Proteine dann unterschiedlich schnell durch das Gel und werden so der Größe

nach aufgeteilt. Als Trenngele wurden entweder 12 oder 15%-ige Gele und als Sammelgel ein 5%iges Gel benutzt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit 0,75 mm Abstand gegossen. Durch Zugabe von APS und TEMED wurde die Polymerisation der Gele eingeleitet. Alternativ wurden Mini-PROTEAN TGX Fertiggele der Firma BioRad verwendet.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele**

<b>Substanz</b>	<b>12%iges Gel</b>	<b>15%iges Gel</b>
30% Polyacrylamid	4 ml	5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,6 ml	2,6 ml
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl
H <sub>2</sub> O	3,3 ml	2,3 ml

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels**

<b>Substanz</b>	<b>5%iges Gel</b>
30% Polyacrylamid	850 µl
0,5 M Tris pH 6,8	625 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl
H <sub>2</sub> O	3,4 ml

Zur Elektrophorese wurden die Gele in der Laufkammer eingespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Vor Beladung der Geltaschen wurden die Proteine zunächst durch Erhitzen bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und mit 2x Lämmli-puffer verdünnt. Anschließend wurden die Geltaschen mit einer Hamilton-Spritze mit den jeweiligen Proben à 10 µg Proteingehalt beladen. Zusätzlich wurde pro Gel mindestens eine Tasche jeweils mit 2 µl Magic Marker zu späteren Detektion der Proteingröße nach der Filmentwicklung und 10 µl Prestained-Marker zur Beobachtung des Fortschritts der Elektrophorese befüllt. Im Sammelgel wurde die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 90V, im Trenngel bei 110V durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf eine

PVDF-Membran geblottet (Burnette, 1981, Renart et al., 1979). Hierfür wurde das Gel auf die in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt und diese zwischen zwei in Semi-Dry-Puffer getränkte Whatman-Papiere blasenfrei in den Blotter gelegt.

Zur Detektion der Proteine müssen diese zunächst mit einem spezifischen Primärantikörper markiert werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf der Wippe in Starting Block T20 gelegt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C in 0,5% BSA-haltigem TBST auf die Membranen gegeben. Nach dreimaligem, zehnminütigem Waschen mit Waschpuffer wurden die Primärantikörper mit einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper markiert. Hierfür wurde der Sekundärantikörper in 0,5% BSA-haltigem TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Membranen belassen. Zur Detektion der vorliegenden Proteinmenge wurden die Membranen nach Anleitung des Herstellers für 1 Minute in LumiGlo gelegt und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt.

***Tabelle 13: Liste der für den Western-Blot verwendeten Antikörper***

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Host</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Mouse-IgG HRP	Cell Signaling	Pferd	1:3000
Anti-Rabbit-IgG HRP	Cell Signaling	Ziege	1:3000
β-Actin (3598-100)	BioVision	Maus	1:1000
p16INK4a (M-156)	Santa Cruz	Hase	1:1000

## 2.2.12 Quantitative PCR

Eine Methode zur Bestimmung der Transkriptionsrate eines bestimmten Zielgens ist die quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Hierzu wird die mRNA des gesuchten Zielgens in einem ersten Schritt durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben (Spiegelman et al., 1971). Dabei müssen jeweils die passenden Primer für die gesuchte mRNA Sequenz verwendet werden. In einem zweiten Schritt wird die cDNA dann durch die PCR vervielfältigt. Zur Quantifizierung wird der Gehalt des Zielgens im Verhältnis zu Housekeeping-Genen (Rip1-Tag2: *ACTB*, *HPRT*, *Eef1a1*; Rhabdomyosarkom: *Aldolase*, *TBP*) bestimmt. Die Messung erfolgt dabei in der exponentiellen Phase der PCR durch Einsatz von SYBR Green I zur Fluoreszenz-Messung, das unspezifisch in die doppelsträngige DNA eingebaut wird.

Für die RNA-Isolation und Aufreinigung wurde das NucleoSpin RNA II-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die in 6 Well Platten behandelten Tumorzellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in je 175 µl pro Well aus einem Gemisch von RL1 und TCEP (14 µl TCEP pro 350 µl RL1) auf Eis mit Hilfe einer Pipettenspitze abgekratzt. Die Aufreinigung der RNA über die NucleoSpin Säulen erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt. Hierfür wurde je Probe 5 µl des RNA-Eluats mit 70 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm sowie bei 280 nm gemessen, um die Ratio von  $A_{260}/A_{280}$  zu ermitteln. Je geringer die Proteinkontamination ist, desto näher sollte die Ratio bei einem Wert von 2,0 liegen.

Die RNA wurde mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kits in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde je Probe 16 µl der RNA mit 4 µl 5x Puffer und 1 µl iScript für 5 Minuten bei 25 °C und anschließend 30 Minuten bei 42 °C gehalten. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 5 Minuten gestoppt.

Zur quantitativen PCR wurde die cDNA 1:5 und die Primer 1:20 verdünnt und pro Well je 1 µl cDNA sowie 9 µl des Mastermixes (2 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Primer sense, 1 µl Primer antisense, 5 µl KAPA SYBR FAST) verwendet. Anschließend wurde die qPCR im LightCycler 480 nach dem in Tabelle 14 aufgeführten Protokoll durchgeführt.

**Tabelle 14: Protokoll für den PCR-Lauf bei der qRT-PCR**

**Temperatur / Dauer**

1. Vor-Inkubation: 95 °C für 5 Minuten
2. Amplifikation mit 45 Zyklen à: Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden  
 Annealing bei 60 °C für 10 Sekunden  
 Elongation bei 72° C für 10 Sekunden
3. Schmelzkurvenbestimmung: 95 °C für 10 Sekunden  
 65 °C für 1 Minuten  
 Erhitzen bis auf 95 °C
4. Proben kühlen auf 40 ° C

**Tabelle 15: PCR-Primer für die qRT-PCR. BP = Basenpaare des Produkts**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>BP</b>
<i>CDKN2a</i> (mouse)	TTG CCC ATC ATC ATC ACC T (sense) GGG TTT TCT TGG TGA AGT TCG (antisense)	146
<i>CDKN2a</i> (human)	GTG GAC CTG GCT GAG GAG (sense) CTT TCA ATC GGG GAT GTC TG (antisense)	132
<i>Slfn1</i> (mouse)	CGT GCT CAG TAG AGC AGC TTA G (sense) CAT CGG TGA TGT TCA TTT TCC (antisense)	
<i>HPRT</i> (mouse)	TCC TCC TCA GAC CGC TTT T (sense) CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC (antisense)	90
<i>ACTB</i> (mouse)	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG (sense) ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA (antisense)	104
<i>Eef1a1</i> (mouse)	ACA CGT AGA TTC CGG CAA GT (sense) AGG AGC CCT TTC CCA TCT C (antisense)	119

---

<i>Cxcl9</i> (human)	CTG CGA GAA AAT TGA AAT CAT TGC TA (sense) CTT TTG GCT GAC CTG TTT CTC C (antisense)	118
<i>ALDOA</i> (human)	GTG TTG TGG GCA TCA AGG TAG A (sense) CGA AGT CAG CTC CGT CCT TCT (antisense)	129
<i>TBP</i> (human)	CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT (sense) TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C (antisense)	89

### 2.2.13 Lentiviraler p16INK4a-Knockdown

Eine Methode zum Knockdown eines bestimmten Zielgens stellt die Verwendung von short hairpin (sh)RNA dar (Tiscornia et al., 2006, Tiscornia et al., 2003, Gupta et al., 2004). Diese lagert sich an die mRNA des Zielgens an, sodass diese nicht weiter transkribiert werden kann, was als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet wird (Svoboda et al., 2001). Um die gewünschte shRNA in den Zielzellen zu exprimieren, stehen diverse Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden zunächst Lentiviren der Firma Santa Cruz als shRNA-Vektoren verwendet. Diese beinhalteten entweder eine gegen p16INK4a gerichtete shRNA (Santa Cruz sc-36144-V) oder eine Kontrolle-shRNA (Santa Cruz sc-108080). Zur Selektion transduzierter Zellklone beinhalteten die Vektoren ferner eine Puromycin-Resistenz.

Für die Transduktion wurden die Zellen in 12 Well-Platten ausgesät, sodass sie nach 24 Stunden semikonfluent waren. Da die Interaktion der lentiviralen Partikel mit der Zellmembran durch Ladungen an der Zelloberfläche erschwert ist, wurde das Medium durch ein Medium mit 1 µg/ml Polybren ersetzt. Um die Transduktionseffizienz zu überprüfen, wurden parallel Green Fluorescent Protein (GFP)-kodierende RNA transduziert (Santa Cruz sc-108084). Je Bedingung wurden 3 Wells mit jeweils 50000 IFU (infectious units) infiziert. Da Polybren bei zu langem Zellkontakt toxisch ist, wurde das Medium nach 12 Stunden durch Standardmedium ersetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurde mit der Selektion stabiler Klone begonnen. Hierfür wurde Standardmedium mit Puromycin in einer Konzentration von 2,5 µg/ml verwendet. Das Puromycin-

haltige Medium muss nach 3-4 Tagen gewechselt werden. Wenn nur noch resistente Zellen verbleiben, können diese in Standardmedium vermehrt werden.

### 2.2.14 p16INK4a-Knockdown durch MSCV

Da die lentiviralen Partikel der Firma Santa Cruz für weitere Versuche nicht mehr bezogen werden konnten, wurde der p16INK4a Knockdown im Folgenden stattdessen mittels Transduktion mit Mouse Stem Cell Virus (MSCV) Partikeln durchgeführt, die freundlicherweise von Prof. Lars Zender (Medizinische Klinik) zur Verfügung gestellt wurden. Hierzu wurden die Zellen in 6 Well-Platten ausgesät. Mit der Transduktion wurde nach Ruhezeit von 72 Stunden begonnen. Um das Eindringen der viralen Vektoren zu erleichtern, wurde wie bei der lentiviralen Transduktion dem Medium 1 µg/ml Polybren beigemischt. Die Zellen wurden über eine Dauer von 12 Stunden mit MSCV Vektoren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA oder eine gegen p16Ink4a und p19ARF (sh-p16/p19) gerichtete shRNA enthielten. Die Selektion auf stabil transduzierte Klone erfolgte ebenfalls über eine Behandlung mit Puromycin (1 µg/ml, Sigma) und wurde 5 Tage nach der Transduktion begonnen. Die Anzahl der erfolgreich transduzierten Zellen wurde durch das Auszählen GFP-positiver Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Die Sequenzen der verwendeten shRNAs sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16: Sequenz der für den Knockdown benutzt shRNAs**

shRNA	Sequenz
sh-p16/p19	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGCTGGGTGCTCTTTGTGTTT AGTGAAGCCACAGATGTAAACACAAAGAGCACCCAGCGGAT GCCTACTGCCTCGGA
sh-Control	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGCCTGAAGTCTCTGATTAATA GTGAAGCCACAGATGTATTAATCAGAGACTTCAGGCGGTTGC CTACTGCCTCGGA

## 2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde Microsoft Excel verwendet. Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet. Die statistische Analyse zweier Gruppen erfolgte mittels des ungepaarten Student's T-Test.

Biologische n entsprechen der Anzahl an Mäusen, n in den Abbildungen entsprechen – wenn nicht anderweitig angegeben – den technischen Wiederholungen der einzelnen Messungen.

Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant gewertet und mit \* gekennzeichnet.



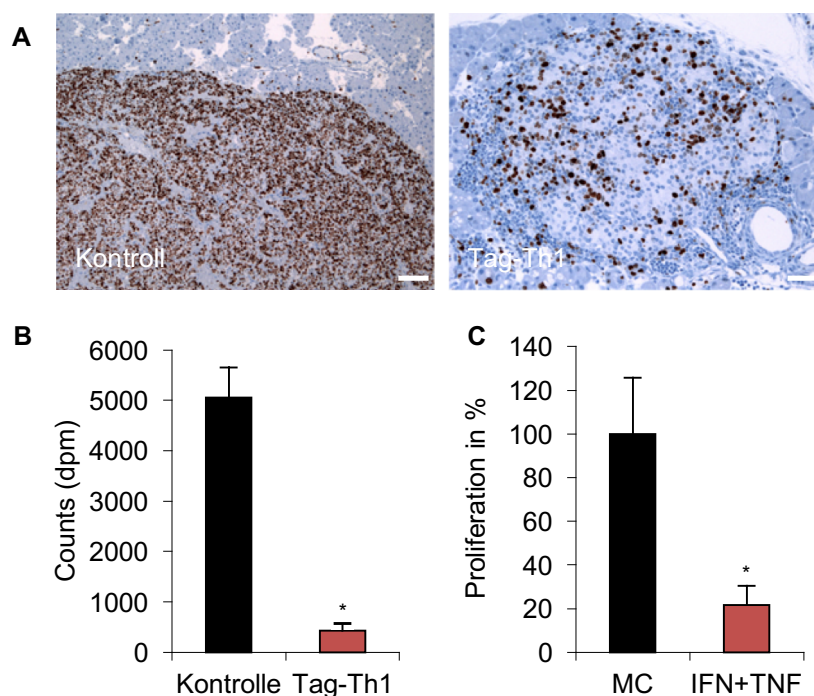
### 3. Ergebnisse

RIP1-Tag2 Mäuse entwickeln ab der 7. Woche Insulinome der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, da sie das T-Antigen des SV40 Virus spezifisch in den  $\beta$ -Zellen exprimieren (Hanahan, 1985). Hierdurch kommt es im Verlauf zu einer übermäßigen Produktion von Insulin, weshalb die Mäuse letztendlich etwa in der 15. Lebenswoche an einer Hypoglykämie versterben. Bei der Tumormuntherapie von RIP1-Tag2 Mäusen mit  $CD4^+$  Tag-spezifischen Th1 Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass es zu einer Verlängerung des Überlebens kommt (Braumüller et al., 2013, Müller-Hermelink et al., 2008). Dieser Therapieeffekt ging allerdings nicht mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus und dem völligen Fehlen von Insulin durch Zerstörung aller  $\beta$ -Zellen einher. Stattdessen blieben die Blutzuckerwerte zunächst über lange Zeit konstant und es kam zu keiner nennenswerten Apoptose oder Nekrose (Wieder et al., 2008). Zum einen beruht der Effekt auf einer Hemmung der Angiogenese. Darüber hinaus wird aber auch die Proliferation der Tumorzellen selbst reduziert (Müller-Hermelink et al., 2008). Die Induktion von Seneszenz, einem irreversiblen Wachstumsarrest, stellt einen möglichen Mechanismus zur Begrenzung des Tumorzellwachstums dar. In der vorliegenden Arbeit sollte nun im Detail untersucht werden, welchen Einfluss der Tumorsuppressor p16INK4a bei der Regulation des Tumorzellwachstums unter der Behandlung mit Th1 Zellen bzw. mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF hat. Eine vermehrte Expression von p16INK4a kann über den Rb/E2F-Signalweg zur Seneszenzinduktion führen (McConnell et al., 1999, Lukas et al., 1995). Ferner konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass der Rb/E2F-Signalweg im Gegensatz zum p53/p21 Seneszenzweg im RIP1-Tag2 Mausmodell noch eine Restaktivität besitzt (Casanovas et al., 2005).

### 3.1 Behandlung der RIP1-Tag2 Mäuse mit Tag-Th1 *in vivo*

#### 3.1.1 Beeinflussung der Tumorzellproliferation

Um den Effekt der Behandlung mit Tag-Th1 Zellen auf die Proliferation der  $\beta$ -Tumorzellen zu untersuchen, wurden RIP1-Tag2 Mäuse ab der 6. Woche entweder mit isotonischer Kochsalzlösung als Kontrolle oder mit wöchentlich 10 Millionen Tag-Th1 Zellen intraperitoneal behandelt. Vor und nach der sechswöchigen Behandlung wurden die Mäuse mit 2 Gy bestrahlt. Anschließend wurden Paraffinschnitte der Pankreata der 12 Wochen alten Kontroll- und Tag-Th1-behandelten Mäuse immunhistochemisch auf den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Unter der Tag-Th1 Behandlung kam es hierbei zu einer deutlichen Abnahme der Ki67-positiven, proliferierenden Zellen innerhalb der Tumore (Abbildung 2A).



**Abbildung 2: Proliferationsanalyse der Tumoren und  $\beta$ -Tumorzellen**

- A) IHC-Färbung auf den Proliferationsmarker Ki67 in Paraffinschnitten von Tumoren aus kontroll- oder Tag-Th1 behandelten RIP1-Tag2-Mäusen *in vivo*. Maßbalken = 50  $\mu$ m. Färbung durch B. Fehrenbacher durchgeführt.

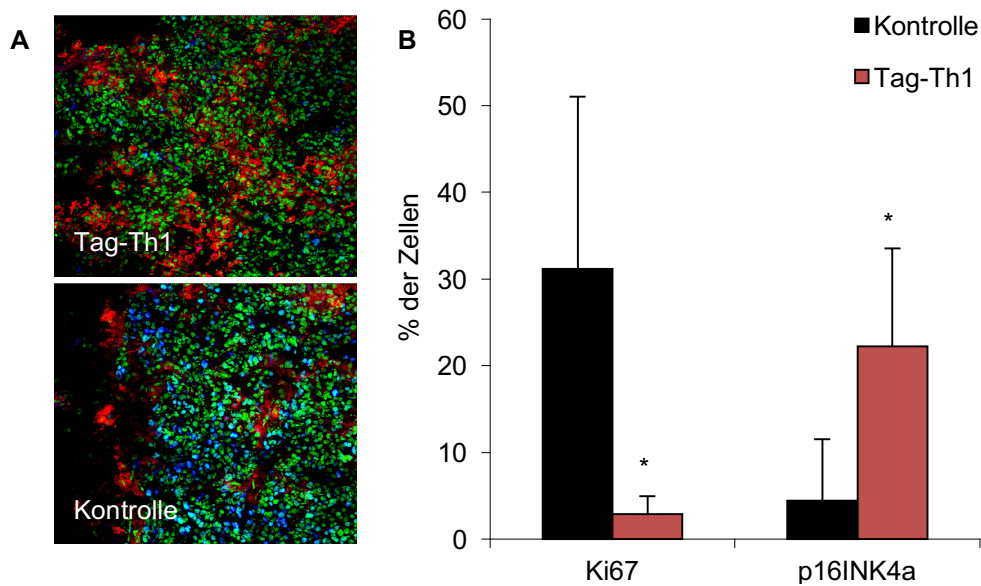
- B) <sup>3</sup>H-Thymidin Proliferationsanalyse von  $\beta$ -Tumorzellen aus kontroll- oder Tag-Th1 behandelten *ex vivo*. Werte sind gegeben als Counts (dpm). Mittelwert  $\pm$  SEM; n=6.
- C) BrdU Proliferationsanalyse von  $\beta$ -Tumorzellen nach Behandlung mit den Th1 Zytokinen IFN 100 ng/ml und TNF 10 ng/ml *in vitro* über 72 h. Mittelwert  $\pm$  SD; n=6. \*p<0,05.

Im Anschluss wurde die Proliferationsrate der  $\beta$ -Tumorzellen *ex vivo* mittels eines <sup>3</sup>H-Thymidin-Assays bestimmt. Dabei war diese in  $\beta$ -Tumorzellen aus Tag-Th1 behandelten RIP1-Tag2 Mäusen im Vergleich zu kontroll-behandelten Tieren deutlich vermindert (Abbildung 2B). Wurden  $\beta$ -Tumorzellen aus unbehandelten RIP1-Tag2 Mäusen isoliert und *in vitro* mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF behandelt, zeigten die Zellen ebenfalls ein stark reduziertes Proliferationsverhalten (Abbildung 2C).

### 3.1.2 Induktion des Zellzyklusinhibitors p16INK4a *in vivo*

Für die Seneszenzinduktion ist eine Arretierung des Zellzyklus in der G1/G0-Phase notwendig. Ein wichtiger Bestandteil des Rb-Signalwegs ist der Zellzyklusinhibitor p16INK4a, der die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK4) und damit die Phosphorylierung von Rb reduziert (Pavletich, 1999).

Um den Einfluss der Tag-Th1 Zellen *in vivo* auf die Regulation von p16INK4a zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen auf den Seneszenzmarker p16INK4a und den Proliferationsmarker Ki67 von Pankreata aus 12 Wochen alten kontroll- und Tag-Th1 behandelten RIP1-Tag2 Mäusen angefertigt.



**Abbildung 3: Induktion des Zellzyklusinhibitor p16INK4a in vivo**

- A) Immunfluoreszenzfärbung von Tumoren aus Kontroll- und Tag-Th1 behandelten RIP1-Tag2 Mäusen *in vivo* auf p16INK4a (rot) und Ki67 (blau), Kerne (YOPRO, grün). Maßbalken = 50  $\mu$ m. Färbung durch B. Fehrenbacher durchgeführt.
- B) Statistische Auswertung. Werte sind gegeben in % der Gesamtpopulation. Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5. \*, signifikant verschieden von der Kontrolle mit  $p < 0,05$ .

Unter der Behandlung mit Tag-Th1 Zellen *in vivo* zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von p16INK4a im Vergleich zur Kontrolle. Diese ging wie bereits immunhistochemisch gezeigt mit einer Abnahme der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 einher (Abbildung 3A, B).

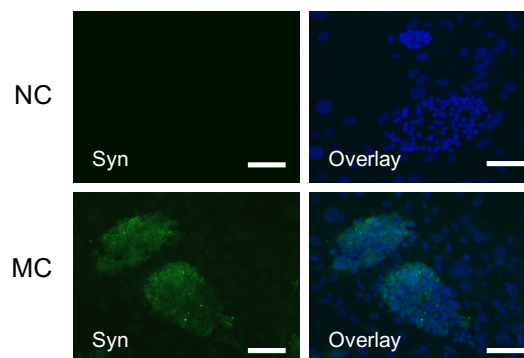
## 3.2 Untersuchung der Zytokinwirkung auf $\beta$ -Tumorzellen *in vitro*

### 3.2.1 Charakterisierung der $\beta$ -Tumorzellen

Um den direkten Einfluss der Behandlung mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF isoliert zu betrachten und im Detail zu untersuchen, wurden  $\beta$ -Tumorzellen aus 12 Wochen alten, unbehandelten RIP1-Tag2 Mäusen isoliert. Hierbei wurden

jedoch gemeinsam mit den  $\beta$ -Zellen auch noch weitere Zellen wie beispielsweise die Fibroblasten des Tumorstromas mit isoliert.

Da es sich bei  $\beta$ -Zellen um Zellen neuroendokrinen Ursprungs handelt, können sie durch eine Färbungen auf Synaptophysin als Marker neuroendokriner Zellen dargestellt werden (Wiedenmann et al., 1986). Hierzu wurden die  $\beta$ -Tumorzellen nach der dritten Passage auf Synaptophysin gefärbt und die Anzahl der Synaptophysin-positiven Zellen bestimmt.



**Abbildung 4: Charakterisierung der  $\beta$ -Tumorzellen**

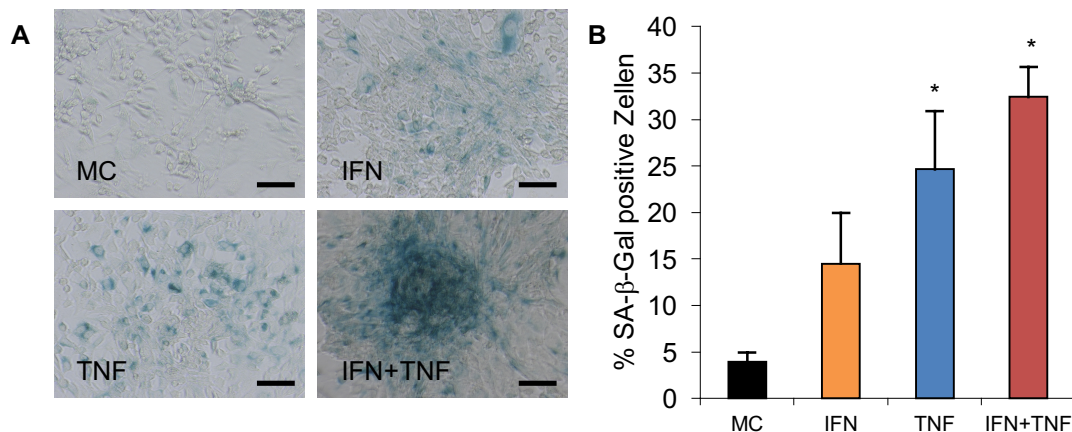
Exemplarische Immunfluoreszenzfärbung von  $\beta$ -Tumorzellen auf Synaptophysin (grün), Kerne (DAPI). Maßbalken = 50  $\mu$ m. Inkubation über 48h. NC = Negativkontrolle, MC = Mediumkontrolle.

Die Anzahl der Synaptophysin-positiven Zellen war variabel zwischen den jeweiligen Präparationen aus unterschiedlichen Mäusen und teilweise auch innerhalb der jeweiligen Versuchsbedingungen (Daten nicht gezeigt). Häufig gruppierten sich die Tumorzellen auch *in vitro* in einem inselförmigen Verband. Zudem ließen sich die  $\beta$ -Zellen auch anhand der Größe des Zellkerns von Fibroblasten unterscheiden. Es wurden für weitere Experimente nur  $\beta$ -Zellpräparationen verwendet, die eine Synaptophysinfärbung aufwiesen.

### 3.2.2 Induktion des Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Galaktosidase

Bei der Behandlung mit Tag-Th1 Zellen *in vivo* stand die Apoptose der Tumorzellen als antitumoraler Mechanismus nicht im Vordergrund. Stattdessen konnte eine vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p16INK4a unter Tag-Th1 Behandlung beobachtet werden. Ein Marker für seneszente Zellen ist die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). Um festzustellen, ob es unter dem Zytokineinfluss parallel zur Induktion von p16INK4a auch zu einer Zunahme an seneszenten, SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen kommt, wurden  $\beta$ -Tumorzellen *in vitro* mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der SA- $\beta$ -Gal bestimmt.

Unter der Behandlung mit IFN oder TNF zeigte sich eine deutlich verstärkte Expression von SA- $\beta$ -Gal in den  $\beta$ -Tumorzellen. Insbesondere bei einer gemeinsamen Behandlung mit beiden Th1 Zytokinen zeigte sich ein deutlicher Effekt auf die SA- $\beta$ -Gal Expression (Abbildung 5A, B).



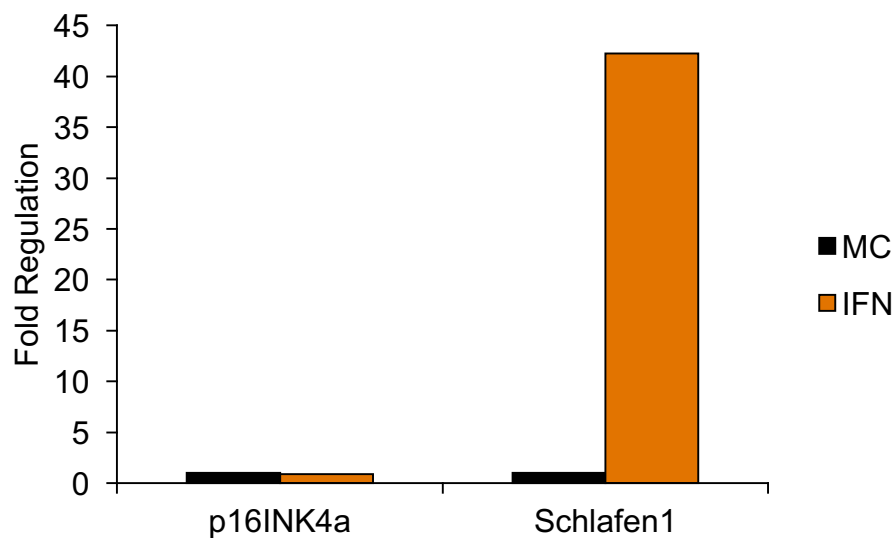
**Abbildung 5: Induktion des Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Gal**

- A) Mikroskop-Aufnahmen von  $\beta$ -Tumorzellen nach Zytokinbehandlung *in vitro* und Färbung auf den Seneszenzmarker SA- $\beta$ -Gal. IFN 100 ng/ml, TNF 10 ng/ml, IFN 10 ng/ml + TNF 10 ng/ml, Inkubation über 72h. Maßbalken = 50  $\mu$ m.
- B) Statistische Auswertung SA- $\beta$ -Gal positiver Zellen in % der Gesamtzellzahl. Mittelwert  $\pm$  SEM, n=4-7. \*, signifikant verschieden von der Kontrolle (MC) mit  $p < 0,05$

### 3.2.3 Regulation von p16INK4a *in vitro* unter Zytokinbehandlung

#### 3.2.3.1 Ermittlung der p16INK4a RNA-Expression mittels qPCR

Um den *in vivo* beobachteten Effekt der Tag-Th1 Zellen auf p16INK4a genauer zu untersuchen, wurden isolierte  $\beta$ -Tumorzellen *in vitro* über 4 Stunden mit IFN behandelt. Anschließend wurde mittels quantitativer PCR auf eine möglicherweise veränderte Transkriptionsrate von p16INK4a hin untersucht.



**Abbildung 6: RNA-Expression von p16INK4a**

Untersuchung der RNA-Expression von p16INK4a durch qPCR-Analyse nach 4 h Behandlung mit IFN. Schlafen1 als Kontrolle eines IFN-induzierbaren Gens. Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

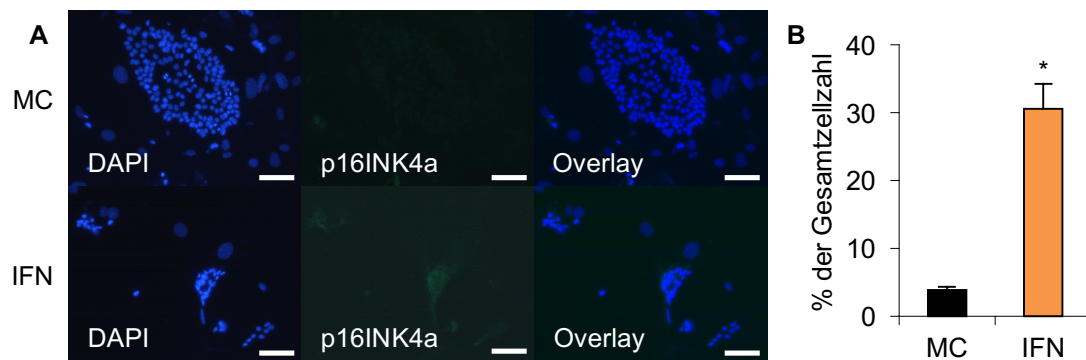
Hierbei zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit IFN keine wesentliche Regulation der mRNA-Expression von p16INK4a (*CKDN2a*) gibt. Als Positivkontrolle wurde Schlafen1 (*Sfn1*) als ein durch INF induzierbares Gen verwendet (Mavrommatis et al., 2013). Im Gegensatz zu p16INK4a wurde die Transkription von Schlafen1 durch die IFN Behandlung deutlich verstärkt (Abbildung 6).

### 3.2.3.2 Einfluss der Zytokine auf die Proteinexpression von p16INK4a

Obwohl *in vitro* kein Unterschied bei der Transkription von p16INK4a festgestellt werden konnte, war *in vivo* dennoch eine vermehrte Proteinexpression unter der Tag-Th1 Behandlung sichtbar. Eine mögliche Ursache hierfür könnte beispielsweise sein, dass die Änderung der Transkriptionsrate einer anderen Zeitkinetik unterliegt. Möglicherweise könnte es auch zu einer Stabilisierung bzw. einem verminderten Abbau von p16INK4a kommen.

Um zu testen ob der *in vivo* beobachtete Effekt auch unter der Zytokinbehandlung *in vitro* sichtbar ist, wurden  $\beta$ -Tumorzellen über 48 Stunden mit IFN behandelt. Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf p16INK4a angefertigt.

Auch *in vitro* konnte unter einer Behandlung mit IFN eine verstärkte Expression von p16INK4a in den  $\beta$ -Tumorzellen im Vergleich zu kontrollbehandelten Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 7A, B).



**Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung auf p16INK4a**

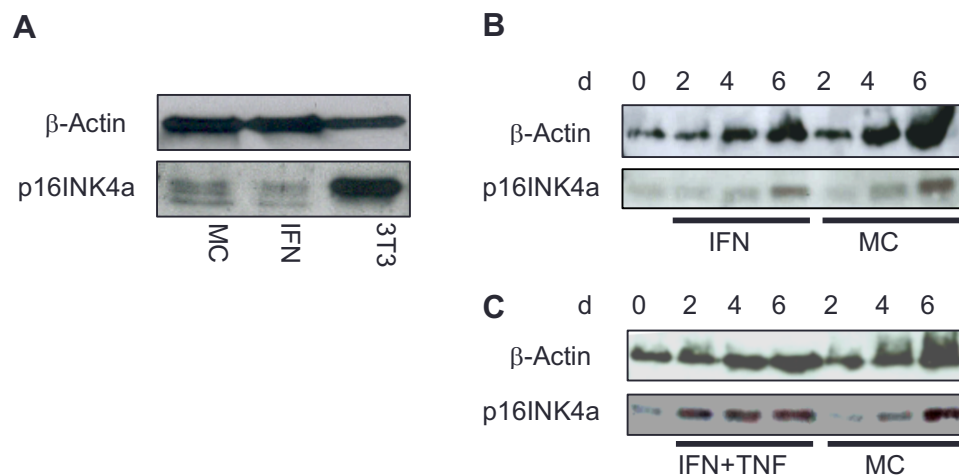
- A) Immunfluoreszenzfärbung auf p16INK4a *in vitro* nach 48 h Behandlung. p16INK4a (grün), Kerne (DAPI, blau). Maßbalken = 50  $\mu$ m.  
B) Statistische Auswertung. Anzahl der p16INK4a positiven Zellen in % der Gesamtzellzahl. Mittelwert  $\pm$  SEM, n=4.



Da die Änderung der Proteinexpression per Immunfluoreszenz nicht ausreichend genau dargestellt werden kann, wurde anschließend die Expression von p16INK4a nach Behandlung im Western Blot bestimmt.

Um p16INK4a im Western Blot nachweisen zu können, wurde zunächst ein Test des Antikörpers durchgeführt. Hierfür wurde ein Blot von bereits vorhandenen, mit IFN behandelten  $\beta$ -Tumorzellen als Probe sowie einem 3T3-Zellysate als Positivkontrolle verwendet. Anschließend wurden  $\beta$ -Tumorzellen über einen Zeitraum von 0 bis 6 Tagen mit IFN behandelt. Im Western Blot zeigte sich hierbei eine zeitabhängige Zunahme der p16INK4a-Expression sowohl in den IFN behandelten als auch in den kontrollbehandelten Tumorzellen. Da kontrollbehandelte Tumorzellen *in vitro* im Vergleich zu Zytokin-behandelten Tumorzellen deutlich schneller einen konfluenten Zustand erreichten, wird durch Kontaktinhibition das weitere Zellwachstum unterbunden. Hierdurch kommt es ebenfalls zu einer Zunahme der p16INK4a-Expression. Bei alleiniger Behandlung mit IFN ist deshalb kein Effekt der Behandlung auf die Expression von p16INK4a zu sehen (Abbildung 8B). Bei der kombinierten Behandlung mit IFN und TNF zeigten die kontrollbehandelten Tumorzellen zwar ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der p16INK4a-Expression, unter der Zytokinbehandlung kam es jedoch bereits nach 48 Stunden zu einer deutlichen Zunahme der p16INK4a-Expression (Abbildung 8C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die Behandlung mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF *in vitro* zu einer Zunahme der Expression des Zellzyklusinhibitors p16INK4a kommt. Dies geht einher mit einer Zunahme an Zellen, die positiv sind für den Seneszenzmarker SA- $\beta$ -Gal (Abbildung 5).



**Abbildung 8: Proteinexpression von p16INK4a im Western Blot**

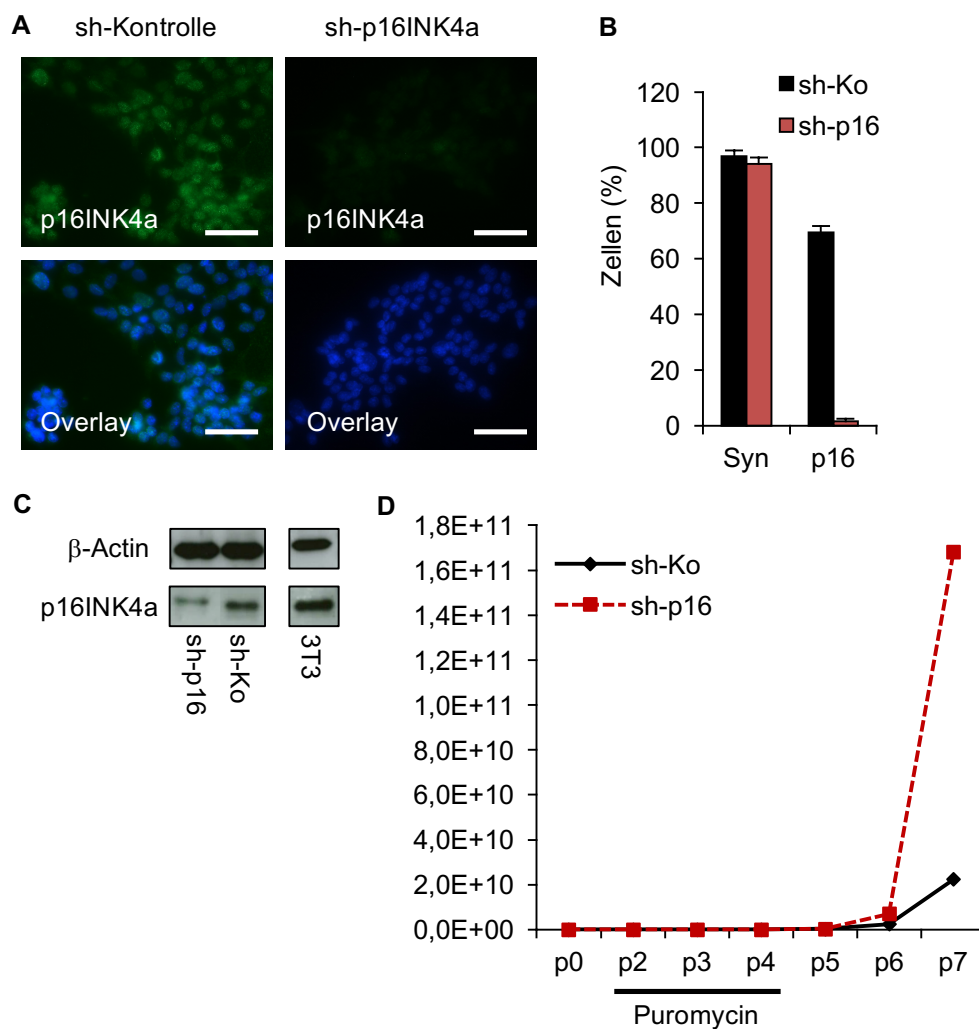
- A) p16INK4a-Antikörpertest von  $\beta$ -Tumorzellen nach Behandlung *in vitro* und 3T3-Zellen als Kontrolle.
- B) Detektion von p16INK4a im Western Blot in der Mediumkontrolle (MC) und nach Behandlung mit IFN über 2, 4 und 6 Tage.
- C) Western Blot auf p16INK4a von kontrollbehandelten  $\beta$ -Tumorzellen und nach kombinierter IFN und TNF Behandlung.

### 3.3 Funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Tumorzellproliferation

#### 3.3.1 p16INK4a-Knockdown durch lentivirale Transfektion

Um die funktionelle Rolle von p16INK4a und dessen Wirkung auf die zytokininduzierte Wachstumshemmung der  $\beta$ -Tumorzellen zu untersuchen, wurden  $\beta$ -Tumorzellen *in vitro* mit lentiviralen Partikeln transfiziert, die entweder gegen p16INK4a gerichtete shRNA oder Kontroll-shRNA enthielten. Um die Anzahl der transfizierten Zellen, in denen es zu einem shRNA-vermittelten Knockdown von p16INK4a kam, abschätzen zu können, wurden weitere  $\beta$ -Tumorzellen mit Green Fluorescent Protein(GFP)-codierender shRNA transfiziert. Anschließend wurde die Expression von p16INK4a in sh-p16INK4a- und sh-Kontroll-transfizierten  $\beta$ -Tumorzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot bestimmt. Hierbei zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung in einer Versuchsgruppe ein nahezu vollständiger Rückgang der p16INK4a-Expression (Abbildung 9A, B). Im sensitiveren Western Blot war die p16INK4a-

Expression in den sh-p16INK4a transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert (Abbildung 9C). Das Proliferationsverhalten der sh-p16INK4a transfizierten  $\beta$ -Tumorzellen war im Anschluss an die Transfektion im Vergleich zur kontrolltransfizierten Zellen deutlich verändert. Die sh-p16INK4a transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle ein stark beschleunigtes Wachstumsverhalten (Abbildung 9D), was auf eine Zellzyklus-hemmende Wirkung von p16INK4a in b-Tumorzellen hindeutet.



**Abbildung 9: p16INK4a Knockdown mittels lentiviraler Transfektion**

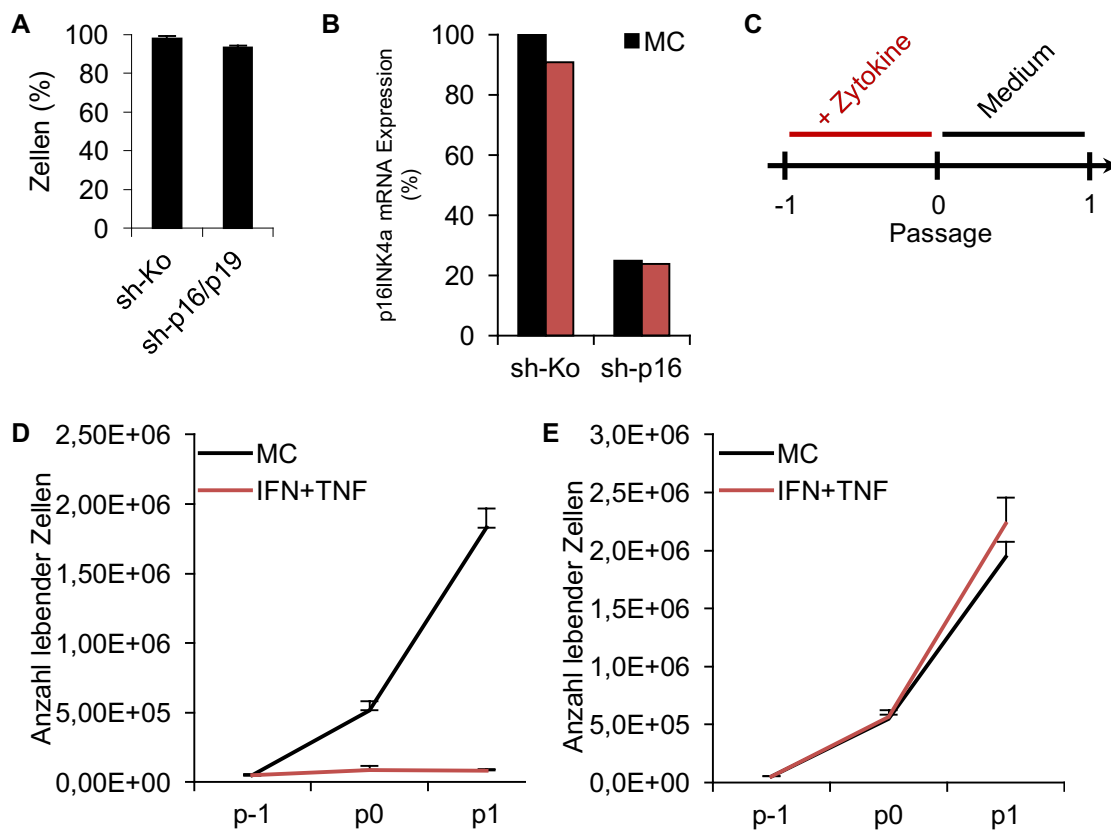
A) Immunfluoreszenzfärbung von  $\beta$ -Tumorzellen nach lentiviralem Knockdown von p16INK4a (sh-p16INK4a) und Kontroll-transfizierten Tumorzellen

- (sh-Ko) in vitro. Die Selektion stabiler Klone erfolgte durch Behandlung mit Puromycin. Maßbalken = 50  $\mu$ m.
- B) Statistische Auswertung der p16INK4a Expression in der Immunfluoreszenzfärbung. Synaptophysin (Syn), p16INK4a (p16). Werte sind gegeben in % der Gesamtpopulation. Mittelwert  $\pm$  SEM, n=3-4.
  - C) Detektion von p16INK4a im Western Blot der Kontroll-transfizierten und p16INK4a-Knockdown Zellen.
  - D) Wachstumskurve der Kontroll-transfizierten und p16INK4a-Knockdown Zellen. Bestimmung der absoluten Zellzahl durch Extrapolation. Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

### **3.3.2 p16INK4a-Knockdown durch Transfektion mit MSCV-Partikeln**

Da aufgrund eines Einfuhrverbots der lentiviralen Partikel keine weiteren Untersuchungen mit dem System der Firma Santa Cruz Biotechnology durchgeführt werden konnten, wurde für den weiteren Knockdown von p16INK4a ein Modell mit sh-p16INK4a in mouse stem cell virus Partikeln (MSCV) gewählt. Die Transfektion und Selektion stabiler Klone erfolgte wie bei der Transfektion mit den zuerst verwendeten lentiviralen Partikeln. sh-p16INK4a- und Kontroll-transfizierte Zellen exprimierten gleichzeitig GFP. Die Transfektionseffizienz betrug 93% für die sh-p16INK4a-transfizierten bzw. 97% für die Kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 10A). Um den Erfolg des Knockdowns zu verifizieren, wurde die Expression von p16INK4a-mRNA mittels qPCR bestimmt. Durch den Knockdown kam es dabei zu einer deutlichen Abnahme der RNA-Expression um ca. 75%. Die kombinierte Zytokinbehandlung mit IFN und TNF hatte keinen Einfluss auf die RNA-Expression von p16INK4a (Abbildung 10B).

Die transfizierten und selektierten  $\beta$ -Tumorzellen wurden dann nach dem in Abbildung 10C dargestellten Schema behandelt und erneut das Proliferationsverhalten der jeweiligen Gruppe im Anschluss an die Behandlung analysiert. Bei den Kontroll-transfizierten Zellen blieb dabei die Zellzahl im Anschluss an die Zytokinbehandlung nahezu konstant, ohne dass es zu einer erneuten Proliferation der Tumorzellen kam (Abbildung 10D). Im Vergleich dazu hatte die Zytokinbehandlung in Zellen mit verminderter p16INK4a Expression keinen Effekt und die Proliferation der sh-p16INK4a transfizierten Zellen konnte nicht gestoppt werden (Abbildung 10E).



**Abbildung 10: Transfektion mit MSCV**

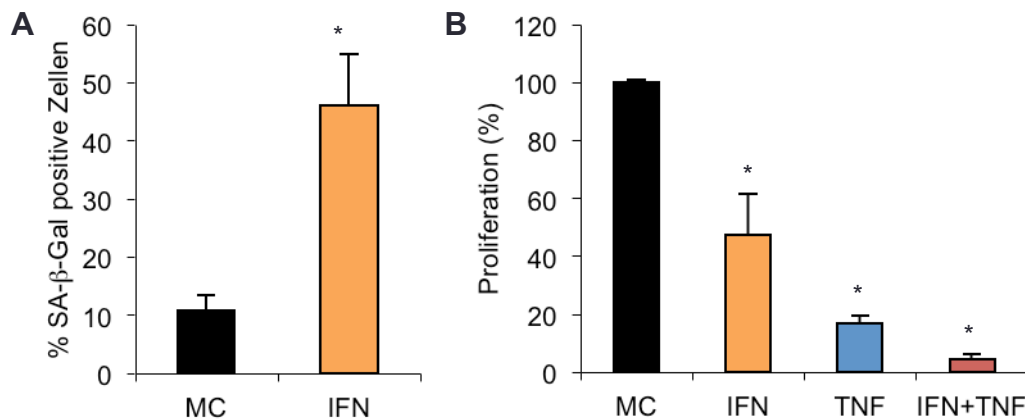
- A) Expression von GFP in Kontroll-transfizierten und p16INK4a/p19ARF-Knockdownzellen.
- B) RNA-Expression in Kontroll-transfizierten  $\beta$ -Tumorzellen und p16INK4a/p19ARF-Knockdownzellen  $\pm$  Zytokinbehandlung. Mittelwert aus zwei Bestimmungen. Das Experiment wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.
- C) Behandlungsschema nach Transfektion und Selektion stabiler Klone.
- D) Wachstumskurve der Kontroll-transfizierten  $\beta$ -Tumorzellen mit und ohne Zytokinbehandlung.
- E) Wachstumskurve der p16INK4a/p19ARF-Knockdownzellen mit und ohne Zytokinbehandlung. MW  $\pm$  SEM, n=3.

### 3.4 Bedeutung des p16INK4a-Rb-E2F-Signalwegs in humanen Rhabdomyosarkom-Zellen

#### 3.4.1 Wirkung der Th1 Zytokine auf die Seneszenzinduktion und Proliferation

Um zu untersuchen, ob sich eine zytokininduzierte Seneszenzinduktion und eine damit einhergehende geringere Proliferation auch bei anderen Tumoren

nachweisen lässt, wurden Tumorzellen der humanen Rhabdomyosarkomzelllinie A204 *in vitro* mit den Zytokinen IFN und TNF behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurde die SA- $\beta$ -Gal-Aktivität in den Tumorzellen gemessen. Zudem wurde die Änderung des Proliferationsverhaltens unter der Zytokinbehandlung mittels eines BrdU-Assays analysiert.



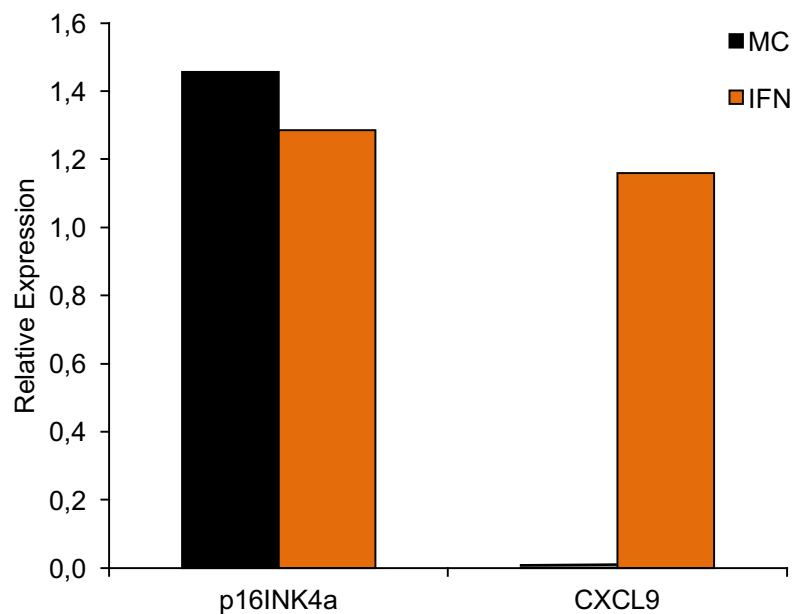
**Abbildung 11: Seneszenz und Proliferation in Rhabdomyosarkom-Zellen**

- A) SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen in der humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 nach Behandlung mit 100 ng/ml IFN *in vitro* über 8 Tage. MC=Mediumkontrolle. MW  $\pm$  SEM, n=6-8.
- B) BrdU-Proliferationsanalyse nach 72 h Zytokinbehandlung (100 ng/ml IFN; 10 ng/ml TNF) *in vitro*. MW  $\pm$  SEM, n=6.

Wurden Rhabdomyosarkomzellen mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF behandelt, zeigten sie ein ähnliches Verhalten wie  $\beta$ -Tumorzellen. Unter einer Behandlung mit IFN alleine kam es bereits zu einer signifikanten Zunahme der SA- $\beta$ -Gal positiven, seneszenten Zellen (Abbildung 11A). Auch die Doppelbehandlung mit IFN und TNF erhöhte die SA- $\beta$ -Gal Aktivität in ähnlicher Weise (Daten nicht gezeigt). Dies ging einher mit einer deutlichen Abnahme der Tumorzellproliferation (Abbildung 11B). Unter einer Einzelbehandlung mit TNF oder bei einer kombinierten Behandlung mit beiden Zytokinen war die Proliferation noch stärker reduziert, allerdings kam es durch TNF auch zu einem vermehrten Zelltod (Trypanblau-Färbung, Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 RNA-Expression von p16INK4a in Rhabdomyosarkom-Zellen

In  $\beta$ -Tumorzellen ließ sich keine wesentliche Änderung der Transkriptionsrate von p16INK4a nachweisen. Um eine mögliche Regulation der Transkription von p16INK4a in Rhabdomyosarkomzellen zu untersuchen, wurde eine quantitative PCR im Anschluss an die Behandlung mit IFN durchgeführt.



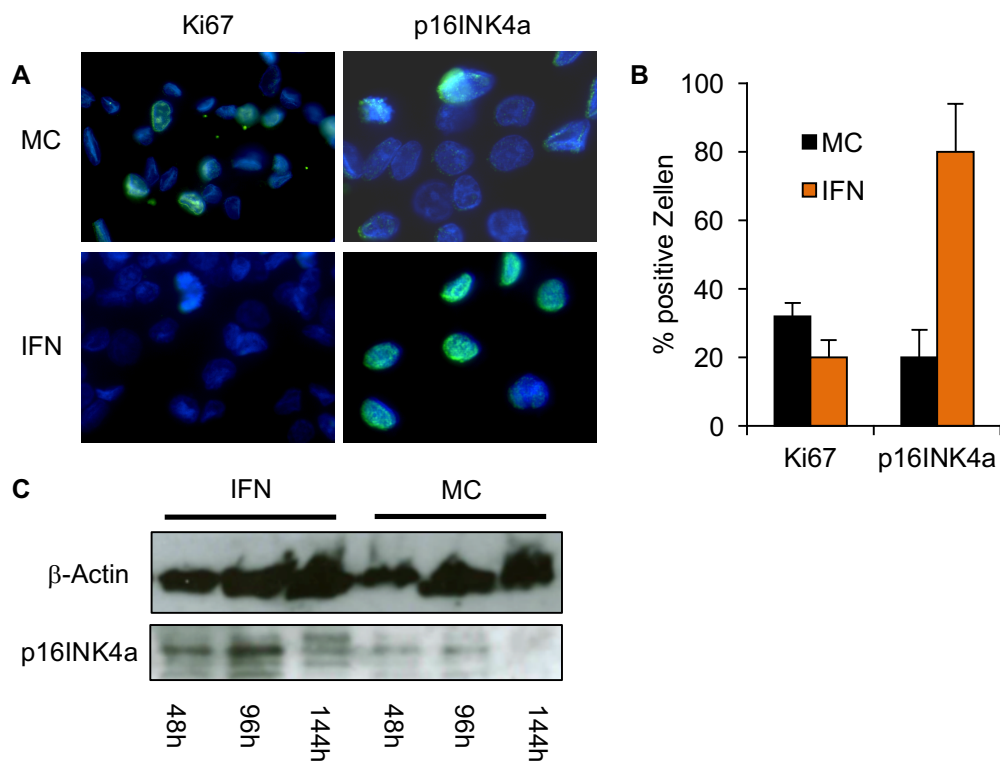
**Abbildung 12: p16INK4a RNA-Expression in Rhabdomyosarkom-Zellen**

RNA-Expressionsanalyse von p16INK4a in der Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 mittels qPCR nach 4h Behandlung *in vitro*. CXCL9 als Kontrolle. Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

Bei Rhabdomyosarkomzellen konnte unter IFN Behandlung ebenfalls keine Änderung der relativen Expression von p16INK4a analog zum RIP1-Tag2 Modell nachgewiesen werden, während die Expression von CXCL9 als IFN-induzierbarem Gen deutlich verstärkt war (Abbildung 12).

Bei  $\beta$ -Tumorzellen kam es unter der Zytokinbehandlung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer vermehrten Protein-Expression von p16INK4a bei ebenfalls unauffälliger Regulation der Transkription. Um festzustellen, ob humane

Rhabdomyosarkomzellen ähnlich auf die Behandlung reagieren und ob es auch hier zu einer Änderung der Expression von p16INK4a kommt, wurden die Rhabdomyosarkomzellen mit IFN behandelt und anschließend die p16INK4a Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot bestimmt.



**Abbildung 13: Proteinexpression von p16INK4a in Rhabdomyosarkom-Zellen**

- A) Immunfluoreszenzfärbung auf p16INK4a und Ki67 (jeweils grün) nach 48 h Behandlung der Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 in vitro, Kerne (DAPI, blau).  
 B) Statistische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung. Werte sind angegeben in % der Gesamtzellpopulation (MW ± SEM, n=4).  
 C) Detektion von p16INK4a im Western Blot nach Behandlung der Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 in vitro.

Nach 48 Stunden Behandlung mit IFN zeigte sich dabei eine Zunahme der p16INK4a positiven Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 13A, B). Diese Zunahme der Expression von p16INK4a in IFN behandelten Rhabdomyosarkomzellen konnte im Western Blot nach einer Behandlungsdauer von 48 bzw. 96 Stunden im Vergleich zur Mediumkontrolle bestätigt werden (Abbildung 13C).



Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es durch die Th1 Zytokine IFN und TNF im murinen RIP1-Tag2 Mausmodell zu einer Induktion des Zellzyklusinhibitors p16INK4a auf Proteinebene kommt. Durch die verstärkte Expression des Zellzyklusinhibitors p16INK4a wird die Proliferation der Tumorzellen vermutlich über den Rb/E2F-Signalweg gehemmt. Dies ging einher mit einer Zunahme an SA- $\beta$ -Gal positiven, seneszenten Tumorzellen. Wurde die Funktion von p16INK4a durch einen Knockdown gestört, konnte durch die Th1 Zytokine kein permanenter Wachstumsstopp mehr erzielt werden. Dieser Mechanismus scheint nicht nur auf die murinen  $\beta$ -Tumorzellen beschränkt zu sein, sondern konnte in ähnlicher Weise auch in Zellen der humanen Rhabdomyosarkomzelllinie A204 hervorgerufen werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Proliferationshemmung durch Th1 Zellen und deren Zytokine

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle des zu der INK4A Familie gehörenden Zellzyklusregulators p16INK4a (*CDKN2A*, *INK4a*) bei der Tumorthherapie mit Th1 Zellen bzw. den Th1 Zytokinen Interferon- $\gamma$  (IFN) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF) und seinen Einfluss auf die Zellzyklusregulation in Tumorzellen zu untersuchen.

Für beide Th1 Zytokine wurde in der Vergangenheit eine antitumorale Wirkung beschrieben. Bereits 1975 wurde über eine durch TNF induzierte Nekrose in Sarkomzellen berichtet (Carswell et al., 1975). Dieser Effekt von TNF wird beispielsweise therapeutisch bei der isolierten Extremitätenperfusion genutzt (Eggermont et al., 2003). Auch bei weiteren Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom konnte TNF eine antitumorale Wirkung zeigen (Creasey et al., 1986).

Eine Behandlung mit IFN kann das Zellwachstum verschiedener Zellarten hemmen, auch von soliden und hämatologischen Tumoren (Aune and Pogue, 1989, Denz et al., 1985, Kominsky et al., 1998, Ruemmele et al., 1998, van Valen et al., 1993, Palumbo et al., 1994). So kann durch IFN in Epithelzellen von Brustdrüsengewebe ein irreversibler Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase des Zellzyklus induziert werden, der mit einer verminderten Rb Phosphorylierung einhergeht (Harvat and Jetten, 1996). Ebenso besitzt IFN beim Melanom einen antiproliferativen Effekt auf die Tumorzellen durch eine verringerte Expression von Cyclin A und Cyclin E (Kortylewski et al., 2004, Garbe and Krasagakis, 1993). Daneben wurde bei weiteren Tumorentitäten wie dem Myelom oder Osteosarkom und auch bei Keratinozyten unter IFN eine verminderte Proliferation beobachtet (Jia and Kleinerman, 1991, Delvenne et al., 1995, Palumbo et al., 1994). Bei einem Defekt im IFN-Signalweg kann es stattdessen zu einer vermehrten spontanen Tumorentstehung, insbesondere bei

gleichzeitigem p53 Defekt kommen (Kaplan et al., 1998). Tumorzellen, die nicht mehr sensitiv gegenüber IFN sind, weisen im Vergleich zu IFN-sensiblen Tumorzellen ein stärkeres Wachstum auf (Ikeda et al., 2002). Die durch IFN verursachte Proliferationshemmung ist abhängig von STAT1, einem wichtigen Signalmolekül im Interferon-Signalweg, das bei Bindung von IFN durch die Janus-Kinasen (Jak)1 und Jak2 phosphoryliert wird (Bromberg et al., 1996).

Bei einer Kombination von IFN und TNF wurde über einen verstärkten Effekt der Wachstumsblockade berichtet (Fransen et al., 1986), ohne dass es zur Induktion von Apoptose kam (Ruemmele et al., 1998). In mehreren murinen Xenograft Tumormodellen konnte eine Kombinationstherapie von IFN und TNF das Tumorwachstum hemmen (Brouckaert et al., 1986, Balkwill et al., 1987, Jia and Kleinerman, 1991, Balkwill et al., 1986). Auch für Th1-Zellen selbst wurde wiederholt eine antitumorale Wirkung beschrieben (Bookman et al., 1987, Matsuzaki et al., 2015, Nishimura et al., 1999, Xie et al., 2010, Quezada et al., 2010). In der Literatur wurde T-Helferzellen in der Vergangenheit jedoch oft nur eine unterstützende Rolle zur Verstärkung der Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen zugeschrieben (Pardoll and Topalian, 1998). Dies liegt vor allem daran, dass CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen Antigene nur bei einer Präsentation über MHC Klasse II erkennen, das in soliden Tumoren selten exprimiert wird (Hadrup et al., 2013). Es gibt jedoch auch solide Tumoren wie das Melanom, bei dem konstitutiv MHC Klasse II exprimiert wird (Mendez et al., 2009). Außerdem kann es im Melanom oder auch in anderen Tumoren wie dem Mamma-Karzinom durch IFN zu einer Induktion von MHC Klasse II kommen. In diesen Tumoren konnten wiederum infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden werden, die Tumorantigene über MHC Klasse II erkennen (Robbins et al., 2002, Dadmarz et al., 1995). Auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas kann MHC Klasse II unter dem Einfluss von IFN exprimiert werden (Zhao et al., 2015). Im RIP1-Tag2 Modell konnte jedoch weder unter einer Tag-Th1-Behandlung noch unter einer Behandlung mit IFN und TNF *in*

*vitro* eine MHC Klasse II Expression der  $\beta$ -Tumorzellen beobachtet werden (Braumüller et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden zunächst RIP1-Tag2 Mäuse *in vivo* mit Tag-spezifischen Th1 Zellen behandelt. Entsprechend den oben beschriebenen Effekten von Th1 Zellen und deren Zytokinen IFN und TNF kam es auch im RIP1-Tag2 Mausmodell durch die Behandlung mit Tag-Th1-Zellen zu einer verringerten Anzahl an Ki67-positiven, proliferierenden Tumorzellen. Dieser Effekt konnte in einer <sup>3</sup>H-Thymidin Proliferationsanalyse von Tumorzellen *ex vivo* bestätigt werden, in der die Tumorzellen ebenfalls ein vermindertes Wachstum aufwiesen (Abbildung 2A, B). Im weiteren Verlauf wurden Tumorzellen aus RIP1-Tag2 Mäusen isoliert und *in vitro* mit IFN und TNF behandelt. Auch diese zeigten unter einer Zytokin-Behandlung mit IFN und TNF ein vermindertes Proliferationsverhalten (Abbildung 2C).

Es ist jedoch zu beachten, dass für beide Th1 Zytokine auch protumorale Effekte beschrieben worden sind. So wird durch IFN der Programmed Death Ligand (PD-L)1 vermehrt auf Tumorzellen exprimiert, wodurch die Immunantwort gegenüber Tumoren gehemmt wird. In einem murinen Ovarialkarzinommodell kann es durch die Depletion des IFN Rezeptors zu einer vermehrten Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommen, was mit einem längeren Überleben einhergeht (Abiko et al., 2015). Ebenso ist die Prognose einiger Tumoren, beispielsweise die von Lymphomen, bei erhöhten TNF-Spiegeln schlechter (Warzocha et al., 1997). Bereits durch die alleinige Exposition mit TNF über einen Zeitraum von 2 Wochen kann es in Nacktmäusen zur Tumorentstehung kommen (Balkwill and Mantovani, 2001). Ob IFN und TNF einen wachstumsfördernden Effekt auf einen Tumor ausüben, ist vermutlich von vielen verschiedenen Faktoren wie etwa der Dauer und dem Zeitpunkt der Exposition, der Konzentration der Zytokine oder der Tumorentität abhängig. Ein positiver Zusammenhang zwischen einem Behandlungserfolg und einem

funktionellen IFN-Signalweg wurde kürzlich für die CTLA4-Behandlung nachgewiesen (Gao et al., 2016).

## **4.2 p16INK4a und Seneszenzinduktion durch die Zytokinbehandlung**

Das Wachstum und die Differenzierung einer Zelle wird durch extrazelluläre Signale gesteuert. In der G1 Phase des Zellzyklus kann es entweder zu einem Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase oder zum Übergang in die Quieszenz (G0)-Phase kommen (Sherr, 1996). Ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen ist es, dass sie unabhängig vom Einfluss externer Signale proliferieren können (Sherr, 1996). Überschreitet der Zellzyklus einen Restriktionspunkt in der späten G1-Phase, kommt es zum automatischen Ablauf der Zellzyklusmaschinerie (Pardee, 1989, Sherr, 1994). Die Regulation der Zellzyklusprogression und der Überschreitung des Restriktionspunktes erfolgt wesentlich unter dem Einfluss der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und der Cycline A, D und E (Sherr, 1996). Durch den Komplex aus Cyclin D und seiner Bindungspartner CDK4 und CDK6 wird Rb phosphoryliert (Kato et al., 1993, Dowdy et al., 1993). Phosphoryliertes Rb kann die E2F Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden und die Expression von E2F Zielgenen führt zur Zellzyklusprogression (Sherr, 1994, Chellappan et al., 1991, Ewen et al., 1993).

Ein Inhibitor dieses Signalwegs ist der Tumorsuppressor p16INK4a. Durch Bindung an CDK4 hemmt p16INK4a die katalytische Aktivität des CDK4/Cyclin D Komplexes (Serrano et al., 1993). In Tumoren lassen sich häufig Defekte finden, durch die die Funktion von p16INK4a beeinträchtigt wird. Bei vielen Tumoren wie dem Melanom, Gliomen oder der akuten Leukämie kommt es zur Deletion oder Mutationen von p16INK4a (Nobori et al., 1994, Kamb et al., 1994, Kim and Sharpless, 2006). Außerdem wird die Expression von p16INK4a in

vielen Tumoren durch epigenetische Modifikationen wie der Hypermethylierung des Promotors beeinflusst (Esteller et al., 2001, Herman et al., 1995, Liew et al., 1999, Schutte et al., 1997, Toyota et al., 1999). Ein Verlust von p16INK4a führt zur spontanen Tumorentstehung in Mäusen und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Karzinogenen (Serrano et al., 1996). Neben p16INK4a kann es auch durch Mutationen von CDK4 zu einer Störung der p16INK4a Funktion kommen, wenn p16INK4a dadurch CDK4 nicht mehr binden kann (Wolfel et al., 1995). Wurden RIP1-Tag2-Mäuse *in vivo* mit Tag-Th1 behandelt, kam es zu einem deutlichen Anstieg der p16INK4a-positiven Zellen (Abb. 3). Auch bei der Behandlung von Tumorzellen *in vitro* mit den Th1 Zytokinen IFN und TNF konnte eine vermehrte Expression von p16INK4a beobachtet werden (Abbildung 7, Abbildung 8). Dabei scheint die Induktion von p16INK4a insbesondere unter dem gemeinsamen Einfluss von IFN und TNF am stärksten zu sein (Abbildung 8). Es konnte jedoch im Gegensatz zur Positivkontrolle Schlafen-1 keine vermehrte Transkription von p16INK4a gezeigt werden (Abbildung 6). Zu beachten ist außerdem, dass es auch bei der Mediumkontrolle zu einer Zunahme der Expression von p16INK4a kam (Abbildung 8). Ein ähnliches Verhalten wurde bereits in embryonalen Mausfibroblasten beobachtet, bei denen es alleine durch die Kultivierung zu einer vermehrten p16INK4a Expression kam (Zindy et al., 1997). Der Anstieg der p16INK4a Proteinexpression bei gleichzeitiger verminderter Tumorzellproliferation unter der Tag-Th1- oder Zytokinbehandlung mit IFN und TNF legt den Schluss nahe, dass die beobachtete antitumorale Wirkung unter anderem über eine Proliferationshemmung durch den Tumorsuppressor p16INK4a vermittelt wird.

Eine vermehrte Expression von p16INK4a ist ein wichtiges Merkmal seneszenten Zellen (Perez-Mancera et al., 2014, Alcorta et al., 1996). Die zelluläre Seneszenz bezeichnet einen permanenten Zellzyklusarrest, der erstmals 1961 von Hayflick und Moorhead beschrieben wurde (Hayflick and Moorhead, 1961). Neben der Quieszenz, einem vorübergehenden Zellzyklus-

arrest, und der Apoptose, stellt die Seneszenz einen möglichen anti-proliferativen, antitumoralen Regulationsmechanismus dar. Beispielhaft hierfür ist etwa die Seneszenzinduktion durch onkogenes Ras (Serrano et al., 1997). In Kultur weisen seneszente Zellen typische Veränderungen wie ein vergrößertes Zellvolumen und die Unfähigkeit zur DNA-Synthese auf (Dimri, 2005, Gil and Peters, 2006). Daneben lässt sich in seneszenten Zellen häufig die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) als Marker nachweisen (Dimri et al., 1995). *In vivo* konnte unter einer Behandlung mit Chemotherapeutika eine Seneszenzinduktion mit vermehrter Expression von p16INK4a und SA- $\beta$ -Gal beobachtet werden (te Poele et al., 2002). Auch in RIP1-Tag2 Tumorzellen kommt es unter der Behandlung mit den Th1-Zytokinen IFN und TNF zu einem Anstieg der SA- $\beta$ -Gal Expression (Abbildung 5). Die Behandlung der Tumorzellen mit IFN und TNF scheint demnach auch im RIP1-Tag2 Mausmodell zur Seneszenzinduktion zu führen.

Ein wichtiger Signalweg zur Induktion der Seneszenz ist der Rb/E2F-Signalweg (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Kommt es zu einer Störung der Funktion von Rb, kann eine Induktion von p16INK4a keinen Zellzyklusarrest mehr bewirken (Lukas et al., 1995). Das Large T-Antigen des SV40 Virus bindet und inaktiviert nicht nur p53, sondern führt auch zu einer Störung des Rb-Signalwegs (Colvin et al., 2014). Im RIP1-Tag2-Mausmodell besitzt Rb jedoch noch eine Restaktivität. Bei einem zusätzlichen Verlust von Rb nimmt die Aggressivität der Tumorzellen zu und führt zu einer erhöhten Tumormasse, einer vermehrten Metastasierung und einer schnelleren Proliferationsrate der Tumorzellen (Casanovas et al., 2005). Eine antitumorale Wirkung durch die Induktion von p16INK4a und der konsekutiven Aktivierung des Rb-Signalwegs scheint im RIP1-Tag2 Mausmodell demnach prinzipiell möglich zu sein.

### **4.3 Funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Zytokinbehandlung im RIP1-Tag2 Mausmodell**

Im weiteren Verlauf wurde die funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Th1-Zytokinbehandlung mit IFN und TNF untersucht. Eine Beeinträchtigung des Rb-Signalwegs durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p16INK4a kann in vielen Tumoren beobachtet werden (Romagosa et al., 2011). Deletionen des INK4a/ARF Lokus auf Chromosom 9 wurden in Tumoren wie dem Melanom, dem Glioblastom, dem pankreatischen Adenokarzinom, dem nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinom oder bei oropharyngealen Tumoren beobachtet (Sharpless, 2005). Beim familiär bedingten Melanom konnten wiederholt Missense Mutationen von p16INK4a gefunden werden (Liu et al., 1995, Kannengiesser et al., 2009). Ein Verlust von p16INK4a in Mäusen führt zu einer erhöhten Rate von spontanen oder karzinogeninduzierten Tumoren (Sharpless et al., 2001). Das Risiko für spontane oder karzinogeninduzierte Tumoren ist noch größer, wenn nicht nur p16INK4a, sondern auch p19ARF, das ebenfalls vom INK4a/ARF Lokus codiert wird, fehlen (Sharpless et al., 2004).

Um die Funktion von p16INK4a zu untersuchen, wurde in Tumorzellen *in vitro* entweder mittels lentiviraler Transfektion oder durch Transfektion mit MSCV-Partikeln ein selektiver Knockdown von p16INK4a erzielt. Ohne p16INK4a konnte ein deutlich gesteigertes Zellwachstum der Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 9). Eine ähnliche Korrelation zwischen der Expression von p16INK4a und dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen wurde beim Melanom gezeigt (Straume et al., 2000). Damit p16INK4a seine Funktion als Tumorsuppressor zur Begrenzung der Zellproliferation wahrnehmen kann, ist funktionell intaktes Rb nötig. Durch das SV40 Large T-Antigen wird im RIP1-Tag2 Mausmodell neben p53 auch die Funktion von Rb gestört. Wie Casanovas und Kollegen aber zeigen konnten, besitzt Rb noch eine Restaktivität und bei einem zusätzlichen Verlust von Rb kommt es zu einer verstärkten Tumorigenese (Casanovas et al., 2005).



Im weiteren Verlauf wurde schließlich das Wachstumsverhalten von Tumorzellen nach der Behandlung mit den Th1-Zytokinen IFN und TNF untersucht, in denen die p16INK4a Expression mittels Transfektion mit MSCV-Partikeln gehemmt wurde (Abbildung 10). Im Gegensatz zu Tumorzellen mit funktionell aktivem p16INK4a, bei denen das Tumorzellwachstum auch nach Beendigung der Zytokinbehandlung arretiert bleibt, zeigt die Zytokinbehandlung bei Zellen ohne p16INK4a Expression keine Wirkung mehr. Diese weisen im Anschluss an die Zytokinbehandlung im Vergleich zur Mediumkontrolle eine unverändert starke Proliferationsrate auf (Abbildung 10E). Die Behandlung der Tumorzellen mit den Th1-Zytokinen IFN und TNF scheint demnach einen stabilen Wachstumsarrest hervorzurufen, der durch p16INK4a vermittelt wird. Eine dem RIP1-Tag2 Modell vergleichbare Wirkung der Zytokinbehandlung konnte auch bei humanen Rhabdomyosarkomzellen beobachtet werden (Abbildungen 11-13).

Wie wichtig p16INK4a bei der Induktion und beim Erhalt der Seneszenz ist, konnte in der Vergangenheit wiederholt gezeigt werden. Eine Deletion von p16INK4a in intestinalen Epithelzellen hemmt die Seneszenzinduktion durch onkogenes Ras und führt zur Entstehung von invasiven, metastasierenden Tumoren (Bennecke et al., 2010). In bereits seneszenten Fibroblasten stabilisiert p16INK4a die Seneszenz. Wird viel p16INK4a exprimiert, kann durch eine zusätzliche Inaktivierung von p53 die Seneszenz nicht durchbrochen werden, wohingegen Zellen mit geringer p16INK4a Expression erneut proliferieren (Beausejour et al., 2003).

Die Auswirkung einer Überexpression von p16INK4a im RIP1-Tag2 Mausmodell wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt. Jedoch konnte in anderen Arbeiten eine positive Wirkung von p16INK4a auf die Kontrolle der Tumorzellen gezeigt werden. In humanen Tumorzelllinien, in denen p16INK4a mittels Lentiviren überexprimiert wurde, kam es zur Apoptose (Kim et al., 2000). Ebenso konnte in einem durch das Polyoma-middle-T-Antigen hervorgerufenen

murinen Mammakarzinommodell das Tumorwachstum durch die Expression von p16INK4a verlangsamt werden (Schreiber et al., 1999).

In nachfolgenden Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich bei dem durch die Tag-Th1-Therapie induzierten Wachstumsarrest tatsächlich um Seneszenz handelt und die Tumorzellen nicht erneut proliferieren. Nach Re-Implantation von Tumorzellen aus Kontroll- oder Tag-Th1-behandelten RIP1-Tag2 Mäusen in NOD-SCID Il2rg<sup>-/-</sup> Mäuse kam es auch nach 10 Wochen zu keinem erneuten Tumorwachstum (Braumüller et al., 2013).

#### **4.4 Mögliche Regulation von p16INK4a durch die Zytokinbehandlung**

Inwiefern es durch die Behandlung mit IFN und TNF zur Induktion der p16INK4a Expression kommt und dadurch die Tumorzellen in einen seneszenten Zustand übergehen, ist nicht geklärt. Eine Möglichkeit wie die Zytokinwirkung innerhalb der Tumorzellen vermittelt wird, ist über die Aktivierung von JunB aus der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren. Im p16INK4a Promotor befinden sich drei Bindungsstellen für AP-1 Transkriptionsfaktoren und für JunB konnte bereits eine p16INK4a vermittelte Hemmung des Zellwachstums nachgewiesen werden (Passegue and Wagner, 2000). Ferner wurde in  $\beta$ -Zellen des Pankreas eine Aktivierung von JunB unter dem Einfluss von IFN und TNF beschrieben (Gurzov et al., 2012). Erste Daten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass JunB auch im Rip1Tag2 Modell nach Zytokinbehandlung hochreguliert wird und somit eine Rolle bei der p16INK4a Induktion spielen könnte. Möglicherweise könnte auch eine Inflammationsbedingte Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur p16INK4a Induktion beitragen. So konnte in Endothelvorläuferzellen unter TNF eine p38-vermittelte Seneszenzinduktion beobachtet werden (Zhang et al., 2009). Auch bei anderen Formen der Seneszenz wie der Onkogen-induzierten Seneszenz oder der durch Doxorubicin verursachten Seneszenz kommt es über p38 zu einer

vermehrten p16INK4a Expression (Spallarossa et al., 2010, Iwasa et al., 2003, Kwong et al., 2009). Inwiefern dies beim RIP1-Tag2 Mausmodell ebenfalls der Fall ist, bedarf noch weiterer aufklärender Arbeiten.

## 5. Zusammenfassung

Spätestens seit der Zulassung der Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab bzw. Pembrolizumab und deren Erfolg bei der Behandlung des metastasierten Melanoms ist die Bedeutung der Tumorimmuntherapie enorm gestiegen (Hodi et al., 2016). Auch für Th1-Zellen ist wiederholt eine antitumorale Wirkung beschrieben worden (Shklovskaya et al., 2016, Xie et al., 2010, Hunder et al., 2008). Im RIP1-Tag2 Mausmodell konnten Müller-Hermelink et al. bereits eine deutliche Überlebensverlängerung durch eine Therapie mit Tag-spezifischen Th1-Zellen zeigen (Müller-Hermelink et al., 2008).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Tumorsuppressors p16INK4a bei der Immuntherapie mit Tag-spezifischen Th1-Zellen im RIP1-Tag2 Mausmodell zu untersuchen. Hierzu wurden RIP1-Tag2 Mäuse zunächst *in vivo* mit Tag-Th1 Zellen behandelt. Dies führte zu einer geringeren Anzahl an Ki67-positiven, proliferierenden Tumorzellen und ging mit einer Induktion von p16INK4a einher. Anschließend wurde der Effekt der Th1-Zytokine IFN und TNF auf  $\beta$ -Tumorzellen *in vitro* untersucht. Auch hier kam es unter dem Einfluss von IFN und TNF zu einer verringerten Proliferation der  $\beta$ -Tumorzellen und einer vermehrten Expression von p16INK4a. Eine vermehrte Transkription von p16INK4a (*CKDN2a*) konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die vermehrte Expression von p16INK4a ist ein Merkmal seneszenten Zellen (Alcorta et al., 1996). Durch Hemmung von CDK4 kann p16INK4a die Phosphorylierung von Rb unterbinden, die Bindung der E2F Transkriptionsfaktoren an Rb erhalten und dadurch einen Zellzyklusarrest bewirken (Lukas et al., 1995, Medema et al., 1995). Dass der Rb-Signalweg im RIP1-Tag2 Mausmodell weiterhin aktiv ist, konnte bereits durch Casanovas et al. gezeigt werden (Casanovas et al., 2005). Auch die Aktivität des Seneszenzmarkes SA- $\beta$ -Gal war in den  $\beta$ -Tumorzellen durch die IFN und TNF Behandlung verstärkt. Analog zu der in den murinen  $\beta$ -Tumorzellen beobachteten p16INK4a Induktion unter dem Einfluss von IFN und TNF kam es unter der Th1-Zytokintherapie auch in Zellen der

humanen Rhabdomyosarkomzelllinie A204 zu einer vermehrten p16INK4a Expression.

Um die funktionelle Rolle von p16INK4a bei der Induktion des Zellzyklusarrests durch die IFN und TNF Behandlung zu untersuchen, wurde ein Knockdown von p16INK4a mittels shRNA durchgeführt. Ohne funktionell aktives p16INK4a kam es einerseits zu einer deutlich beschleunigten Proliferation der  $\beta$ -Tumorzellen, andererseits konnte durch die Behandlung mit IFN und TNF kein Zellzyklusarrest mehr induziert werden.

Teile dieser Dissertation wurden in der Arbeit von Braumüller und Wieder et al. veröffentlicht. Im RIP1-Tag2 Modell scheint p16INK4a und die hierüber induzierte Tumorzellseneszenz demnach eine wesentliche Rolle bei der durch die Tag-Th1 Therapie erzielten Überlebensverlängerung zu spielen (Braumüller et al., 2013, Müller-Hermelink et al., 2008). Inwiefern es durch IFN und TNF zu einer vermehrten Expression von p16INK4a kommt, bedarf jedoch noch weiterer Forschung.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der mehrstufigen Karzinogenese im RIP1-Tag2 Mausmodell (modifiziert nach Hanahan und Folkman, 1996)	8
Abbildung 2: Proliferationsanalyse der Tumoren und $\beta$ -Tumorzellen	46
Abbildung 3: Induktion des Zellzyklusinhibitor p16INK4a in vivo	48
Abbildung 4: Charakterisierung der $\beta$ -Tumorzellen	49
Abbildung 5: Induktion des Seneszenzmarkers SA- $\beta$ -Gal	50
Abbildung 6: RNA-Expression von p16INK4a	51
Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung auf p16INK4a	52
Abbildung 8: Proteinexpression von p16INK4a im Western Blot	54
Abbildung 9: p16INK4a Knockdown mittels lentiviraler Transfektion	55
Abbildung 10: Transfektion mit MSCV	57
Abbildung 11: Seneszenz und Proliferation in Rhabdomyosarkom-Zellen	58
Abbildung 12: p16INK4a RNA-Expression in Rhabdomyosarkom-Zellen	59
Abbildung 13: Proteinexpression von p16INK4a in Rhabdomyosarkom-Zellen	60

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der für diese Arbeit verwendeten Geräte	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien und Kits	21
Tabelle 4: Rezepturen der Zellkulturmedien	24
Tabelle 5: Rezepturen für die Isolation der $\beta$ -Tumorzellen	25
Tabelle 6: PCR-Mastermix für die Genotypisierung	26
Tabelle 7: Protokoll für den PCR-Lauf der RIP1-Tag2-Genotypisierung	27
Tabelle 8: PCR-Primer zur Genotypisierung der RIP1-Tag2 Mäuse	27
Tabelle 9: Liste der für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper und DNA-Farbstoffe	33
Tabelle 10: Rezepturen, die für den Western-Blot verwendet wurden	36
Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele	38
Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels	38
Tabelle 13: Liste der für den Western-Blot verwendeten Antikörper	39
Tabelle 14: Protokoll für den PCR-Lauf bei der qRT-PCR	41
Tabelle 15: PCR-Primer für die qRT-PCR. BP = Basenpaare des Produkts	41
Tabelle 16: Sequenz der für den Knockdown benutzt shRNAs	43

## 8. Literaturverzeichnis

ABIKO, K., MATSUMURA, N., HAMANISHI, J., HORIKAWA, N., MURAKAMI, R., YAMAGUCHI, K., YOSHIOKA, Y., BABA, T., KONISHI, I. & MANDAI, M. 2015. IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*, 112, 1501-9.

ACOSTA, J. C., BANITO, A., WUESTEFELD, T., GEORGILIS, A., JANICH, P., MORTON, J. P., ATHINEOS, D., KANG, T. W., LASITSCHKA, F., ANDRULIS, M., PASCUAL, G., MORRIS, K. J., KHAN, S., JIN, H., DHARMALINGAM, G., SNIJDERS, A. P., CARROLL, T., CAPPER, D., PRITCHARD, C., INMAN, G. J., LONGERICH, T., SANSOM, O. J., BENITAH, S. A., ZENDER, L. & GIL, J. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*, 15, 978-90.

ACOSTA, J. C., O'LOGHLEN, A., BANITO, A., GUIJARRO, M. V., AUGERT, A., RAGUZ, S., FUMAGALLI, M., DA COSTA, M., BROWN, C., POPOV, N., TAKATSU, Y., MELAMED, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F., BERNARD, D., HERNANDO, E. & GIL, J. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133, 1006-18.

ALANI, R. M., YOUNG, A. Z. & SHIFFLETT, C. B. 2001. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7812-6.

ALCORTA, D. A., XIONG, Y., PHELPS, D., HANNON, G., BEACH, D. & BARRETT, J. C. 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13742-7.

ALIMONTI, A., NARDELLA, C., CHEN, Z., CLOHESSY, J. G., CARRACEDO, A., TROTMAN, L. C., CHENG, K., VARMEH, S., KOZMA, S. C., THOMAS, G., ROSIVATZ, E., WOSCHOLSKI, R., COGNETTI, F., SCHER, H. I. & PANDOLFI, P. P. 2010. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*, 120, 681-93.

ALPERT, S., HANAHAN, D. & TEITELMAN, G. 1988. Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell*, 53, 295-308.

ASCIERTO, P. A., CHIARION-SILENI, V., MUGGIANO, A., MANDALA, M., PIMPINELLI, N., DEL VECCHIO, M., RINALDI, G., SIMEONE, E. & QUEIROLO, P. 2014. Interferon alpha for the adjuvant treatment of melanoma: review of international literature and practical recommendations from an expert panel on the use of interferon. *J Chemother*, 26, 193-201.

ATKINS, M. B., LOTZE, M. T., DUTCHER, J. P., FISHER, R. I., WEISS, G., MARGOLIN, K., ABRAMS, J., SZNOL, M., PARKINSON, D., HAWKINS, M., PARADISE, C., KUNKEL, L. & ROSENBERG, S. A. 1999. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*, 17, 2105-16.

AUNE, T. M. & POGUE, S. L. 1989. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest*, 84, 863-75.



BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539-45.

BALKWILL, F., WATLING, D. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. 1978. Inhibition by lymphoblastoid interferon of growth of cells derived from the human breast. *Int J Cancer*, 22, 258-65.

BALKWILL, F. R., LEE, A., ALDAM, G., MOODIE, E., THOMAS, J. A., TAVERNIER, J. & FIERS, W. 1986. Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res*, 46, 3990-3.

BALKWILL, F. R., WARD, B. G., MOODIE, E. & FIERS, W. 1987. Therapeutic potential of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in experimental human ovarian cancer. *Cancer Res*, 47, 4755-8.

BEASLEY, R. P., HWANG, L. Y., LIN, C. C. & CHIEN, C. S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, 2, 1129-33.

BEAUSEJOUR, C. M., KRTOLICA, A., GALIMI, F., NARITA, M., LOWE, S. W., YASWEN, P. & CAMPISI, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*, 22, 4212-22.

BELL-MCGUINN, K. M., GARFALL, A. L., BOGYO, M., HANAHAAN, D. & JOYCE, J. A. 2007. Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer. *Cancer Res*, 67, 7378-85.

BENNECKE, M., KRIEGL, L., BAJBOUJ, M., RETZLAFF, K., ROBINE, S., JUNG, A., ARKAN, M. C., KIRCHNER, T. & GRETEN, F. R. 2010. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 18, 135-46.

BERGERS, G., HANAHAAN, D. & COUSSENS, L. M. 1998. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, 42, 995-1002.

BERGERS, G., SONG, S., MEYER-MORSE, N., BERGSLAND, E. & HANAHAAN, D. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 111, 1287-95.

BIDWELL, B. N., SLANEY, C. Y., WITHANA, N. P., FORSTER, S., CAO, Y., LOI, S., ANDREWS, D., MIKESKA, T., MANGAN, N. E., SAMARAJIWA, S. A., DE WEERD, N. A., GOULD, J., ARGANI, P., MOLLER, A., SMYTH, M. J., ANDERSON, R. L., HERTZOG, P. J. & PARKER, B. S. 2012. Silencing of *Irf7* pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat Med*, 18, 1224-31.

BLASCO, M. A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6, 611-22.

BODNAR, A. G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S. E., CHIU, C. P., MORIN, G. B., HARLEY, C. B., SHAY, J. W., LICHTSTEINER, S. & WRIGHT, W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349-52.

BOOKMAN, M. A., SWERDLOW, R. & MATIS, L. A. 1987. Adoptive chemoimmunotherapy of murine leukemia with helper T lymphocyte clones. *J Immunol*, 139, 3166-70.

BRAUMÜLLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., ASSMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M., HARING, H. U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. & RÖCKEN, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.

BRISSON, J., MORIN, C., FORTIER, M., ROY, M., BOUCHARD, C., LECLERC, J., CHRISTEN, A., GUIMONT, C., PENAUULT, F. & MEISELS, A. 1994. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol*, 140, 700-10.

BROMBERG, J. F., HORVATH, C. M., WEN, Z., SCHREIBER, R. D. & DARNELL, J. E., JR. 1996. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7673-8.

BROUCKAERT, P. G., LEROUX-ROELS, G. G., GUISEZ, Y., TAVERNIER, J. & FIERS, W. 1986. In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int J Cancer*, 38, 763-9.

BULAVIN, D. V., PHILLIPS, C., NANNENGA, B., TIMOFEEV, O., DONEHOWER, L. A., ANDERSON, C. W., APPELLA, E. & FORNACE, A. J., JR. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet*, 36, 343-50.

BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.

CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.

CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.

CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-70.

CASANOVAS, O., HAGER, J. H., CHUN, M. G. & HANAHAN, D. 2005. Incomplete inhibition of the Rb tumor suppressor pathway in the context of inactivated p53 is sufficient for pancreatic islet tumorigenesis. *Oncogene*, 24, 6597-604.

CHAN, F. K., ZHANG, J., CHENG, L., SHAPIRO, D. N. & WINOTO, A. 1995. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*, 15, 2682-8.

CHANG, M. H. 2009. Cancer prevention by vaccination against hepatitis B. *Recent Results Cancer Res*, 181, 85-94.

CHELLAPPAN, S. P., HIEBERT, S., MUDRYJ, M., HOROWITZ, J. M. & NEVINS, J. R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65, 1053-61.

CLEMENTE, C. G., MIHM, M. C., JR., BUFALINO, R., ZURRIDA, S., COLLINI, P. & CASCINELLI, N. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 77, 1303-10.

COBLEIGH, M. A., LANGMUIR, V. K., SLEDGE, G. W., MILLER, K. D., HANEY, L., NOVOTNY, W. F., REIMANN, J. D. & VASSEL, A. 2003. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, 30, 117-24.

COIFFIER, B., LEPAGE, E., BRIERE, J., HERBRECHT, R., TILLY, H., BOUABDALLAH, R., MOREL, P., VAN DEN NESTE, E., SALLES, G., GAULARD, P., REYES, F., LEDERLIN, P. & GISSELBRECHT, C. 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346, 235-42.

COLEY, W. B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.

COLLADO, M. & SERRANO, M. 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 10, 51-7.

COLVIN, E. K., WEIR, C., IKIN, R. J. & HUDSON, A. L. 2014. SV40 TAG mouse models of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 27, 61-73.

COPPE, J. P., DESPREZ, P. Y., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, 5, 99-118.

COPPE, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUNOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.

CREASEY, A. A., REYNOLDS, M. T. & LAIRD, W. 1986. Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res*, 46, 5687-90.

DADMARZ, R., SGAGIAS, M. K., ROSENBERG, S. A. & SCHWARTZENTRUBER, D. J. 1995. CD4+ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restricted fashion. *Cancer Immunol Immunother*, 40, 1-9.

DANNENBERG, A. J. & SUBBARAMAIAH, K. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell*, 4, 431-6.

DE LA SALMONIERE, P., GROB, J. J., DRENO, B., DELAUNAY, M. & CHASTANG, C. 2000. White blood cell count: a prognostic factor and possible subset indicator of optimal treatment with low-dose adjuvant interferon in primary melanoma. *Clin Cancer Res*, 6, 4713-8.

DE VISSER, K. E., EICHTEN, A. & COUSSENS, L. M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6, 24-37.

DEGREGORI, J., LEONE, G., MIRON, A., JAKOI, L. & NEVINS, J. R. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7245-50.

DELVENNE, P., AL-SALEH, W., GILLES, C., THIRY, A. & BONIVER, J. 1995. Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol*, 146, 589-98.

DENZ, H., LECHLEITNER, M., MARTH, C., DAXENBICHLER, G., GASTL, G. & BRAUNSTEINER, H. 1985. Effect of human recombinant alpha-2- and gamma-interferon on the growth of human cell lines from solid tumors and hematologic malignancies. *J Interferon Res*, 5, 147-57.

DI LEONARDO, A., LINKE, S. P., CLARKIN, K. & WAHL, G. M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, 8, 2540-51.

DIMRI, G. P. 2005. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, 7, 505-12.

DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.

DOWDY, S. F., HINDS, P. W., LOUIE, K., REED, S. I., ARNOLD, A. & WEINBERG, R. A. 1993. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73, 499-511.

DUDLEY, M. E., WUNDERLICH, J. R., SHELTON, T. E., EVEN, J. & ROSENBERG, S. A. 2003. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*, 26, 332-42.

DUDLEY, M. E., WUNDERLICH, J. R., YANG, J. C., HWU, P., SCHWARTZENTRUBER, D. J., TOPALIAN, S. L., SHERRY, R. M., MARINCOLA, F. M., LEITMAN, S. F., SEIPP, C. A., ROGERS-FREEZER, L., MORTON, K. E., NAHVI, A., MAVROUKAKIS, S. A., WHITE, D. E. & ROSENBERG, S. A. 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother*, 25, 243-51.

DUNN, G. P., KOEBEL, C. M. & SCHREIBER, R. D. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 6, 836-48.

DUNN, G. P., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 22, 329-60.

EGETER, O., MOCIKAT, R., GHORESCHI, K., DIECKMANN, A. & ROCKEN, M. 2000. Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res*, 60, 1515-20.

EGGERMONT, A. M., DE WILT, J. H. & TEN HAGEN, T. L. 2003. Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies. *Lancet Oncol*, 4, 429-37.

ERNSTOFF, M. S., FUSI, S. & KIRKWOOD, J. M. 1983. Parameters of interferon action: II. Immunological effects of recombinant leukocyte interferon (IFN-alpha 2) in phase I-II trials. *J Biol Response Mod*, 2, 540-7.

ESTELLER, M., CORN, P. G., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61, 3225-9.

EWEN, M. E., SLUSS, H. K., SHERR, C. J., MATSUSHIME, H., KATO, J. & LIVINGSTON, D. M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 73, 487-97.

FERRERI, A. J., ERNBERG, I. & COPIE-BERGMAN, C. 2009. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med*, 265, 421-38.

FRANSEN, L., VAN DER HEYDEN, J., RUYSSCHAERT, R. & FIERS, W. 1986. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22, 419-26.

GALLAGHER, B., WANG, Z., SCHYMURA, M. J., KAHN, A. & FORDYCE, E. J. 2001. Cancer incidence in New York State acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Epidemiol*, 154, 544-56.

GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGES, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P. H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W. H. & PAGES, F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313, 1960-4.

GAO, J., SHI, L. Z., ZHAO, H., CHEN, J., XIONG, L., HE, Q., CHEN, T., ROSZIK, J., BERNATCHEZ, C., WOODMAN, S. E., CHEN, P. L., HWU, P., ALLISON, J. P., FUTREAL, A., WARGO, J. A. & SHARMA, P. 2016. Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167, 397-404 e9.

GARBE, C. & KRASAGAKIS, K. 1993. Effects of interferons and cytokines on melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 100, 239S-244S.

GETTINGER, S. N., HORN, L., GANDHI, L., SPIGEL, D. R., ANTONIA, S. J., RIZVI, N. A., POWDERLY, J. D., HEIST, R. S., CARVAJAL, R. D., JACKMAN, D. M., SEQUIST, L. V., SMITH, D. C., LEMING, P., CARBONE, D. P., PINDER-SCHENCK, M. C., TOPALIAN, S. L., HODI, F. S., SOSMAN, J. A., SZNOL, M., MCDERMOTT, D. F., PARDOLL, D. M., SANKAR, V., AHLERS, C. M., SALVATI, M., WIGGINTON, J. M., HELLMANN, M. D., KOLLIA, G. D., GUPTA, A. K. & BRAHMER, J. R. 2015. Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 33, 2004-12.

GIL, J., BERNARD, D., MARTINEZ, D. & BEACH, D. 2004. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol*, 6, 67-72.

GIL, J. & PETERS, G. 2006. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 667-77.

GONCHOROFF, N. J., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & KATZMANN, J. A. 1985. A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. *Cytometry*, 6, 506-12.

GRATZNER, H. G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218, 474-5.

GREENBLATT, M. S., BEAUDET, J. G., GUMP, J. R., GODIN, K. S., TROMBLEY, L., KOH, J. & BOND, J. P. 2003. Detailed computational study of p53 and p16: using evolutionary sequence analysis and disease-associated mutations to predict the functional consequences of allelic variants. *Oncogene*, 22, 1150-63.

GRESSER, I., BELARDELLI, F., MAURY, C., MAUNOURY, M. T. & TOVEY, M. G. 1983. Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. *J Exp Med*, 158, 2095-107.

GUAN, K. L., JENKINS, C. W., LI, Y., NICHOLS, M. A., WU, X., O'KEEFE, C. L., MATERA, A. G. & XIONG, Y. 1994. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*, 8, 2939-52.

GUPTA, S., SCHOER, R. A., EGAN, J. E., HANNON, G. J. & MITTAL, V. 2004. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1927-32.

GURZOV, E. N., BARTHSON, J., MARHFOUR, I., ORTIS, F., NAAMANE, N., IGOILLO-ESTEVE, M., GYSEMANS, C., MATHIEU, C., KITAJIMA, S., MARCHETTI, P., ORNTOFT, T. F., BAKIRI, L., WAGNER, E. F. & EIZIRIK, D. L. 2012. Pancreatic beta-cells activate a JunB/ATF3-dependent survival pathway during inflammation. *Oncogene*, 31, 1723-32.

HADRUP, S., DONIA, M. & THOR STRATEN, P. 2013. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*, 6, 123-33.

HAKANSSON, A., GUSTAFSSON, B., KRYSANDER, L. & HAKANSSON, L. 1996. Tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic malignant melanoma and response to interferon alpha treatment. *Br J Cancer*, 74, 670-6.

HALL, M. & PETERS, G. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 68, 67-108.

HANAHAH, D. 1985. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315, 115-22.

HANAHAH, D. & FOLKMAN, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-64.

- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HANNON, G. J. & BEACH, D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371, 257-61.
- HARVAT, B. L. & JETTEN, A. M. 1996. Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma. *Cell Growth Differ*, 7, 289-300.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HERBIG, U., JOBLING, W. A., CHEN, B. P., CHEN, D. J. & SEDIVY, J. M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, 14, 501-13.
- HERMAN, J. G., MERLO, A., MAO, L., LAPIDUS, R. G., ISSA, J. P., DAVIDSON, N. E., SIDRANSKY, D. & BAYLIN, S. B. 1995. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, 55, 4525-30.
- HERR, H. W. & MORALES, A. 2008. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol*, 179, 53-6.
- HERZIG, M., NOVATCHKOVA, M. & CHRISTOFORI, G. 1999. An unexpected role for p53 in augmenting SV40 large T antigen-mediated tumorigenesis. *Biol Chem*, 380, 203-11.
- HILL, R., SONG, Y., CARDIFF, R. D. & VAN DYKE, T. 2005. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell*, 123, 1001-11.
- HIRAI, H., ROUSSEL, M. F., KATO, J. Y., ASHMUN, R. A. & SHERR, C. J. 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, 15, 2672-81.
- HODI, F. S., CHESNEY, J., PAVLICK, A. C., ROBERT, C., GROSSMANN, K. F., MCDERMOTT, D. F., LINETTE, G. P., MEYER, N., GIGUERE, J. K., AGARWALA, S. S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M. S., MINOR, D. R., SALAMA, A. K., TAYLOR, M. H., OTT, P. A., HORAK, C., GAGNIER, P., JIANG, J., WOLCHOK, J. D. & POSTOW, M. A. 2016. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17, 1558-1568.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.

HOENICKE, L. & ZENDER, L. 2012. Immune surveillance of senescent cells--biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, 33, 1123-6.

HUBACKOVA, S., KREJCIKOVA, K., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2012. IL1- and TGFbeta-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, 932-51.

HUBACKOVA, S., KUCEROVA, A., MICHLITS, G., KYJACOVA, L., REINIS, M., KOROLOV, O., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2016. IFNgamma induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGFbeta/SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. *Oncogene*, 35, 1236-49.

HUDIS, C. A. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357, 39-51.

HUNDER, N. N., WALLEN, H., CAO, J., HENDRICKS, D. W., REILLY, J. Z., RODMYRE, R., JUNGBLUTH, A., GNJATIC, S., THOMPSON, J. A. & YEE, C. 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 358, 2698-703.

IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 95-109.

IMADA, A., SHIJUBO, N., KOJIMA, H. & ABE, S. 2000. Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*, 15, 1087-93.

ITO, K., HIRAO, A., ARAI, F., TAKUBO, K., MATSUOKA, S., MIYAMOTO, K., OHMURA, M., NAKA, K., HOSOKAWA, K., IKEDA, Y. & SUDA, T. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 12, 446-51.

IWASA, H., HAN, J. & ISHIKAWA, F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*, 8, 131-44.

JACOBS, J. J., KEBLUSEK, P., ROBANUS-MAANDAG, E., KRISTEL, P., LINGBEEK, M., NEDERLOF, P. M., VAN WELSEME, T., VAN DE VIJVER, M. J., KOH, E. Y., DALEY, G. Q. & VAN LOHUIZEN, M. 2000. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet*, 26, 291-9.

JACOBS, J. J., KIEBOOM, K., MARINO, S., DEPINHO, R. A. & VAN LOHUIZEN, M. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 397, 164-8.

JANZEN, V., FORKERT, R., FLEMING, H. E., SAITO, Y., WARING, M. T., DOMBKOWSKI, D. M., CHENG, T., DEPINHO, R. A., SHARPLESS, N. E. & SCADDEN, D. T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443, 421-6.

JIA, S. F. & KLEINERMAN, E. S. 1991. Antitumor activity of TNF-alpha, IL-1, and IFN-gamma against three human osteosarcoma cell lines. *Lymphokine Cytokine Res*, 10, 281-4.



JIANG, P., STONE, S., WAGNER, R., WANG, S., DAYANANTH, P., KOZAK, C. A., WOLD, B. & KAMB, A. 1995. Comparative analysis of Homo sapiens and Mus musculus cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor genes p16 (MTS1) and p15 (MTS2). *J Mol Evol*, 41, 795-802.

KAMB, A., GRUIS, N. A., WEAVER-FELDHAUS, J., LIU, Q., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S. V., STOCKERT, E., DAY, R. S., 3RD, JOHNSON, B. E. & SKOLNICK, M. H. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264, 436-40.

KANG, T. W., YEVSIA, T., WOLLER, N., HOENICKE, L., WUESTEFELD, T., DAUCH, D., HOHMEYER, A., GEREKE, M., RUDALSKA, R., POTAPOVA, A., IKEN, M., VUCUR, M., WEISS, S., HEIKENWALDER, M., KHAN, S., GIL, J., BRUDER, D., MANNS, M., SCHIRMACHER, P., TACKE, F., OTT, M., LUEDDE, T., LONGERICH, T., KUBICKA, S. & ZENDER, L. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479, 547-51.

KANNENGIESSER, C., BROOKES, S., DEL ARROYO, A. G., PHAM, D., BOMBLED, J., BARROIS, M., MAUFFRET, O., AVRIL, M. F., CHOMPRET, A., LENOIR, G. M., SARASIN, A., FRENCH HEREDITARY MELANOMA STUDY, G., PETERS, G. & BRESSAC-DE PAILLERETS, B. 2009. Functional, structural, and genetic evaluation of 20 CDKN2A germ line mutations identified in melanoma-prone families or patients. *Hum Mutat*, 30, 564-74.

KAPLAN, D. H., SHANKARAN, V., DIGHE, A. S., STOCKERT, E., AGUET, M., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7556-61.

KATO, J., MATSUSHIME, H., HIEBERT, S. W., EWEN, M. E. & SHERR, C. J. 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*, 7, 331-42.

KHLEIF, S. N., DEGREGORI, J., YEE, C. L., OTTERSON, G. A., KAYE, F. J., NEVINS, J. R. & HOWLEY, P. M. 1996. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4350-4.

KIM, K. S., KANG, K. W., SEU, Y. B., BAEK, S. H. & KIM, J. R. 2009. Interferon-gamma induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mech Ageing Dev*, 130, 179-88.

KIM, M., KATAYOSE, Y., ROJANALA, L., SHAH, S., SGAGIAS, M., JANG, L., JUNG, Y. J., LEE, S. H., HWANG, S. G. & COWAN, K. H. 2000. Induction of apoptosis in p16INK4A mutant cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16INK4A protein. *Cell Death Differ*, 7, 706-11.

KIM, W. Y. & SHARPLESS, N. E. 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127, 265-75.

KIRKWOOD, J. M., STRAWDERMAN, M. H., ERNSTOFF, M. S., SMITH, T. J., BORDEN, E. C. & BLUM, R. H. 1996. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*, 14, 7-17.

KOMINSKY, S., JOHNSON, H. M., BRYAN, G., TANABE, T., HOBEIKA, A. C., SUBRAMANIAM, P. S. & TORRES, B. 1998. IFNgamma inhibition of cell growth in

glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene*, 17, 2973-9.

KORTYLEWSKI, M., KOMYOD, W., KAUFFMANN, M. E., BOSSERHOFF, A., HEINRICH, P. C. & BEHRMANN, I. 2004. Interferon-gamma-mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1-dependent and STAT1-independent signals. *J Invest Dermatol*, 122, 414-22.

KRISHNAMURTHY, J., RAMSEY, M. R., LIGON, K. L., TORRICE, C., KOH, A., BONNERWEIR, S. & SHARPLESS, N. E. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443, 453-7.

KRISHNAMURTHY, J., TORRICE, C., RAMSEY, M. R., KOVALEV, G. I., AL-REGAIEY, K., SU, L. & SHARPLESS, N. E. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 114, 1299-307.

KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*, 24, 2463-79.

KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L. C., DOUMA, S., VAN DOORN, R., DESMET, C. J., AARDEN, L. A., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133, 1019-31.

KUILMAN, T. & PEEPER, D. S. 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*, 9, 81-94.

KUNDER, S., CALZADA-WACK, J., HOLZLWIMMER, G., MULLER, J., KLOSS, C., HOWAT, W., SCHMIDT, J., HOFLE, H., WARREN, M. & QUINTANILLA-MARTINEZ, L. 2007. A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicol Pathol*, 35, 366-75.

KUNIEDA, T., MINAMINO, T., NISHI, J., TATENO, K., OYAMA, T., KATSUNO, T., MIYAUCHI, H., ORIMO, M., OKADA, S., TAKAMURA, M., NAGAI, T., KANEKO, S. & KOMURO, I. 2006. Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation*, 114, 953-60.

KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 20), 3613-22.

KWONG, J., HONG, L., LIAO, R., DENG, Q., HAN, J. & SUN, P. 2009. p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms. *J Biol Chem*, 284, 11237-46.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

LANFORD, R. E., WONG, C. & BUTEL, J. S. 1985. Differential ability of a T-antigen transport-defective mutant of simian virus 40 to transform primary and established rodent cells. *Mol Cell Biol*, 5, 1043-50.

LEEK, R. D., LEWIS, C. E., WHITEHOUSE, R., GREENALL, M., CLARKE, J. & HARRIS, A. L. 1996. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, 56, 4625-9.

LI, Y., NICHOLS, M. A., SHAY, J. W. & XIONG, Y. 1994. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*, 54, 6078-82.

LIEW, C. T., LI, H. M., LO, K. W., LEOW, C. K., CHAN, J. Y., HIN, L. Y., LAU, W. Y., LAI, P. B., LIM, B. K., HUANG, J., LEUNG, W. T., WU, S. & LEE, J. C. 1999. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 18, 789-95.

LIGGETT, W. H., JR. & SIDRANSKY, D. 1998. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, 16, 1197-206.

LIN, A. W., BARRADAS, M., STONE, J. C., VAN AELST, L., SERRANO, M. & LOWE, S. W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, 12, 3008-19.

LIU, L., LASSAM, N. J., SLINGERLAND, J. M., BAILEY, D., COLE, D., JENKINS, R. & HOGG, D. 1995. Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene*, 11, 405-12.

LIZEE, G., OVERWIJK, W. W., RADVANYI, L., GAO, J., SHARMA, P. & HWU, P. 2013. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med*, 64, 71-90.

LONDON, N. J., FARMERY, S. M., WILL, E. J., DAVISON, A. M. & LODGE, J. P. 1995. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet*, 346, 403-6.

LU, M., ZHANG, W., LI, Y., BERENZON, D., WANG, X., WANG, J., MASCARENHAS, J., XU, M. & HOFFMAN, R. 2010. Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. *Exp Hematol*, 38, 472-80.

LUDLOW, J. W. 1993. Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. *FASEB J*, 7, 866-71.

LUKAS, J., PARRY, D., AAGAARD, L., MANN, D. J., BARTKOVA, J., STRAUSS, M., PETERS, G. & BARTEK, J. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375, 503-6.

LUKAS, J., PETERSEN, B. O., HOLM, K., BARTEK, J. & HELIN, K. 1996. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, 16, 1047-57.

MAO, L., MERLO, A., BEDI, G., SHAPIRO, G. I., EDWARDS, C. D., ROLLINS, B. J. & SIDRANSKY, D. 1995. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res*, 55, 2995-7.

MARTIN-LIBERAL, J., KORDBACHEH, T. & LARKIN, J. 2015. Safety of pembrolizumab for the treatment of melanoma. *Expert Opin Drug Saf*, 14, 957-64.

MATHEU, A., PANTOJA, C., EFEYAN, A., CRIADO, L. M., MARTIN-CABALLERO, J., FLORES, J. M., KLATT, P. & SERRANO, M. 2004. Increased gene dosage of *Ink4a/Arf* results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev*, 18, 2736-46.

MATSUZAKI, J., TSUJI, T., LUESCHER, I. F., SHIKU, H., MINENO, J., OKAMOTO, S., OLD, L. J., SHRIKANT, P., GNJATIC, S. & ODUNSI, K. 2015. Direct tumor recognition by a human CD4(+) T-cell subset potently mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses. *Sci Rep*, 5, 14896.

MAVROMMATIS, E., FISH, E. N. & PLATANIAS, L. C. 2013. The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. *J Interferon Cytokine Res*, 33, 206-10.

MCCONNELL, B. B., GREGORY, F. J., STOTT, F. J., HARA, E. & PETERS, G. 1999. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 19, 1981-9.

MEDEMA, R. H., HERRERA, R. E., LAM, F. & WEINBERG, R. A. 1995. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6289-93.

MELK, A., SCHMIDT, B. M., TAKEUCHI, O., SAWITZKI, B., RAYNER, D. C. & HALLORAN, P. F. 2004. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int*, 65, 510-20.

MENDEZ, R., APTSIAURI, N., DEL CAMPO, A., MALENO, I., CABRERA, T., RUIZ-CABELLO, F., GARRIDO, F. & GARCIA-LORA, A. 2009. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother*, 58, 1507-15.

MEYERHARDT, J. A. & MAYER, R. J. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 352, 476-87.

MICHAEL, D. & OREN, M. 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol*, 13, 49-58.

MICHALOGLOU, C., VREDEVELD, L. C., SOENGAS, M. S., DENOYELLE, C., KUILMAN, T., VAN DER HORST, C. M., MAJOUR, D. M., SHAY, J. W., MOOI, W. J. & PEEPER, D. S. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436, 720-4.

MIETZ, J. A., UNGER, T., HUIBREGTSE, J. M. & HOWLEY, P. M. 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J*, 11, 5013-20.

MOLOFSKY, A. V., SLUTSKY, S. G., JOSEPH, N. M., HE, S., PARDAL, R., KRISHNAMURTHY, J., SHARPLESS, N. E. & MORRISON, S. J. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443, 448-52.

MÜLLER-HERMELINK, N., BRAUMÜLLER, H., PICHLER, B., WIEDER, T., MAILHAMMER, R., SCHAAK, K., GHORESCHI, K., YAZDI, A., HAUBNER, R., SANDER, C. A., MOCIKAT, R., SCHWAIGER, M., FORSTER, I., HUSS, R., WEBER, W. A., KNEILLING, M. & RÖCKEN, M.

2008. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*, 13, 507-18.

MUMBERG, D., MONACH, P. A., WANDERLING, S., PHILIP, M., TOLEDANO, A. Y., SCHREIBER, R. D. & SCHREIBER, H. 1999. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8633-8.

NAKAMURA, E., MEGUMI, Y., KOBAYASHI, T., KAMOTO, T., ISHITOYA, S., TERACHI, T., TACHIBANA, M., MATSUSHIRO, H., HABUCHI, T., KAKEHI, Y. & OGAWA, O. 2002. Genetic polymorphisms of the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with an increasing risk and a poor prognosis of sporadic renal cell carcinoma in a Japanese population. *Clin Cancer Res*, 8, 2620-5.

NARITA, M., NUNEZ, S., HEARD, E., NARITA, M., LIN, A. W., HEARN, S. A., SPECTOR, D. L., HANNON, G. J. & LOWE, S. W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113, 703-16.

NICKOLOFF, B. J., BEN-NERIAH, Y. & PIKARSKY, E. 2005. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J Invest Dermatol*, 124, x-xiv.

NISHIMURA, T., IWAKABE, K., SEKIMOTO, M., OHMI, Y., YAHATA, T., NAKUI, M., SATO, T., HABU, S., TASHIRO, H., SATO, M. & OHTA, A. 1999. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med*, 190, 617-27.

NOBORI, T., MIURA, K., WU, D. J., LOIS, A., TAKABAYASHI, K. & CARSON, D. A. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368, 753-6.

OHTANI, N., ZEBEDEE, Z., HUOT, T. J., STINSON, J. A., SUGIMOTO, M., OHASHI, Y., SHARROCKS, A. D., PETERS, G. & HARA, E. 2001. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, 409, 1067-70.

OKAMOTO, A., DEMETRICK, D. J., SPILLARE, E. A., HAGIWARA, K., HUSSAIN, S. P., BENNETT, W. P., FORRESTER, K., GERWIN, B., SERRANO, M., BEACH, D. H. & ET AL. 1994. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11045-9.

OTLEY, C. C. 2006. Non-Hodgkin lymphoma and skin cancer: A dangerous combination. *Australas J Dermatol*, 47, 231-6.

PAEZ-RIBES, M., ALLEN, E., HUDOCK, J., TAKEDA, T., OKUYAMA, H., VINALS, F., INOUE, M., BERGERS, G., HANAHAH, D. & CASANOVAS, O. 2009. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 15, 220-31.

PALUMBO, A., BATTAGLIO, S., NAPOLI, P., OMEDE, P., FUSARO, A., BRUNO, B., BOCCADORO, M. & PILERI, A. 1994. Recombinant interferon-gamma inhibits the in vitro proliferation of human myeloma cells. *Br J Haematol*, 86, 726-32.

PARDEE, A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246, 603-8.

PARDOLL, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.

PARDOLL, D. M. & TOPALIAN, S. L. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 10, 588-94.

PARKER, B. S., RAUTELA, J. & HERTZOG, P. J. 2016. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16, 131-44.

PARRINELLO, S., SAMPER, E., KRTOLICA, A., GOLDSTEIN, J., MELOV, S. & CAMPISI, J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 5, 741-7.

PASSEGUE, E. & WAGNER, E. F. 2000. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J*, 19, 2969-79.

PAVLETICH, N. P. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287, 821-8.

PEAKE, I. 1989. The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*, 42, 673-6.

PEREZ-MANCERA, P. A., YOUNG, A. R. & NARITA, M. 2014. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14, 547-58.

PIEPKORN, M. 2000. The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *J Am Acad Dermatol*, 42, 741-5.

PLATANIAS, L. C. 2013. Interferons and their antitumor properties. *J Interferon Cytokine Res*, 33, 143-4.

QUELLE, D. E., ZINDY, F., ASHMUN, R. A. & SHERR, C. J. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83, 993-1000.

QUEZADA, S. A., SIMPSON, T. R., PEGGS, K. S., MERGHOUB, T., VIDER, J., FAN, X., BLASBERG, R., YAGITA, H., MURANSKI, P., ANTONY, P. A., RESTIFO, N. P. & ALLISON, J. P. 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med*, 207, 637-50.

RACKE, M. K., BONOMO, A., SCOTT, D. E., CANNELLA, B., LEVINE, A., RAINE, C. S., SHEVACH, E. M. & ROCKEN, M. 1994. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med*, 180, 1961-6.

RECK, M., RODRIGUEZ-ABREU, D., ROBINSON, A. G., HUI, R., CSOSZI, T., FULOP, A., GOTTFRIED, M., PELED, N., TAFRESHI, A., CUFFE, S., O'BRIEN, M., RAO, S., HOTTA, K., LEIBY, M. A., LUBINIECKI, G. M., SHENTU, Y., RANGWALA, R., BRAHMER, J. R. & INVESTIGATORS, K.-. 2016. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 375, 1823-1833.

RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.

REUSCHENBACH, M., WATERBOER, T., WALLIN, K. L., EINENKEL, J., DILLNER, J., HANSIKOVA, E., ESCHENBACH, D., ZIMMER, H., HEILIG, B., KOPITZ, J., PAWLITA, M., DOEBERITZ, M. & WENTZENSEN, N. 2008. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int J Cancer*, 123, 2626-31.

ROBBINS, P. F., EL-GAMIL, M., LI, Y. F., ZENG, G., DUDLEY, M. & ROSENBERG, S. A. 2002. Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol*, 169, 6036-47.

ROBERT, C., SCHACHTER, J., LONG, G. V., ARANCE, A., GROB, J. J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M. S., MCNEIL, C., LOTEM, M., LARKIN, J., LORIGAN, P., NEYNS, B., BLANK, C. U., HAMID, O., MATEUS, C., SHAPIRA-FROMMER, R., KOSH, M., ZHOU, H., IBRAHIM, N., EBBINGHAUS, S., RIBAS, A. & INVESTIGATORS, K.-. 2015. Pembrolizumab versus ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521-32.

ROBLES, S. J. & ADAMI, G. R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 16, 1113-23.

RÖCKEN, M. 2010. Early tumor dissemination, but late metastasis: insights into tumor dormancy. *J Clin Invest*, 120, 1800-3.

ROMAGOSA, C., SIMONETTI, S., LOPEZ-VICENTE, L., MAZO, A., LLEONART, M. E., CASTELLVI, J. & RAMON Y CAJAL, S. 2011. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30, 2087-97.

RONINSON, I. B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*, 63, 2705-15.

RUAS, M. & PETERS, G. 1998. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378, F115-77.

RUEMMELE, F. M., GURBINDO, C., MANSOUR, A. M., MARCHAND, R., LEVY, E. & SEIDMAN, E. G. 1998. Effects of interferon gamma on growth, apoptosis, and MHC class II expression of immature rat intestinal crypt (IEC-6) cells. *J Cell Physiol*, 176, 120-6.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.

SCHREIBER, M., MULLER, W. J., SINGH, G. & GRAHAM, F. L. 1999. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene*, 18, 1663-76.

SCHUTTE, M., HRUBAN, R. H., GERADTS, J., MAYNARD, R., HILGERS, W., RABINDRAN, S. K., MOSKALUK, C. A., HAHN, S. A., SCHWARTE-WALDHOFF, I., SCHMIEGEL, W.,

BAYLIN, S. B., KERN, S. E. & HERMAN, J. G. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, 57, 3126-30.

SERRANO, M. 1997. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*, 237, 7-13.

SERRANO, M., GOMEZ-LAHOZ, E., DEPINHO, R. A., BEACH, D. & BAR-SAGI, D. 1995. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science*, 267, 249-52.

SERRANO, M., HANNON, G. J. & BEACH, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366, 704-7.

SERRANO, M., LEE, H., CHIN, L., CORDON-CARDO, C., BEACH, D. & DEPINHO, R. A. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, 85, 27-37.

SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.

SHARPLESS, N. E. 2005. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 576, 22-38.

SHARPLESS, N. E., BARDEESY, N., LEE, K. H., CARRASCO, D., CASTRILLON, D. H., AGUIRRE, A. J., WU, E. A., HORNER, J. W. & DEPINHO, R. A. 2001. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*, 413, 86-91.

SHARPLESS, N. E., RAMSEY, M. R., BALASUBRAMANIAN, P., CASTRILLON, D. H. & DEPINHO, R. A. 2004. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene*, 23, 379-85.

SHERR, C. J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79, 551-5.

SHERR, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-7.

SHERR, C. J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 731-7.

SHERR, C. J. & ROBERTS, J. M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9, 1149-63.

SHERWOOD, S. W., RUSH, D., ELLSWORTH, J. L. & SCHIMKE, R. T. 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9086-90.

SHKLOVSKAYA, E., TERRY, A. M., GUY, T. V., BUCKLEY, A., BOLTON, H. A., ZHU, E., HOLST, J. & FAZEKAS DE ST. GROTH, B. 2016. Tumour-specific CD4 T cells eradicate melanoma via indirect recognition of tumour-derived antigen. *Immunol Cell Biol*, 94, 593-603.



SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.

SPALLAROSSA, P., ALTIERI, P., BARISIONE, C., PASSALACQUA, M., ALOI, C., FUGAZZA, G., FRASSONI, F., PODESTA, M., CANEPA, M., GHIGLIOTTI, G. & BRUNELLI, C. 2010. p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells. *PLoS One*, 5, e15583.

SPEISER, D. E., MIRANDA, R., ZAKARIAN, A., BACHMANN, M. F., MCKALL-FAIENZA, K., ODERMATT, B., HANAHAN, D., ZINKERNAGEL, R. M. & OHASHI, P. S. 1997. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med*, 186, 645-53.

SPIEGELMAN, S., WATSON, K. F. & KACIAN, D. L. 1971. Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 2843-5.

STATISTISCHES BUNDESAMT 2017. Todesursachen in Deutschland 2015.

STEWART, S. A. & WEINBERG, R. A. 2006. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 531-57.

STRAUME, O., SVILAND, L. & AKSLEN, L. A. 2000. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*, 6, 1845-53.

SVOBODA, P., STEIN, P. & SCHULTZ, R. M. 2001. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 1099-104.

TE POELE, R. H., OKOROKOV, A. L., JARDINE, L., CUMMINGS, J. & JOEL, S. P. 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 62, 1876-83.

TISCORNIA, G., SINGER, O., IKAWA, M. & VERMA, I. M. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1844-8.

TISCORNIA, G., SINGER, O. & VERMA, I. M. 2006. Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs. *Nat Protoc*, 1, 234-40.

TOPALIAN, S. L., SZNOL, M., MCDERMOTT, D. F., KLUGER, H. M., CARVAJAL, R. D., SHARFMAN, W. H., BRAHMER, J. R., LAWRENCE, D. P., ATKINS, M. B., POWDERLY, J. D., LEMING, P. D., LIPSON, E. J., PUZANOV, I., SMITH, D. C., TAUBE, J. M., WIGGINTON, J. M., KOLLIA, G. D., GUPTA, A., PARDOLL, D. M., SOSMAN, J. A. & HODI, F. S. 2014. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol*, 32, 1020-30.

TOYOTA, M., AHUJA, N., OHE-TOYOTA, M., HERMAN, J. G., BAYLIN, S. B. & ISSA, J. P. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8681-6.

TRIANAFILLIDIS, J. K., NASIOULAS, G. & KOSMIDIS, P. A. 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*, 29, 2727-37.

VAN KRIEKINGE, G., CASTELLSAGUE, X., CIBULA, D. & DEMARTEAU, N. 2014. Estimation of the potential overall impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer cases and deaths. *Vaccine*, 32, 733-9.

VAN VALEN, F., WINKELMANN, W., BURDACH, S., GOBEL, U. & JURGENS, H. 1993. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce a synergistic antiproliferative response in human Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*, 119, 615-21.

WANG, S., ZHOU, M., LIN, F., LIU, D., HONG, W., LU, L., ZHU, Y. & XU, A. 2014. Interferon-gamma induces senescence in normal human melanocytes. *PLoS One*, 9, e93232.

WANG, Y., SCHULTE, B. A., LARUE, A. C., OGAWA, M. & ZHOU, D. 2006. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*, 107, 358-66.

WARZOCHA, K., SALLES, G., BIENVENU, J., BASTION, Y., DUMONTET, C., RENARD, N., NEIDHARDT-BERARD, E. M. & COIFFIER, B. 1997. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol*, 15, 499-508.

WEIDE, B., ZELBA, H., DERHOVANESEAN, E., PFLUGFELDER, A., EIGENTLER, T. K., DI GIACOMO, A. M., MAIO, M., AARNTZEN, E. H., DE VRIES, I. J., SUCKER, A., SCHADENDORF, D., BUTTNER, P., GARBE, C. & PAWELEC, G. 2012. Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol*, 30, 1835-41.

WEINBERG, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-30.

WIECHELMAN, K. J., BRAUN, R. D. & FITZPATRICK, J. D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-7.

WIEDENMANN, B., FRANKE, W. W., KUHN, C., MOLL, R. & GOULD, V. E. 1986. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 3500-4.

WIEDER, T., BRAUMÜLLER, H., KNEILLING, M., PICHLER, B. & RÖCKEN, M. 2008. T cell-mediated help against tumors. *Cell Cycle*, 7, 2974-7.

WILLIMSKY, G. & BLANKENSTEIN, T. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature*, 437, 141-6.

WOLFEL, T., HAUER, M., SCHNEIDER, J., SERRANO, M., WOLFEL, C., KLEHMANN-HIEB, E., DE PLAEN, E., HANKELN, T., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. & BEACH, D. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269, 1281-4.

WOLLINA, U. 2012. Cetuximab in non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 12, 949-56.

WONG, L. H., KRAUER, K. G., HATZINISIRIOU, I., ESTCOURT, M. J., HERSEY, P., TAM, N. D., EDMONDSON, S., DEVENISH, R. J. & RALPH, S. J. 1997. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*, 272, 28779-85.

WOTHERSPOON, A. C., DOGLIONI, C., DISS, T. C., PAN, L., MOSCHINI, A., DE BONI, M. & ISAACSON, P. G. 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, 342, 575-7.

WU, R., FORGET, M. A., CHACON, J., BERNATCHEZ, C., HAYMAKER, C., CHEN, J. Q., HWU, P. & RADVANYI, L. G. 2012. Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J*, 18, 160-75.

XIE, Y., AKPINARLI, A., MARIS, C., HIPKISS, E. L., LANE, M., KWON, E. K., MURANSKI, P., RESTIFO, N. P. & ANTONY, P. A. 2010. Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J Exp Med*, 207, 651-67.

ZHANG, Y., HERBERT, B. S., RAJASHEKHAR, G., INGRAM, D. A., YODER, M. C., CLAUSS, M. & REHMAN, J. 2009. Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J*, 23, 1358-65.

ZHAO, Y., SCOTT, N. A., QUAH, H. S., KRISHNAMURTHY, B., BOND, F., LOUDOVARIS, T., MANNERING, S. I., KAY, T. W. & THOMAS, H. E. 2015. Mouse pancreatic beta cells express MHC class II and stimulate CD4(+) T cells to proliferate. *Eur J Immunol*, 45, 2494-503.

ZHU, J., WOODS, D., MCMAHON, M. & BISHOP, J. M. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev*, 12, 2997-3007.

ZINDY, F., QUELLE, D. E., ROUSSEL, M. F. & SHERR, C. J. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 15, 203-11.

## 9. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in den Laboren der Universitäts-Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wieder und Frau Dr. Heidi Braumüller angefertigt. Die Gesamtkonzeption erfolgte unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Martin Röcken.

Die Tierhaltung, Genotypisierung und Behandlung mit Tag-Th1 Zellen *in vivo* wurde in Teilen durch mich, vorwiegend jedoch durch Dr. Heidi Braumüller, Ellen Brenner und Michelle Dierstein (MTA) durchgeführt.

Die Anfertigung und Färbung von Paraffinschnitten sowie Kryoschnitten von Pankreata aus Tag-Th1 behandelten Rip1-Tag2 Mäusen wurde durch Birgit Fehrenbacher und Dr. Heidi Braumüller durchgeführt.

Die qRT-PCR erfolgte mit Unterstützung von Ellen Brenner und Susanne Weidemann (MTA).

Alle weiteren Methoden und Versuche wie die Tumorisolierung, die Kultivierung der Tumorzellen, die Proliferationsassays mittels 3H-Thymidin und BrdU, die Immunfluoreszenzfärbungen *in vitro*, der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay, das Anfertigen von Western-Blots und der Knockdown von p16INK4a wurden nach Einarbeitung durch Dr. Heidi Braumüller und Prof. Dr. Thomas Wieder eigenständig von mir durchgeführt, teilweise mit Unterstützung durch Michelle Dierstein. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich selbst.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nach Anleitung durch Prof. Dr. Thomas Wieder selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Tübingen, den 15.09.2017

## 10. Veröffentlichung

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

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., Van den Broek, M., Häring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K. & Röcken, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.

## 11. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Martin Röcken für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Laboren der Universitäts-Hautklinik angefertigt haben zu dürfen und durch dessen Begeisterungsfähigkeit für die Tumorummunologie ich erst auf dieses Dissertationsthema gestoßen bin.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt außerdem meinem Doktorvater Prof. Thomas Wieder sowie Frau Dr. Heidi Braumüller, in deren Arbeitsgruppe man von Beginn an hervorragend und in einer familiären Art und Weise betreut wurde und durch die ich alle nötigen Fähigkeiten zur Anfertigung dieser Arbeit erlernen konnte. Dabei gilt ein großer Dank auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, vor allem Ellen Brenner, Michelle Dierstein, Susanne Weidemann und Viola Galinat.

Auch bei Christina Braunsdorf und Daniela Mailänder-Sanchez möchte ich mich für die immer sehr hilfsbereite und freundliche Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

Ein großes Dankschön gilt ebenfalls dem IZKF-Promotionskolleg, das mir ermöglicht hat, mich vollständig auf die Anfertigung dieser Dissertation zu konzentrieren und in dessen Rahmen ich viele weitere interessante Perspektiven der wissenschaftlichen Tätigkeit wie etwa einem Kongressaufenthalt beim ESDR in Barcelona kennenlernen durfte.