

AUS DEM ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK,
ABTEILUNG FÜR GASTROENTEROLOGIE, ENDOKRINOLOGIE UND STOFFWECHSELKRANKHEITEN
DIREKTOR: PROF. DR. MED. HABIL. GEORG LAMPRECHT

FORSCHUNGLABOR FÜR GASTROENTEROLOGIE
LEITER: PROF. DR. MED. HABIL. ROBERT JASTER

MODULATION ZELLULÄRER SENESZENZ DURCH ETOPOSID UND NAVITOCCLAX: STUDIEN AN MURINEN PANKREASKARZINOMZELLEN

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
CAMILLA VERONICA UMSTÄTTER | GEB. AM 16.06.1998 IN BERLIN
ROSTOCK | FEBRUAR 2025
https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005513

GutachterInnen:

Prof. Dr. Robert Jaster

Universitätsmedizin Rostock

Klinik für Innere Medizin – Forschungslabor für Gastroenterologie

Prof. Dr. Ivonne Regel

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Medizinische Tumorummunologie

PD Dr. Claudia Maletzki

Universitätsmedizin Rostock

Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

für Edda

INHALTSVERZEICHNIS

I. Stand der Forschung	1
1.1 Das Pankreas	1
1.2 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2.1 Epidemiologie	1
1.2.2 Ätiologie.....	2
1.2.3 Pathogenese	3
1.2.4 Klinik und Diagnostik	3
1.2.5 Tumormikromilieu	4
1.2.6 Therapie	6
1.2.7 Prognose	7
1.3 Zelluläre Seneszenz	8
1.3.1 Seneszenzinduktion	9
1.3.2 Merkmale der zellulären Seneszenz	10
1.3.3 SASP	12
1.3.4 Senolyse.....	16
1.4 Verwendete Medikamente	17
1.4.1 Navitoclax	17
1.4.2 Etoposid	18
II. Zielstellung Dieser Arbeit	19
III. Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Allgemeine Labormaterialien	21
3.1.3 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	22
3.1.4 Lösungen und Reagenzien für die Etoposid- und Navitoclax-Behandlung	23
3.1.5 Lösungen und Reagenzien für die Seneszenz-assoziierte- β -Gal-Färbung.....	23
3.1.6 Lösungen und Reagenzien für die Zellproliferationsanalyse.....	23
3.1.7 Lösungen und Reagenzien für die Seneszenz-assoziierte Hetero-chromatin Foci-Färbung	24
3.1.8 Lösungen und Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik	24
3.1.9 Lösungen und Reagenzien für die Immunoblotanalysen	25

3.1.10 Software	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 verwendete Zellen	28
3.2.2 Behandlung mit Etoposid und Navitoclax	28
3.2.3 Kultivierung der Zellen	28
3.2.4 Zellviabilitätszählung mit Trypanblau	30
3.2.5 Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Färbung	30
3.2.6 Zellproliferationsanalyse	32
3.2.7 Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci-Färbung	33
3.2.8 Nukleinsäureanalytik	34
3.2.9 Immunoblot-Analysen	40
3.2.10 Statistische Datenanalyse	44
IV. Ergebnisse	45
4.1 Effekte von Etoposid und Navitoclax auf die Zelltodrate	45
4.2 Seneszenz-assoziierte- β -Gal-Färbung	48
4.3 Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Zellproliferationsanalyse	51
4.4 Ergebnisse der Heterochromatin-Färbung	53
4.5 Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Genexpression	56
4.5.1 Cdkn1a	56
4.5.2 Cdk5	57
4.5.3 Cxcl2	59
4.5.4 Mdm2	60
4.5.5 Trp53	61
4.5.6 Serpine1	62
4.5.7 Tgf- β 1	64
4.5.8 Il6	65
4.6 Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Expression ausgewählter Proteine ..	66
4.6.1 LC3B	66
4.6.2 γ H2AX	68
V. Diskussion	71
5.1 die Zellviabilität unter der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax: Hinweise auf Seneszenz und Senolyse	71

5.2	SA- β -Gal-Färbung zur Charakterisierung von Etoposid-induzierter Seneszenz und Navitoclax-vermittelter Senolyse	72
5.3	Proliferationsrate als Indikator der Seneszenzinduktion und Senolyse durch Etoposid und Navitoclax	74
5.4	SAHF als Marker Seneszenten Zellen und deren Modulation durch Etoposid und Navitoclax	75
5.5	Wirkung von Etoposid und Navitoclax auf die Expression seneszenzassoziierter Gene	77
5.6	Effekte von Etoposid und Navitoclax auf die Proteine LC3B und γ H2AX	80
5.7	Integrative Betrachtung der zellspezifischen Reaktionen und Ausblick	83
VI. Zusammenfassung		86
VII. Thesen		88
VIII. Literatur		89
IX. Anhang		101
9.1	Abkürzungsverzeichnis	101
9.2	Herstellerverzeichnis	107
9.3	Lebenslauf	110
9.4	Veröffentlichungen	111
9.5	Danksagung	112
9.6	Eidesstaatliche Versicherung	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: CHARACTERISTICS OF CELLULAR SENESCENCE (ÜBERSETZT INS DEUTSCHE: MERKMALE DER ZELLULÄREN SENESZENZ)	10
ABBILDUNG 2: CHARAKTERISTIKA DES SASP	13
ABBILDUNG 3: ZELLVIABILITÄTS- UND ZELLTODZÄHLUNG VON PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN	46
ABBILDUNG 4: PROZENTUALER ANTEIL SA- β -GAL ⁺ -PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN	48
ABBILDUNG 5: PROZENTUALER BROMDESOXYURIDIN (BrdU) EINBAU IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION	51
ABBILDUNG 6: SAHF PRO 20 ZELLKERNEN VON PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN	54
ABBILDUNG 7: <i>CDKN1A</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION.....	56
ABBILDUNG 8: <i>CDK5</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION	57
ABBILDUNG 9: <i>CXCL2</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION MITTELS DER 2 ^{-ΔCT} -METHODE.	59
ABBILDUNG 10: <i>MDM2</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION MITTELS DER 2 ^{-ΔCT} -METHODE.	60
ABBILDUNG 11: <i>TRP53</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION.....	61
ABBILDUNG 12: <i>SERPINE1</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION.....	63
ABBILDUNG 13: <i>TGF-β1</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION.....	64
ABBILDUNG 14: <i>IL6</i> GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION.....	65
ABBILDUNG 15: EXPRESSION VON LC3BII IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND/ODER NAVITOCCLAX.....	66
ABBILDUNG 16: EXPRESSION VON γ H2AX IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND/ODER NAVITOCCLAX.....	68
ABBILDUNG 17: INTEGRATIVE BETRACHTUNG.....	84

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: WICHTIGE FAKTOREN UND MEDIATOREN DES SASP	15
TABELLE 2: GERÄTE	20
TABELLE 3: ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN	21
TABELLE 4: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	22
TABELLE 5: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND NAVITOCCLAX.....	23
TABELLE 6: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ- ASSOZIIERTE- β -GAL-FÄRBUNG	23
TABELLE 7: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLPROLIFERATIONSANALYSE	23
TABELLE 8: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ-ASSOZIIERTE HETEROCHROMATIN FOCI-FÄRBUNG.....	24
TABELLE 9 : ASSAY ON DEMAND KITS	24
TABELLE 10: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE NUKLEINSÄUREANALYTIK.....	24
TABELLE 11: PRIMÄRANTIKÖRPER	25
TABELLE 12: SEKUNDÄRANTIKÖRPER	25
TABELLE 13: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNOBLOTANALYSEN	26
TABELLE 14: SOFTWARE.....	27
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG MASTERMIX ZUR REVERSE TRANSKRIPTION EINER RNA-PROBE	37
TABELLE 16: ZUSAMMENSETZUNG DES PCR-MASTERMIXES, JE PROBE	38
TABELLE 17: PROTOKOLL DER PCR ZYKLEN	39
TABELLE 18: VERDÜNNUNG DER IMMUNOBLOT ANTIKÖRPER UND APPARENTES MOLEKULARGEWICHT	43
TABELLE 19: HERSTELLERVERZEICHNIS.....	107

I. STAND DER FORSCHUNG

1.1 DAS PANKREAS

Das Pankreas ist ein sekundär retroperitoneal gelegenes Organ des Gastrointestinaltrakts. Es besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen, aber funktionell integrierten Drüsensystemen, dem exokrinen und dem endokrinen Pankreas (Leung, 2010). Der exokrine Anteil, bestehend aus Azinus- und Gangzellen, synthetisiert Verdauungsenzyme sowie Natriumbikarbonat. Der endokrine Anteil setzt sich aus fünf unterschiedlichen sekretorischen Inselzellen zusammen, aus denen Peptidhormone zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase sezerniert werden (Pape et al., 2023).

1.2 DAS PANKREASKARZINOM

Das Pankreaskarzinom bezeichnet eine maligne Erkrankung des Pankreas, welche nach derzeitigem Wissenstand aus prämaligen intraepithelialen Vorstufen entsteht (Yachida and Lacobuzio-Donahue, 2013). Die Epithelneoplasien können entweder exokrinen oder endokrinen Ursprungs sein, wobei die exokrinen Neoplasien weiter in duktale und azinäre Neoplasien unterteilt werden (Haeberle and Esposito, 2019). Bei etwa 90 % der Neoplasien des Pankreas handelt es sich um das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (Halbrook et al., 2023) (Haeberle and Esposito, 2019). Seltener sind Tumoren, die sich aus den endokrinen Anteilen ableiten. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 11 % weist das PDAC neben dem Mesotheliom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, 2023).

1.2.1 EPIDEMIOLOGIE

Das Pankreaskarzinom stellt das deutsche Gesundheitssystem vor eine wachsende Herausforderung. Im Jahr 2020 erkrankten laut der aktuellen Krebsstatistik des Robert Koch-Institutes in Deutschland 20.200 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Entsprechend der ungünstigen Prognose verstarben etwa gleich viele Betroffene. Zusätzlich kam es zwischen 1990 und 2020 zu einem Anstieg der altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten. Im bundesweiten Vergleich ist Mecklenburg-Vorpommern besonders betroffen. Dort sind die altersstandardisierten Neuerkrankungen und Todesfälle im bundesweiten Vergleich am höchsten. Im Mittel erkrankten Frauen im Alter von 76 Jahren, bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 72 Jahren. Für beide Geschlechter stellt das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland dar (Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, 2023), weltweit liegt es auf Platz 7 (Stoffel et al., 2023).

1.2.2 ÄTIOLOGIE

Dem PDAC liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde. Die Risikofaktoren lassen sich in modifizierbare und nicht modifizierbare Faktoren einteilen.

Als modifizierbare Risikofaktoren gelten Rauchen, starkes Übergewicht sowie die chronische Pankreatitis (CP) (Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, 2023) (Klein, 2021). Bei Rauchern steigt das Risiko, am PDAC zu erkranken, mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten (Klein, 2021). Übergewicht gilt ebenfalls als gesicherter Risikofaktor (Lilly et al., 2023). Angesichts der seit 1990 verdoppelten Übergewichtsraten bei Erwachsenen ist ein entsprechender Anstieg der Häufigkeit von PDACs zu erwarten (World Health Organisation, 2024). Einen weiteren Risikofaktor stellt die CP dar. Sie beschreibt einen multifaktoriellen, fortschreitenden und destruktiven Entzündungsprozess, bei dem chronische Entzündungen des Pankreas wiederholt zu fibrotischen Gewebsveränderungen, Gangobstruktionen, Atrophie und Funktionsverlust führen (Beyer et al., 2020) (Algül et al., 2007). Lang andauernde Entzündungsprozesse fördern einen erhöhten Zellumsatz und eine verstärkte Proliferation pankreatischer Sternzellen, wodurch die Bildung von Fibrosegewebe begünstigt wird. Zudem stimulieren chronische Entzündungen die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Daraus resultiert ein entzündungsförderndes Mikromilieu, das die Entstehung von Mutationen fördert und so die Karzinogenese begünstigt (Klein, 2021) (Algül et al., 2007) (Gandhi et al., 2022) (Lilly et al., 2023). Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen hohem Alkoholkonsum und dem PDAC noch nicht abschließend bewiesen ist, deuten zahlreiche Studien darauf hin. Zudem ist hoher Alkoholkonsum ein gesicherter Risikofaktor für eine CP (Stoffel et al., 2023) (Wang et al., 2016).

Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren zählen ein erhöhtes Lebensalter, das Geschlecht, die ethnische Herkunft, eine familiäre Vorbelastung sowie die genetische Veranlagung (Raimondi et al., 2009).

Ein fortgeschrittenes Lebensalter wird als Hauptrisikofaktor betrachtet. Darüber hinaus liegt die weltweite Inzidenz beim männlichen Geschlecht höher als beim weiblichen (Raimondi et al., 2009). Die Bedeutung hereditärer Faktoren zeigt sich in dem 1,5- bis 13-fach erhöhten Risiko, an einem PDAC zu erkranken, wenn ein naher Verwandter ebenfalls an dieser Krankheit leidet (Klein, 2021). Zu den bekannten erblichen Risikofaktoren, die mit einem erhöhten Risiko für das PDAC assoziiert sind, zählen Keimbahnmutationen in Prädispositionsgenen wie *BRCA1/2*, *PALB2*, *ATM* und *CDKN2A* sowie hereditäre Syndrome, wie das FAMMM-Syndrom, das Lynch-Syndrom und die hereditäre Pankreatitis (Raimondi et al., 2009) (Hu et al., 2021) (Wolfgang et al., 2013). Ein besonders hoher Anteil der Patienten weist pathogene Varianten im *BRCA2*-Gen auf (Klein, 2021).

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) könnte sowohl als nicht modifizierbarer Risikofaktor als auch

als modifizierbarer Risikofaktor für das PDAC angesehen werden, insbesondere wenn der Einfluss von Lebensstilfaktoren wie Ernährung und körperlicher Aktivität auf die Krankheitsentstehung berücksichtigt wird. T2DM ist häufig mit Übergewicht verbunden, einem modifizierbaren Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC (Tang et al., 2011). Darüber hinaus fungiert T2DM nicht nur als Risikofaktor für die Entstehung eines PDAC, sondern kann auch als Symptom eines bereits bestehenden PDAC auftreten (Roy et al., 2021) (Andersen et al., 2017). Die zunehmende Prävalenz von T2DM könnte in dem Zusammenhang ein Grund für die trotz rückläufigen Tabakkonsums steigende altersstandardisierte Inzidenz des PDAC sein (Klein, 2021).

1.2.3 PATHOGENESE

Es existieren drei spezifische Vorläuferläsionen der normalen Mukosa, aus denen sich PDACs entwickeln. Diese drei neoplastischen Vorläuferläsionen sind die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) sowie die muzinöse zystische Neoplasie (MCN) (McGuigan et al., 2018). Eine PanIN ist eine mikroskopisch kleine, flache oder papilläre Läsion, ausgehend von den kleinen intralobulären Pankreasgängen (Distler et al., 2014). Gemäß aktuellen Studien lassen sich PanINs in low-grade und high-grade Läsionen einteilen. Die PanINs treten von den Neoplasien am häufigsten auf und weisen je nach Subtyp ein unterschiedlich hohes Risiko für die Entwicklung eines PDAC auf (Ying et al., 2016) (McGuigan et al., 2018).

Die Entwicklung von PDACs geht häufig mit einer genetischen Instabilität einher, die sich in Mutationen von Genen manifestiert. Zu den häufig mutierten Genen zählen das Protoonkogen *KRAS* und die Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4* (Mohammed et al., 2014) (Löhr et al., 2005). Mit zunehmendem Dysplasiegrad der PanIN steigt auch die Mutationsrate des Protoonkogens *KRAS*. Studien zufolge mutiert *KRAS* in ungefähr 80 % der PDAC-Fälle (Löhr et al., 2005).

1.2.4 KLINIK UND DIAGNOSTIK

Die Diagnose eines PDACs wird aufgrund fehlender oder unklarer Symptomatik häufig erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, wenn der Tumor bereits in umliegendes Gewebe infiltriert oder Metastasen gebildet hat (Vincent et al., 2011). Zu den häufigen Symptomen zählen unspezifische Beschwerden, wie Bauch- oder Rückenschmerzen, Fatigue, ein schmerzloser Ikterus durch Gallengangsobstruktion und Gewichtsverlust (Wood et al., 2022). Gelegentlich kann eine Obstruktion des Pankreasganges zu Symptomen einer Pankreatitis führen (Vincent et al., 2011). Auch eine Erkrankung mit T2DM kann ein Hinweis auf ein PDAC sein. Die Prävalenz von T2DM bei Patienten mit PDAC ist außerordentlich hoch. Einer Studie zufolge wurden bei 47 % der Patienten mit einem PDAC zusätzlich T2DM gefunden, im Vergleich zu 7 % der

Kontrollpersonen (Andersen et al., 2017). Bislang fehlen zuverlässige Methoden zur Früherkennung oder zum Screening der Allgemeinbevölkerung sowie von Risikogruppen auf PDAC (Lammert, 2019).

Laut der S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom erfolgt bei Patienten über 50 Jahren mit indikativen Symptomen primär eine Oberbauchsonographie, um die Verdachtsdiagnose eines PDACs zu stellen und eventuelle Metastasen zu erfassen. Zur Klärung des Tumorverdachts sind anschließende Verfahren wie Endosonographie, Multidetektor-CT, MRT, MRCP oder ERCP geeignet (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., AWMF, 2024). Die beiden sensitivsten Verfahren sind die Multidetektor-CT und das MRT in Kombination mit der MRCP. Differentialdiagnostisch kann bei Nachweis einer Raumforderung anschließend die laborchemische Bestimmung von CA19-9 durchgeführt werden. Obwohl CA19-9 als alleinstehender Marker für die Früherkennung oder als Screening Parameter unzureichend ist, korreliert ein erhöhter Wert bei bereits diagnostizierten PDAC mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer eingeschränkten Operabilität (Ge et al., 2017) (Park et al., 2021).

1.2.5 TUMORMIKROMILIEU

Ein wichtiges histopathologisches Merkmal des PDAC ist die ausgeprägte Reaktion des umliegenden Gewebes, die sowohl immunsuppressive als auch desmoplastische Eigenschaften aufweist und eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Entwicklung des PDAC spielt (Ren et al., 2018). Die resultierende Tumorumgebung, auch als Tumormikromilieu (TME) bezeichnet, besteht aus einer heterogenen Zusammensetzung zellulärer und nicht-zellulärer Bestandteile. Hierzu zählen krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs), pankreatische Stellatumzellen (PSCs), Endothelzellen, Perizyten, Neuronen, infiltrierende Immunzellen sowie Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) (Ren et al., 2018) (Ho et al., 2020) (Hosein et al., 2020).

Die desmoplastischen Eigenschaften des TME resultieren aus einer fibrotischen Reaktion, die durch einen Überschuss an Fibroblasten und einer vermehrten Ablagerung von ECM gekennzeichnet ist (Hessmann et al., 2020). Diese Desmoplasie kann bis zu 90 % der Tumormasse ausmachen (Wang et al., 2021). Charakteristisch für die ECM beim PDAC sind eine erhöhte Konzentration von Kollagen (insbesondere Typen I, III und IV), Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Fibronectin (Hosein et al., 2020) (Linder et al., 2001).

Die zentrale zelluläre Komponente der Desmoplasie bilden CAFs, die im TME eine aktive Rolle in der Karzinomentstehung, -progression und Metastasierung zu spielen scheinen (Hosein et al., 2020). CAFs zeichnen sich durch eine hohe Heterogenität aus und lassen sich in verschiedene Subpopulationen unterteilen, darunter myofibroblastische, entzündliche und mesenchymale Stammzell-CAFs (Louault et al., 2020). In ihrer aktiven Form sind CAFs Hauptproduzenten für eine Vielzahl der ECM-Komponenten, die wesentlich zur Bildung des dichten,

fibrösen Stromas beitragen (Halbrook et al., 2023). PSCs galten lange als primäre Quelle der CAFs, aktuelle Studien zeigen jedoch, dass die PSCs nur einen kleinen Anteil der CAFs ausmachen. Die genauen Ursprünge der CAFs sind weiterhin Gegenstand der Forschung (Halbrook et al., 2023) (Sunami et al., 2020).

Das fibrotische Stroma bildet nicht nur eine strukturelle Grundlage für das TME, sondern wirkt auch als physische und metabolische Barriere, die die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff begrenzt. Dies führt zu regionaler Hypoxie und einer dysregulierten Metabolitverfügbarkeit. PDAC-Zellen entwickeln zahlreiche Anpassungsmechanismen, um unter diesen Umständen nicht nur zu überleben, sondern auch zu proliferieren (Halbrook et al., 2023). Diese Fähigkeiten basieren unter anderem auf der durch *KRAS*-vermittelten metabolischen Umprogrammierung sowie auf Adaptionen, die die Nährstoffaufnahme optimieren. Beispielsweise wechseln PDAC-Zellen von der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zur aeroben Glykolyse, ein Phänomen, das als Warburg-Effekt bezeichnet wird (Qin et al., 2020). Das hypoxische Mikromilieu aktiviert die Angiogenese, Metastasenbildung und metabolische Umprogrammierung und trägt so zur weiteren Tumorprogression bei (Louault et al., 2020) (Sunami et al., 2020).

Neben der Desmoplasie weist das TME auch ausgeprägte immunsuppressive Eigenschaften auf. Das PDAC wird traditionell als „nicht-immunogene“ Neoplasie betrachtet. Präklinische Daten zeigen, dass das PDAC unterschiedliche Mechanismen zur Immunabwehr einsetzen, darunter die Rekrutierung regulatorischer Immunzellen, die Sekretion immunsuppressiver Chemokine und Zytokine (IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α , GM-CSF) sowie die Expression von Zelloberflächenproteinen (PD-L1, CTLA4) (Karamitopoulou, 2019). Das TME ist durch eine verstärkte Infiltration immunsuppressiver Zellen wie regulatorischen T-Zellen, myeloischen Suppressorzellen (MDSCs) und tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) gekennzeichnet, die Effektorzellen wie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen blockieren (Karamitopoulou, 2019) (Ho et al., 2020). Eine hohe Anzahl myeloischer Zellen korreliert mit einer schlechteren klinischen Prognose (Joseph et al., 2024). *KRAS*-Mutationen fördern das immunsuppressive TME, indem sie die Rekrutierung von MDSCs steigern und die T-Zell-Aktivität hemmen (Ho et al., 2020). PDAC-Zellen umgehen die Immunüberwachung durch Mechanismen wie die Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression und die Hochregulation von PD-L1 und CD47 (Joseph et al., 2024). Die verminderte Expression von MHC-I-Molekülen verhindert die Erkennung durch CD8⁺-T-Zellen (Bozic and Wilkinson, 2020). CD8⁺-T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorkontrolle und sind mit einem verbesserten Überleben von Patienten mit PDAC assoziiert (Ansari et al., 2018). Entzündliche CAFs, die IL-6 und andere proinflammatorische Zytokine sezernieren, tragen zur Tumorprogression bei. Sie sind typischerweise weiter entfernt von den Tumorzellen lokalisiert (Hessmann et al., 2020).

Zusammengefasst bildet das dichte TME eine komplexe physische und metabolische Barriere. Diese verhindert eine adäquate Vaskularisierung, schränkt das Eindringen von Therapeutika ein, begünstigt die Tumorentwicklung und blockiert sowohl die Infiltration als auch die Aktivierung von Immunzellen. Dadurch entsteht eine immunsuppressive Umgebung, die das Fortschreiten des Tumors begünstigt (Kleeff et al., 2016) (Ho et al., 2020).

1.2.6 THERAPIE

Die chirurgische Resektion stellt die bisher einzige kurative und effektive Therapieoption beim PDAC dar (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., AWMF, 2024) (Springfeld et al., 2023). Ziel sollte eine R0-Resektion sein (Wagner et al., 2004). Doch nur etwa 15–20 % der Karzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose operabel (Mohammed et al., 2014) (Halbrook et al., 2023). Grund dafür ist die späte Entdeckung der Karzinome in bereits fortgeschrittenem, häufig metastasiertem Stadium. Die anatomische Resektabilität wird CT-basiert beurteilt. Der Tumor wird anhand der anatomischen Beziehungen zu lokoregionären Gefäßen in resektabel, grenzwertig resektabel und lokal-fortgeschritten eingeteilt. Zusätzlich stellen biologische Faktoren, wie das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und der CA19-9 Wert, sowie der ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) Performance-Status der Patienten wichtige prognostische Parameter für das Gesamtüberleben dar (Tas et al., 2013) (Isaji et al., 2018). An die Resektion schließt sich in der Regel eine adjuvante (R0) bzw. additive (R1) Chemotherapie für 6 Monate an. Abhängig vom ECOG-Performance Status erfolgt diese entweder mit FOLFIRINOX (ECOG < 1) oder Gemcitabin (ECOG > 1-2) (Conroy et al., 2018) (Springfeld et al., 2023).

Initial als grenzwertig resektabel oder lokal-fortgeschritten eingestufte Karzinome werden mit einer neoadjuvanten Kombinationschemotherapie aus FOLFIRINOX oder Gemcitabin plus nab-Paclitaxel behandelt (Ghaneh et al., 2023). Anschließend wird mittels Schnittbildgebung die sekundäre Resektabilität beurteilt. Patienten mit nicht resektablen Tumoren und einem guten Allgemeinzustand (ECOG Performance Status von 0 bis 2) wird eine palliative Chemotherapie angeboten (Sohal et al., 2016).

Die etablierte Therapie des PDAC bildet einen wichtigen Ausgangspunkt, stößt jedoch aufgrund der begrenzten Wirksamkeit und der Komplexität des TME an ihre Grenzen. Molekulare Profilanalysen scheinen neue Perspektiven für die Therapie von PDAC zu eröffnen: Individualisierte Ansätze, beispielsweise bei Patienten mit Mutationen in homolog rekombinanten Genen, wie in *BRCA1*, *2* und *PALP2*, konnten in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse erzielen. Die Patienten zeigten nach Platin-basierter Chemotherapie und PARP-Inhibitoren eine verlängerte progressionsfreie Überlebenszeit und ein verbessertes Gesamtüberleben (Hu and O'Reilly, 2024) (Park et al., 2020).

Die wichtigsten Treibermutationen für das PDAC sind *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4*, wobei *KRAS* in ungefähr 80 % der Fälle mutiert ist (Löhr et al., 2005). Angesichts der nahezu universellen Präsenz der *KRAS*-Mutationen wurden in den letzten Jahrzehnten umfangreiche Bemühungen unternommen, *KRAS* direkt und indirekt zu therapieren, jedoch mit heterogenen Ergebnissen (Hu and O'Reilly, 2024). Inhibitoren wie Adagrasib und Sotorasib, die spezifisch gegen *KRAS*^{G12C}-Mutationen wirken, zeigten in frühen klinischen Studien Erfolge beim PDAC. Allerdings betreffen diese Mutation nur etwa 1–2 % der Patienten mit PDAC (Zhou et al., 2021), (Hu and O'Reilly, 2024). Für die häufigere *KRAS*^{G12D}-Mutation, die bei etwa einem Drittel der Patienten vorliegt, wurden neuartigere Moleküle wie MRTX1133 entwickelt. Diese Substanzen bewirkten in präklinischen Studien Tumorregression (Hu and O'Reilly, 2024). Darüber hinaus profitieren Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-PDAC und seltenen Genfusionen in Genen wie *FGFR2*, *RAF*, *ALK*, *RET*, *MET*, *NTRK1*, *ROS1*, *ERBB4*, *NRG1* und *FGFR3* von gezielten Therapien gegen diese spezifischen Mutationen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz molekularer Diagnostik, um seltene therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren und behandeln zu können (Hu and O'Reilly, 2024) (Philip et al., 2022).

Zusammengefasst eröffnet die Entwicklung neuer Substanzen für seltenere Genmutationen im PDAC vielversprechende Perspektiven. Sie legen eine Sequenzierung des Tumorzellgenoms nahe, um individuelle therapeutische Ansätze zu identifizieren und das klinische Management des PDAC zu verbessern.

1.2.7 PROGNOSE

Nur etwa 11 % der Patienten leben 5 Jahre nach dem Zeitpunkt der Diagnose (Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, 2023). Ein wichtiger Grund hierfür ist die trotz erfolgreicher Resektion und anschließender Chemotherapie hohe Rezidivrate von 20-50% (Strobel and Büchler, 2020). Im Schnitt erleiden Patienten lokale Rezidive nach 5–23 Monaten (Okusaka, 2022). Zu den Faktoren, die das Überleben nach einer Operation beeinflussen, zählen die Tumorgroße, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und nervaler Invasion, der chirurgische Resektionsrand sowie der Mutationsstatus (Sugiura et al., 2013). Die Mutation im *KRAS*-Onkogen ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Buscail et al., 2020). Neben Größe, Invasion, dem molekularen Profil und dem TNM Stadium spielt auch der gesundheitliche Zustand der Patienten eine wichtige Rolle für die Prognose (Cai et al., 2021).

1.3 ZELLULÄRE SENESZENZ

Zelluläre Seneszenz bezeichnet einen durch endogene und exogene Stressfaktoren sowie physiologische Prozesse ausgelösten Zellzustand, der mit einem verlängerten, in der Regel irreversiblen Zellzyklusarrest, sekretorischen Veränderungen, makromolekularen Schäden und einem veränderten Stoffwechsel einhergeht (Gorgoulis et al., 2019) (Di Micco et al., 2021). Darüber hinaus führt der seneszente Zustand zu Veränderungen der Zellmorphologie (Ogrodnik, 2021).

Der Zustand der zellulären Seneszenz wurde erstmals 1960 von *Hayflick* und seinen Kollegen beschrieben, die zeigten, dass gesunde Zellen in Kultur trotz Vorhandenseins aller notwendigen Ressourcen nur eine begrenzte Anzahl an Teilungen durchlaufen. Anschließend traten die Zellen in einen Zustand der dauerhaften Ruhephase über (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Seitdem hat sich unser Verständnis der Ursachen und Konsequenzen der Zellseneszenz erheblich erweitert, vor allem in Bezug auf die molekularen und zellulären Mechanismen, die diesen Zustand auslösen und aufrechterhalten. Dennoch konnten zentrale Fragen, wie die evolutionäre Bedeutung und die biologischen Mechanismen hinter der Existenz der Seneszenz, noch nicht abschließend geklärt werden (Faget et al., 2019).

Die am weitesten verbreitete Theorie besagt, dass zelluläre Seneszenz eine tumorsuppressive Funktion erfüllt (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (Kowald et al., 2020) (Campisi, 2013). Der mit der Seneszenz verbundene Zellzyklusarrest bietet Zellen offenbar den Vorteil, erworbene Schäden nicht an die nachfolgende Generation weiterzuvererben. Andere Theorien sehen die primäre Funktion der Seneszenz in der Gewebereparatur und -regeneration (Gorgoulis et al., 2019) (Kowald et al., 2020).

Die Tumorsuppressionshypothese wird jedoch durch den seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP, engl. *senescence-associated secretory phenotype*) infrage gestellt. Der SASP umfasst eine komplexe Mischung aus Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen, die proinflammatorische und potentiell tumorfördernde Effekte entfalten können (Kowald et al., 2020). Eine detaillierte Beschreibung des SASP findet sich in Kapitel 1.3. Darüber hinaus können seneszente Zellen durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie Trp53, RB1 und PTEN die Tumorprogression fördern (Huang et al., 2022). Seneszenz könnte somit ein Beispiel für antagonistische Pleiotropie in der Evolution darstellen oder ein zelluläres Programm, das sowohl vorteilhafte als auch schädliche Effekte mit sich bringt (Gorgoulis et al., 2019).

1.3.1 SENESZENZINDUKTION

Die Induktion der Seneszenz lässt sich, wie in Abbildung 1 dargestellt, in mindestens fünf Mechanismen einteilen: die replikative Seneszenz (RS), ausgelöst durch wiederholte Zellteilung; die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS), hervorgerufen durch Mutationen in Onkogenen; die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS), eingeleitet durch chemotherapeutische Wirkstoffe oder ionisierende Strahlung; die mitochondriale Dysfunktion-induzierte Seneszenz (MiDAS), induziert durch mitochondrialen Stress und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*); und die Immunologisch-induzierte Seneszenz (IIS), vermittelt durch Immunzellen und Zytokine. Diese Seneszenzarten unterscheiden sich durch ihre Auslöser, teilen jedoch gemeinsame regulatorische Mechanismen und Signalwege, die letztlich zum Zellzyklusarrest führen (Wang et al., 2024) (Takasugi et al., 2022).

Replikative Seneszenz wird typischerweise durch die Verkürzung oder Dysfunktion von Telomeren infolge von wiederholten Zellteilungen ausgelöst. Sobald die Telomere eine kritische Länge erreichen, werden sie als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt, was die DNA-Schadensantwort (DDR, engl. *DNA damage response*) aktiviert (Chen et al., 2022) (Dong et al., 2024). Im Rahmen der DDR wird der Signalweg über die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und anschließende Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 ausgelöst (p53-p21-Signalweg). P21 hemmt die Aktivität cyclinabhängiger Proteinkinasen, insbesondere CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (RB) sowie weiterer Mitglieder der Pocket-Protein-Familie verhindert wird (Gorgoulis et al., 2019) (Wang et al., 2024). Dies führt zur Bildung eines stabilen Komplexes aus RB und dem sogenannten DREAM-Komplex, wodurch die Transkription von E2F, einem essenziellen Protein der S-Phase des Zellzyklus, unterdrückt und der Zellzyklusarrest in der G1-Phase induziert wird (Huang et al., 2022) (Campisi, 2013). Zusätzlich kann p21 rückwirkend die Produktion von ROS verstärken und so die Seneszenz stabilisieren (Huang et al., 2022).

ROS spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion der Seneszenz, da sie auch unabhängig von der DNA-Schadensantwort den ERK-p16-RB-Signalweg induzieren können. Durch die Phosphorylierung von ERK wird p16 aktiviert. P16 bindet anschließend an den Komplex aus Cyclin D, CDK4 und CDK6, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) verhindert wird. Dies unterdrückt die Transkription von E2F und führt zu einem Zellzyklusarrest (ERK-p16-RB-Signalweg). Mitochondriale Dysfunktionen verstärken die ROS-Produktion und induzieren über diesen Signalweg die Seneszenz (Huang et al., 2022).

Onkogen-induzierte Seneszenz entsteht durch die Aktivierung von Onkogenen. Einerseits führen diese ebenfalls durch Aktivierung der DDR zur Seneszenz, andererseits bewirken aktivierte Onkogene eine erhöhte Produktion und Akkumulation von ROS (Huang et al., 2022) (Dong et al., 2024). Darüber hinaus können aktivierte Onkogene den p53-p21-Signalweg auch

direkt über Hemmung der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 aktivieren (Zhu et al., 2020). Unabhängig von der DDR fördern Onkogene auch die Expression von p16 durch die Aktivierung von p38 und der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (Huang et al., 2022).

Therapie-induzierte Seneszenz wird hauptsächlich durch DNA-Schäden verursacht, die durch ionisierende Strahlung, chemische Substanzen oder chemotherapeutische Wirkstoffe entstehen (Huang et al., 2022) (Di Micco et al., 2021) (Dong et al., 2024). Diese Schäden aktivieren die DDR, wodurch Mechanismen wie der p53-p21- und der ERK-p16-RB-Signalweg aktiviert werden.

1.3.2 MERKMALE DER ZELLULÄREN SENESZENZ

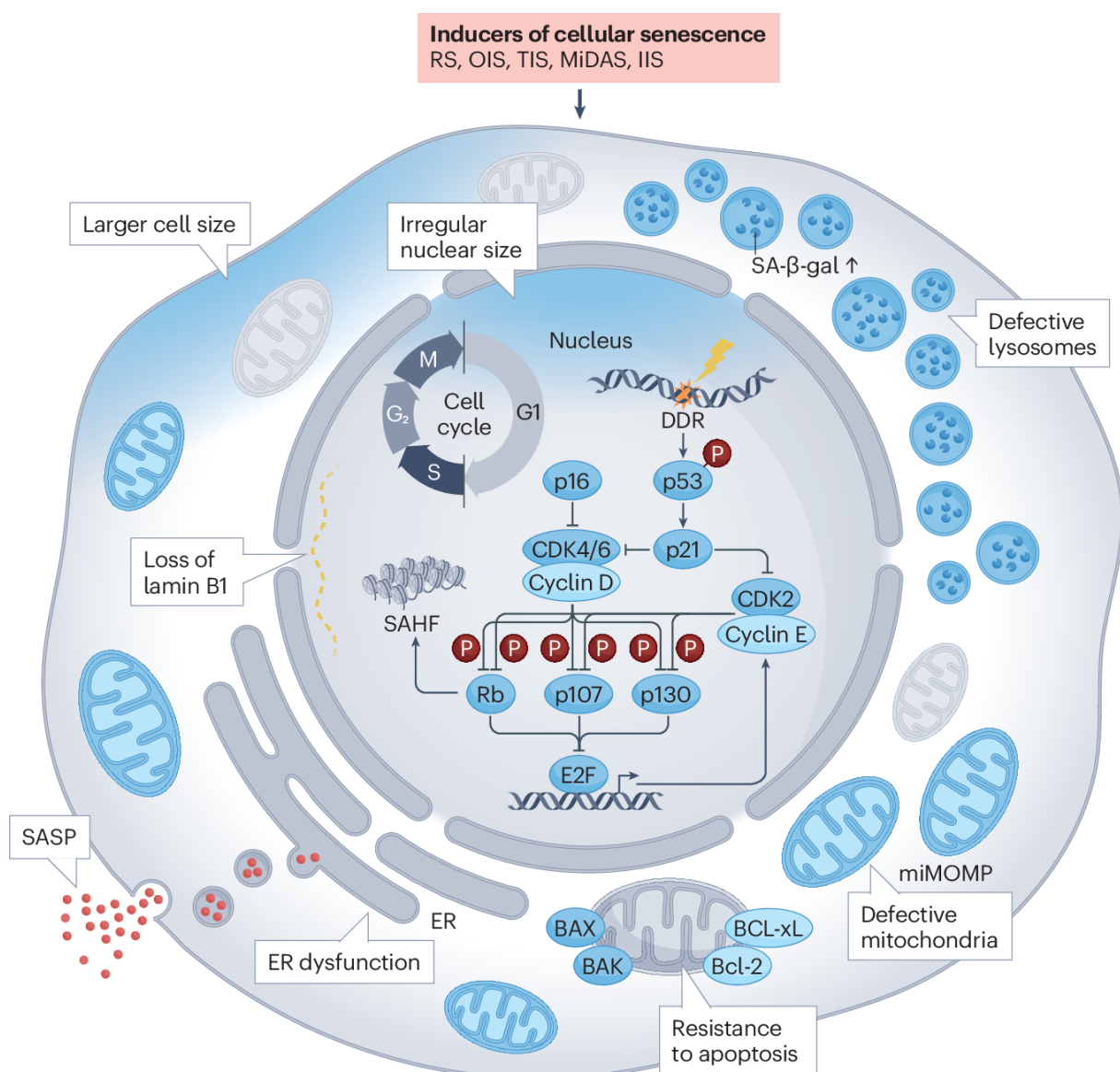


ABBILDUNG 1: CHARACTERISTICS OF CELLULAR SENESCENCE (ÜBERSETZT INS DEUTSCHE: MERKMALE DER ZELLULÄREN SENESZENZ)

Senescent cells undergo morphological changes and are classified according to their inducers: replicative senescence (RS), oncogene-induced senescence (OIS), therapy-induced senescence (TIS), mitochondria dysfunction-induced senescence (MiDAS) and immunologically induced senescence (IIS). Upregulation of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p21 and p16 are common features of senescent cells, and their inhibition of CDK4 and CDK6 leads to the repression of E2F transcription factors and their target genes (including cyclin E proteins) through hypophosphorylated Rb, p107 and p130, which arrests the cell cycle in G1 phase. Senescent cells are commonly larger than proliferating cells, have irregular nuclear size accompanied by loss of the nuclear lamina protein lamin B1, and accumulate senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). Phosphorylation of p53 mediates signals from persistent DNA damage response (DDR) to its effector p21 and to other downstream effectors in different types of senescent cells. Organelles, such as lysosomes, endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, are mostly defective in senescent cells. Elevated senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity and resistance to apoptosis (upregulation of Bcl-2 family proteins) are classical markers of senescence. BAX and BAK macropores are crucial for mitochondrial DNA release in senescent cells. Finally, senescent cells are characterized by elevated secretion of various factors collectively termed the senescence-associated secretory phenotype (SASP). miMOMP, minority mitochondrial outer membrane permeabilization.

Aus: Wang et al., 2024, *Wiedergegeben mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature*.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist die zelluläre Seneszenz durch morphologische und molekulare Veränderungen gekennzeichnet, die häufig durch eine erhöhte p53-Expression und Hemmung der RB-Phosphorylierung ausgelöst werden (Huang et al., 2022). Das charakteristische Erscheinungsbild seneszenten Zellen zeigt sich in einer flachen, vergrößerten und ausgebreiteten Morphologie im Vergleich zu gesunden Zellen (Mohamad Kamal et al., 2020) (Bourdens et al., 2019). Diese morphologischen Veränderungen könnten auf den Zellzyklusarrest in der G1-Phase zurückzuführen sein, bei dem strukturelle Zellkomponenten für die Zellteilung erzeugt werden und akkumulieren, ohne dass es aufgrund der Seneszenz zur Teilung kommt (Huang et al., 2022) (Ogrodnik, 2021).

Seneszente Zellen weisen zudem eine veränderte Kernlamina auf, die auf den Verlust des Proteins Lamin B1 zurückgeführt wird. Die Zellkerne seneszenten Zellen erscheinen irregulär, vergrößert und sind durch reorganisiertes Heterochromatin gekennzeichnet (Rocha et al., 2022). In einigen seneszenten Zellen treten große Mengen an Heterochromatin in Form von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Foci (SAHF) auf, die häufig in der Kernperipherie lokalisiert sind und zur dauerhaften Stilllegung von E2F-Zielgenen beitragen (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (Bellanger et al., 2022) (Zhang et al., 2007). Darüber hinaus kann die phosphorylierte Form des Histonproteins H2AX in seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Diese Modifikation tritt bevorzugt in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen auf und kann als Marker für die zelluläre Seneszenz dienen (Carnero, 2013).

Ein weiteres Merkmal seneszenten Zellen ist die erhöhte Anzahl vergrößerter und/oder dysfunktionaler Lysosomen (Wiley and Campisi, 2021). Gleichzeitig ist die Aktivität des

lysosomalen Enzyms β -Galaktosidase (β -Gal) in seneszenten Zellen gesteigert (Mohamad Kamal et al., 2020) (Crouch et al., 2022). Dies könnte auf eine Expansion des lysosomalen Kompartiments in seneszenten Zellen und die daraus resultierende erhöhte Konzentration lysosomaler Enzyme zurückzuführen sein (Tan and Finkel, 2023). Alternativ könnte die erhöhte β -Gal-Aktivität in der Überexpression des *GLB1* Gens bedingt sein (Valieva et al., 2022). Die Aktivität des lysosomalen Enzyms β -Gal wird als weit verbreiteter Marker für Seneszenz in Geweben und Zellkulturen verwendet (Zhang et al., 2021).

Auch die Mitochondrien zeigen in seneszenten Zellen strukturelle und funktionelle Veränderungen: Ihre Anzahl und Masse sind erhöht. Das reduzierte Membranpotenzial begünstigt dabei eine erhöhte Produktion von ROS (Gorgoulis et al., 2019) (Martini and Passos, 2023) (Hernandez-Segura et al., 2018). Gleichzeitig zeigen seneszente Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose, die auf eine erhöhte Expression anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2 Familie zurückzuführen ist (Gorgoulis et al., 2019) (Martini and Passos, 2023).

Auf molekularer Ebene sind seneszente Zellen durch ein verändertes Genexpressionsprofil charakterisiert: Zellzyklusinhibitoren wie p16 (*CDKN2A*) und p21 (*CDKN1A*) werden überexprimiert, während Gene, die für Zellzyklus-stimulierende Proteine kodieren, unterdrückt werden (Mohamad Kamal et al., 2020).

Das vermutlich wichtigste Merkmal seneszenten Zellen ist die Entwicklung des sogenannten *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Dieser wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

1.3.3 SASP

Das auffälligste und vermutlich klinisch relevanteste Merkmal seneszenten Zellen ist die Entwicklung des SASP (Crouch et al., 2022). Der SASP beschreibt die charakteristische Veränderung des Sekretoms seneszenten Zellen, das eine Vielzahl bioaktiver Moleküle umfasst. Dazu zählen proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Proteasen der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren sowie Faktoren, die fibrotische Prozesse modulieren (siehe Tabelle 1). Die exakte Zusammensetzung ist bislang noch nicht vollständig verstanden und bleibt Gegenstand aktueller Forschung (Dong et al., 2024). Wie in Abbildung 2 dargestellt beeinflussen seneszente Zellen mithilfe des SASP nicht nur ihre eigene Funktionalität, sondern interagieren auch aktiv mit ihrer Mikroumgebung. Der SASP trägt wesentlich zur Etablierung des charakteristischen Profils seneszenten Zellen bei (Basisty et al., 2020) (Chaib et al., 2022). Es ist jedoch wichtig, zu betonen, dass keiner dieser Marker allein spezifisch für den seneszenten Phänotyp ist (Chambers et al., 2021).

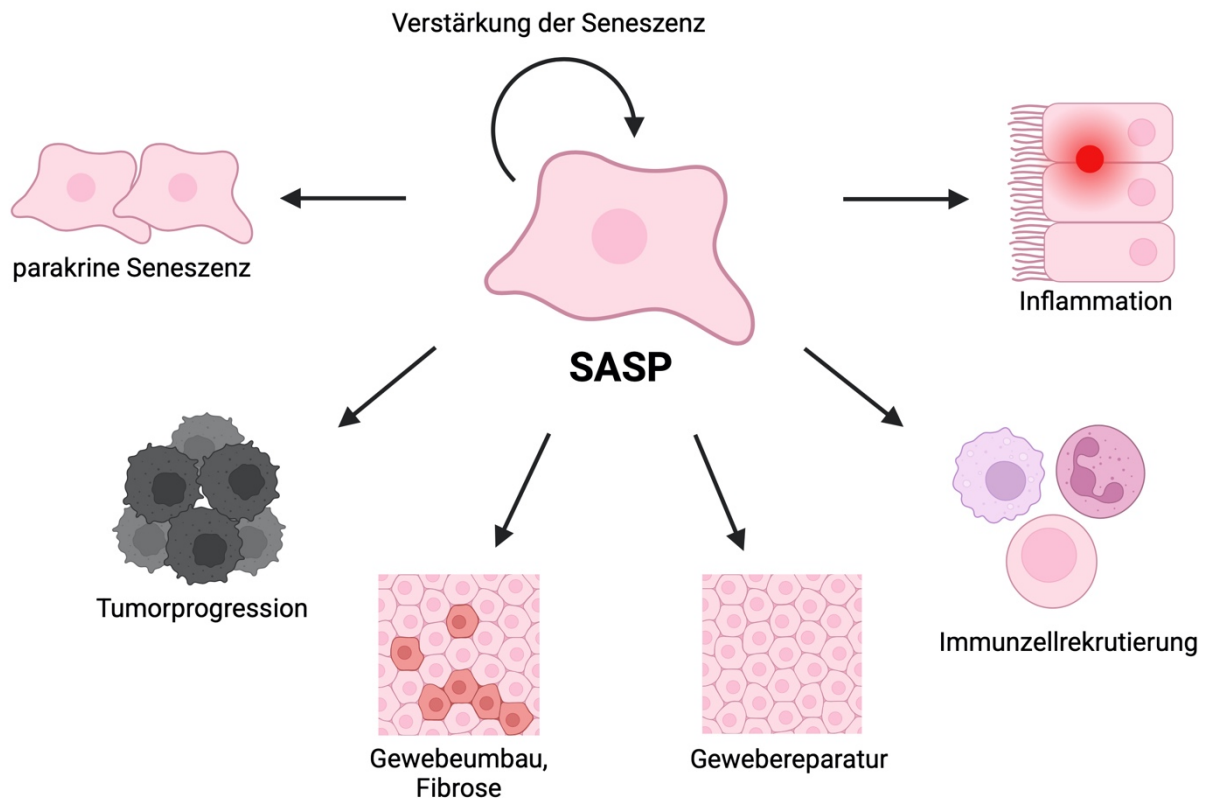


ABBILDUNG 2: CHARAKTERISTIKA DES SASP

Der SASP ist ein zentrales Merkmal seneszenten Zellen und beeinflusst eine Vielzahl biologischer Prozesse. Dargestellt sind die charakteristischen Hauptmerkmale des SASP, einschließlich der parakrinen Induktion von Seneszenz, der Förderung von Inflammation, die Rekrutierung von Immunzellen sowie die Gewebereparatur. Darüber hinaus trägt der SASP zur Tumorprogression sowie zum Gewebeumbau und zur Fibrose bei. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionen des SASP findet sich in Kapitel 1.3.

Erstellt mit Biorender.com. Eigene Darstellung.

Abhängig von ihrer Zusammensetzung, Intensität und der lokalen Gewebemikroumgebung können SASP-Faktoren sowohl protektive als auch pathogene Wirkungen auf benachbarte Zellen und Gewebe ausüben (Gonzalez-Meljem et al., 2018). Die wichtigsten Charakteristika des SASP sind in Abbildung 2 dargestellt. Der SASP ist an physiologischen Prozessen beteiligt, wie der Förderung der Gewebereparatur, der Tumorsuppression und der Stimulierung der Immunüberwachung (Wang et al., 2024) (Gonzalez-Meljem et al., 2018).

Auf der anderen Seite wird dem SASP eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben, die sich unter anderem durch die parakrine Induktion von Seneszenz in umliegenden Zellen, die Förderung von Gewebeumbau und Fibrosierung, die Induktion chronischer Inflammation, die Unterstützung der Tumorprogression sowie die Ermöglichung der Immunflucht von Krebszellen manifestiert. Diese negativen Effekte resultieren häufig aus einer ineffizienten Elimination seneszenten Zellen und deren Akkumulation in Geweben (Chaib et al., 2022).

Unterstützend für diese Hypothese zeigt sich, dass die Belastung durch seneszente Zellen in Geweben mit zunehmendem Alter bei Mäusen, Primaten und Menschen signifikant ansteigt und diese sowohl in benignen als auch malignen Tumoren nachweisbar sind (Campisi, 2013) (Gonzalez-Meljem et al., 2018). Vermutlich schreitet die durch SASP-Faktoren (siehe Tabelle 1) vermittelte parakrine und endokrine Ausbreitung der Seneszenz schneller voran, als das Immunsystem in der Lage ist, bestehende und neu gebildete seneszente Zellen zu eliminieren (Chaib et al., 2022).

Insbesondere die SASP-Faktoren IL-6 und IL-8 nehmen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle bei der Verstärkung der Seneszenz ein (Kuilman and Peeper, 2009) (Ortiz-Montero et al., 2017). IL-6 und IL-8 können darüber hinaus, gemeinsam mit einer Vielzahl weiterer proinflammatorischer Faktoren (siehe Tabelle 1), zur Entwicklung chronischer Entzündungen bei Krebspatienten beitragen (Chambers et al., 2021). Sie fördern Prozesse wie die Zellproliferation, die Angiogenese und Entzündungen sowohl über autokrine als auch parakrine Signalwege (Lopes-Paciencia et al., 2019).

Darüber hinaus umfasst der SASP eine Vielzahl von Proteinen und Enzymen, die an der Reorganisation der ECM beteiligt sind. Zu diesen Enzymen zählen beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 und Serin-/Cysteinproteinase-Inhibitoren (SERPINs) (Lopes-Paciencia et al., 2019) (Schafer et al., 2017).

MMPs spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Modulation von Immun- und Entzündungsreaktionen, indem sie Chemokine prozessieren und dadurch Antagonisten mit antiinflammatorischen Eigenschaften erzeugen. Die daraus resultierende reduzierte Immunüberwachung könnte die Entstehung der protumorigenen Eigenschaften des SASP begünstigen (Lopes-Paciencia et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der SASP ein zentrales Charakteristikum seneszenten Zellen darstellt, der sowohl schützende als auch schädliche Effekte auf Gewebe haben kann und sich durch eine hohe Variabilität auszeichnet. Es wird noch intensiv an der Profilierung des SASP verschiedener Zelltypen gearbeitet, um verbesserte Biomarker und ein umfassenderes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen zu entwickeln (Chambers et al., 2021).

TABELLE 1: WICHTIGE FAKTOREN UND MEDIATOREN DES SASP

Klasse	SASP-Faktoren	Eigenschaften	Referenz
Interleukine	IL-1 α	Profibrotisch, Proinflammatorisch, Immunzellrekrutierung	(Schafer et al., 2017)
	IL-1 β	Förderung Neovaskularisierung	(Dong et al., 2018)
	IL-6	Proinflammatorisch, Profibrotisch	(Gorgoulis et al., 2019)
	IL-8		(Schafer et al., 2017)
Cytokine und Chemokine	CCL2, -20	Induktion parakriner Seneszenz Profibrotisch	(Schafer et al., 2017) (Birch and Gil, 2020)
	CXCL1, -2	Profibrotisch	(Schafer et al., 2017)
	CXCL11	Förderung der Tumormigration	(Hwang et al., 2020)
Wachstumsfaktoren	TGF- β	Induktion parakriner Seneszenz, Profibrotisch	(Huang et al., 2022; Martini and Passos, 2023) (Birch and Gil, 2020; Schafer et al., 2017)
	PDGF-AA	Gewebereparatur	(Demaria et al., 2014)
	VEGF	Induktion parakriner Seneszenz, Proinflammation	(Birch and Gil, 2020)
	IGFBP7	Induktion parakriner Seneszenz	(Severino et al., 2013)
	IGFBP4	Induktion parakriner Seneszenz	(Severino et al., 2013)
Matrix-modellierende-Enzyme	MMPs	Reorganisation der ECM, Modulation von Immunantworten	(Lopes-Paciencia et al., 2019)
		Tumorigenese, profibrotisch	(Schafer et al., 2017)
	PAI 1	Verstärkung des Zellzyklusarrest	(Birch and Gil, 2020)
	SERPINS	Reorganisation der ECM	(Schafer et al., 2017)

1.3.4 SENOLYSE

Die gezielte Entfernung seneszenten Zellen bietet das Potenzial, ihre tumorigenen sowie immunmodulierenden Eigenschaften zu unterdrücken, was sowohl eine Verbesserung des Therapieverlaufs als auch eine Hemmung des Tumorwachstums bewirken könnte. Da die Seneszenz einen irreversiblen, permanenten Zellzyklusarrest darstellt, ergibt sich die zentrale Frage, ob und wie seneszente Zellen in den programmierten Zelltod überführt werden können und welche potentiellen molekularen Zielstrukturen dafür zur Verfügung stehen. Diese gezielte Elimination seneszenten Zellen wird als Senolyse bezeichnet.

Die Identifikation der ersten senolytischen Wirkstoffe erfolgte mittels eines mechanismusorientierten Ansatzes: Es wurde angenommen, dass seneszente Zellen resistent gegenüber Apoptose seien und so der Selbstzerstörung entgehen. Durch Analyse proteomischer und transkriptomischer Datensätze konnte eine Hochregulation spezifischer anti-apoptotischer Signalwege in seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Diese Signalwege, als „Senescent cell anti apoptotic pathways“ (SCAP) bezeichnet, spielen eine Schlüsselrolle für das Überleben seneszenten Zellen. Die gezielte Unterdrückung dieser SCAP führte selektiv zur Apoptose seneszenten Zellen, während nicht-seneszente Zellen, proliferierende, ruhende oder differenzierte Zellen, unversehrt blieben (Chaib et al., 2022) (Zhu et al., 2015). Zu den identifizierten SCAP zählen unter anderem Proteine der B-cell-lymphoma-2-Familie (Bcl-2), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), AKT, p53, p21 sowie das Heat-Shock-Protein 90 (Hsp90) (Zhang et al., 2023). Bioinformatische Analysen identifizierten 46 Wirkstoffe, die SCAP-Signalwege gezielt inhibieren können (Zhu et al., 2015).

Der Tyrosinkinase-Inhibitor Dasatinib sowie das natürliche Flavonoid Quercetin zählen zu den ersten entdeckten senolytischen Substanzen (Zhu et al., 2017). Später erwies sich auch ABT-263 (Navitoclax), ein Inhibitor der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine, als senolytisch wirksam (Zhu et al., 2016). Interessanterweise konnte der selektivere Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) diesen Effekt nicht replizieren, was darauf hindeutet, dass Senolytika ein breiteres Spektrum anti-apoptotischer Effektoren inhibieren müssen, um ihre Wirksamkeit zu entfalten (He and Sharpless, 2017).

FOXO4 (Forkhead Box O4) ist ein Transkriptionsfaktor im Insulin-Signalweg und ein Regulator von ROS. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung eines synthetischen Peptids (FOXO4-DRI) die Interaktion zwischen FOXO4 und p53 blockiert und die Lebensfähigkeit seneszenten Fibroblasten reduziert (Lelarge et al., 2024).

Senolytika der zweiten Generation wurden und werden zunehmend durch Hochdurchsatzdatenscreenings und andere innovative Ansätze identifiziert. Einige Strategien nutzen die erhöhte lysosomale Masse und β -Gal-Aktivität in seneszenten Zellen. Hierbei scheinen Galacto-oligosaccharid-beschichtete Nanopartikel oder β -Galaktosidase-aktivierte Prodrugs senolytische Effekte zu erzielen (Chaib et al., 2022).

Die meisten senolytischen Wirkstoffe wurden mittels Screenings von Substanzbibliotheken entdeckt. Die zunehmende Anwendung künstlicher Intelligenz (KI) bietet jedoch vielversprechende Ansätze zur Identifikation neuer Klassen senolytischer Moleküle. Ihr zukünftiger Beitrag könnte erheblich sein (Lelarge et al., 2024).

Insgesamt bietet die gezielte Eliminierung seneszenten Zellen ein vielversprechendes Potenzial für die Behandlung zahlreicher altersassoziierter und onkologischer Erkrankungen. Besonders in der Onkologie könnte die gezielte Eliminierung seneszenten Zellen und die damit verbundene Begrenzung der Tumorproliferation einen bedeutenden therapeutischen Fortschritt darstellen. Dennoch sind weitere randomisierte kontrollierte Studien erforderlich, um die Sicherheit und potentiellen Vorteile senolytischer Strategien zu bewerten und deren klinischen Einsatz in Erwägung zu ziehen (Chaib et al., 2022).

1.4 VERWENDETE MEDIKAMENTE

1.4.1 NAVITOCCLAX

Navitoclax (ABT-263) ist ein selektiver Antagonist der Proteine der Bcl-2-Familie und hat sich als senolytischer Wirkstoff erwiesen. Durch Bindung an die BH3-Domänen-Bindungstaschen der anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XL und BCL-W hemmt Navitoclax diese und verdrängt die pro-apoptotischen Effektoren BAK und BAX. Dadurch werden apoptotische Signalwege reaktiviert (Zhu et al., 2016) (Kale et al., 2018) (Basu, 2022).

Die senolytischen Eigenschaften von Navitoclax wurden in einer Vielzahl von Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen: Zhu *et al.* berichten über eine Reduktion seneszenten Zellen in Geweben wie dem Gefäßendothel, Lungengewebe und embryonalen Gewebe, unter Schonung des umliegenden Gewebes (Zhu et al., 2016). Carpenter, Saleh & Gewirtz dokumentierten die gezielte Eliminierung seneszenten Lungen- und Melanomzellen durch Navitoclax (Carpenter et al., 2021). Pan et al. zeigten, dass Navitoclax gezielt Apoptose in seneszenten Lungenmyofibroblasten und alveolaren Typ-II-Epithelzellen induziert (Pan et al., 2017). Moncsek et al. demonstrierten zudem die Hemmung der Bcl-Aktivität in seneszenten Cholangiozyten und aktivierten Fibroblasten (Moncsek et al., 2018). Lérida-Viso et al. beobachteten die gezielte Eliminierung seneszenten Kardiomyozyten durch Navitoclax in HL-1-Kardiomyozyten nach Doxorubicin-Behandlung (Lérida-Viso et al., 2022).

Trotz der vielversprechenden senolytischen Eigenschaften von Navitoclax wurden auch signifikante Nebenwirkungen beobachtet. Dazu gehören insbesondere die Neutropenie und Thrombozytopenie, die die klinische Anwendung erschweren. Um eine kontrollierte und selektive Freisetzung des Wirkstoffs in seneszenten Zellen zu ermöglichen, wurden Strategien entwickelt, Nanopartikel als Träger zu nutzen. Die Weiterentwicklung des Bereichs der Senolytika

erfordert weiterhin eine gründliche Evaluierung ihrer Wirksamkeit und Sicherheit in klinischen Studien am Menschen (Zhai and Sadoshima, 2024).

1.4.2 ETOPOSID

Etoposid ist ein potenter Topoisomerase-II-Inhibitor, der sowohl Einzel- als auch Doppelstrang-DNA-Brüche induziert. Topoisomerase II ist ein essenzielles Enzym für die DNA-Replikation und -Transkription (Bailly, 2023). Durch die reversible Komplexbildung von Etoposid mit der Topoisomerase II kommt es zum Abbau der α - und β -Isoformen der Topoisomerase II, wodurch die Religation des DNA-Strangs gehemmt wird (Pommier et al., 2022). Diese irreparablen Schäden führen zu einem Zellzyklusarrest und können seneszente Prozesse auslösen (Bailly, 2023) (Teng et al., 2021) (Nagano et al., 2016). Etoposid wurde bereits in experimentellen Studien erfolgreich zur Seneszenzinduktion eingesetzt (Bang et al., 2019) (Teng et al., 2021). Trotz der Wirksamkeit von Etoposid bei der Seneszenzinduktion kann die Therapie mit dem Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen, wie beispielsweise Haarausfall, gastrointestinaler Toxizität und Myelosuppression als dosislimitierende Toxizität einhergehen (Reyhanoglu and Tadi, 2024).

II. ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biologischen Effekte des sequenziellen Einsatzes von Triggern der Seneszenz und der Senolyse am Modell zweier muriner Pankreaskarzinomzelllinien systematisch zu analysieren.

Konkret untersucht wurde die kombinierte Anwendung des Topoisomerase-II-Inhibitors Etoposid zur Induktion von Seneszenz und des Senolytikums Navitoclax zur gezielten Entfernung seneszenten Zellen an den Zelllinien Panc02 und 6606PDA. Durch Analysen auf den Ebenen des intrazellulären Signaltransfers und der Genexpression sollten darüber hinaus mechanistische Einblicke in die zugrunde liegenden biologischen Prozesse erreicht werden.

Auf Grundlage dieser Zielsetzung lassen sich folgende Arbeitshypothesen ableiten:

- Etoposid als Topoisomerase-II-Inhibitor induziert eine stabile Seneszenz in murinen Pankreaskarzinomzellen.
- Mithilfe des Bcl-2-Inhibitors Navitoclax lassen sich gezielt seneszente Zellen eliminieren.
- Die Ergebnisse sind in zwei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien reproduzierbar.
- Die ausgewählten Seneszenzmarker bieten eine valide und zuverlässige Grundlage zur Bewertung der induzierten Seneszenz.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden beide Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* mit Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Effekte dieser Behandlungen wurden anhand von Proliferationsanalysen zur Bestimmung der Wachstums- hemmung und Zellteilungsaktivität, Seneszenzmarker-Analysen, einschließlich der SA- β -Gal-Färbung zur Detektion seneszenten Zellen, Analysen von SASP-Komponenten sowie Immunfluoreszenz- und Genexpressionsanalysen evaluiert. Auf Grundlage der gewonnenen Ergebnisse wurden die Arbeitshypothesen kritisch überprüft.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 GERÄTE

TABELLE 2: GERÄTE

Gerät	Hersteller
- 150 °C Gefrierschrank	Sanyo Denki GmbH (60915116)
- 20 °C Gefrierschrank	Liebherr
- 80 °C Gefrierschrank	Thermo Fischer Scientific Inc. (50054302)
4 °C Kühlschrank	Robert Bosch GmbH
6 °C Kühlschrank	Liebherr
Anthos Reader	Anthos Labtec instruments GmbH (1098)
Begasungsbrutschrank HERA cell 150	Thermo Fischer Scientific Inc. (40862222)
Biometra Fastblot™	Analytik Jena GmbH & Co. KG
Chemikalienabzug (Tischabzug)	Köttermann GmbH
Eisbereiter – AF 103	Scotsman (3006 ES1L)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories Inc.
Feinanalysewaage ABJ 220-4NM	Kern & Sohn GmbH
Magnetrührer MR 2002	Heidolph Instruments (10667)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG (667234)
Mikroskop Zeiss Axio Observer	Carl Zeiss AG
Mikrotiterschüttler MTS4	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Multipette plus	Eppendorf AG
Nanophotometer P330	Implen Inc
Odyssey CLx Infrared Imager	LI-COR Biosciences (ODY-1790)

Ph-Präzisionsinstrument Fiveeasy	Mettler-Toledo Inc.
Pipetboy	Integra Biosciences AG
Schüttelwasserbad SW 20	Julabo GmbH
Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc.
Power Pac 1000 Stromversorgung	Biorad
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV-Transilluminator	Intas Science Imaging Instruments GmbH
ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Wasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zählkammer, Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zentrifuge Mikro 200 R (2405)	Andreas Hettich GmbH (0000778-02-00)
Zentrifuge Rotina 46 R (4610)	Andreas Hettich GmbH (0003058-01-00)

3.1.2 ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN

TABELLE 3: ALLGEMEINE LABORMATERIALIEN

Material	Hersteller
24-well-Platten	Greiner BioOne International GmbH
4-well-Platten	Thermo Fisher Scientific Inc.
6-well-Platten	Greiner BioOne International GmbH
96-well-half-area-Platten	Greiner BioOne International GmbH
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Deckgläser ø 12 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Einmalhandschuhe	Paul Hartmann AG
Eisbehälter	Carl Roth GmbH & Co. KG
Löffelspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG

Messzylinder	Carl Roth GmbH & Co. KG
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pinzette	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pipetten (5; 10; 50 ml)	Greiner Bio One International GmbH
Pipettenspitzen (2,5 – 5000 µl)	Eppendorf AG
PVDF- Transfermembran	Merck KGaA
Reaktionsgefäße (0,6 – 50 ml)	Eppendorf AG
Serologische Pipetten (10 ml)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Serologische Pipetten (25 ml)	Greiner Bio One International GmbH

3.1.3 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

TABELLE 4: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Lösung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Pan-Biotech
Fetales Kälberserum (FKS), Hitzeinaktiviert	Bio & Sell GmbH (FBS.S0615)
Penicillin/Streptomycin (100x) 10 000 U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc. (11548876)
Phosphate buffered saline (PBS), 10X, pH 7,4	Thermo Fisher Scientific Inc. (10010015)
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Pan-Biotech (P04-18500)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (93595)
Trypsin-EDTA, 0,05 % in PBS	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.4 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ETOPOSID- UND NAVITOCCLAX-BEHANDLUNG

TABELLE 5: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND NAVITOCCLAX

Lösung	Hersteller (Bestellnummer)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (276855)
Etoposid	Hycultec GmbH (HY-13629)
Navitoclax	Hycultec GmbH (HY-10087)

3.1.5 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ-ASSOZIIERTE- β -GAL-FÄRBUNG

TABELLE 6: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ- ASSOZIIERTE- β -GAL-FÄRBUNG

Lösung	Hersteller
2-Propanol	Walter-CMP GmbH & Co. KG (603-117-00-0)
Ethanol, absolut, unvergällt	Walter-CMP GmbH & Co. KG (603-002-00-5)
Ethanol, vergällt – 96 Vol. %	Walter-CMP GmbH & Co. KG (WAL641 1000)
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG (N069.1)
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich (D4551)
Pertex™ mouting medium	MEDITE
Senescence Detection Kit: 100 X Staining Solution, 1 X Fixative Solution, 1X Staining Solution, X-Gal (150 mg, lyophilisiert)	Abcam (ab65351)
Xylol	J. T. Baker

3.1.6 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLPROLIFERATIONSANALYSE

TABELLE 7: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLPROLIFERATIONSANALYSE

Lösung	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU: BrdU-Reagenz, Fix Denat, Antikörper Dilutionslösung, Anti-BrdU-POD, 10 X Waschlösung, Substratlösung	La Roche AG
Schwefelsäure, 1 mol/l, Stopplösung	Merck KGaA

3.1.7 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ-ASSOZIIERTE HETERO-CHROMATIN FOCI-FÄRBUNG

TABELLE 8: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE SENESZENZ-ASSOZIIERTE HETEROCHROMATIN FOCI-FÄRBUNG

Lösung	Hersteller
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, Inc. (S3023)
DAPI	Sigma-Aldrich (D9542)
Methanol	J. T. Baker (8045)

3.1.8 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE NUKLEINSÄUREANALYTIK

TABELLE 9 : ASSAY ON DEMAND KITS

Beschreibung	TaqMan Assay ID	Hersteller
<i>CDK5</i>	Mm01134945_g1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>CDKN1A</i>	Mm004324448_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>CXCL1</i>	Mm04207460_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>CXCL2</i>	Mm00436450_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>IL6</i>	Mm00446190_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Mdm2</i>	Mm01233138_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Serpine1</i>	Mm00435858_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Tgf-β1</i>	Mm01178820_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Trp53</i>	Mm01731287_m1	Thermo Fisher Scientific Inc.

TABELLE 10: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE NUKLEINSÄUREANALYTIK

Lösung	Hersteller (Bestellnummer)
2-Mercaptoethanol, min 98 %	Sigma-Aldrich (M3148)
DEPC-H ₂ O mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetztes <i>Aqua dest.</i>	Sigma-Aldrich (D5758)
DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs (840004)
Ethanol, 75 %	Sigma-Aldrich

MATERIAL UND METHODEN

Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific Inc. (15585-011)
Gel Loading Dye, Purple, no SDS	New England Biolabs (B7025S)
High capacity cDNA reverse Transcription Kit: 10x RT-Puffer, 1 ml; 10x RT Random primer, 1 ml; 25x dNTP mix, 0,2 ml (100 mmol), MultiScribe reverse Transkriptase, 0,1 ml (50 E/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc. (4368814)
Isopropanol	J. T. Baker
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (840004)
NucleoSpin® RNA	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (740955.50)
Takyon™ Low ROX Probe 2X Mastermix dTTP blue	Eurogentec
TBE-Puffer (pH 8,0; 10,78 g TRIS; 5,50 g Borsäure; 0,58 g EDTA; Auf 1 l <i>Aqua dest</i> aufgefüllt)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Wasser, nukleasefrei	Thermo Fisher Scientific Inc. (R0582)

3.1.9 LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNOBLOTANALYSEN

TABELLE 11: PRIMÄRANTIKÖRPER

Lösung	Anmerkung	Hersteller	Katalognummer
Anti-LC3B	Kaninchen, polyklonal	Novus Biologicals, Bio-Techne	NB600-1384SS
Anti-γH2AX	Maus, polyklonal	Novus Biologicals, Bio-Techne	NB100-74435
Anti-H2AX	Maus, monoklonal	R&D Systems, Bio-Techne	MAB3406
Anti-β-Actin	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology	#4970

TABELLE 12: SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Lösung	Anmerkung	Hersteller
IRDye 680CW Anti-Maus IgG	Ziege, polyklonal	LI-COR Biosciences (926-32220)
IRDye 800CW Anti-Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	LI-COR Biosciences (926-32211)

TABELLE 13: LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNOBLOTANALYSEN

Lösung	Anmerkung	Hersteller
Acrylamid	40 %	Bio-Rad Laboratories Inc.
Ammoniumpersulfat	10 %: 100 mg in 1 ml <i>Aqua dest.</i>	Sigma-Aldrich
Anodenpuffer 1 (pH 10,4)	18,17 g Tris (300 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG
	100 ml Methanol (20 %)	RCI Lab Scan
	Auf 500 ml <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Anodenpuffer 2 (pH 10,4)	1,514 g Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
	100 ml Methanol (20 %)	RCI Lab Scan
	Auf 500 ml <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Blocklösung	40 ml Blocking-Puffer	Rockland
	160 ml PBS (pH 7,4)	Gibco
Chameleon Duo Pres-tained Protein Ladder	8-260 kDA	LI-COR Biosciences
Elektrophoresepuffer	27,27 g Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
	9 g SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG
	126,9 g Glycin	RCI Lab Scan
	Auf 9 l mit <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Kathodenpuffer	1,514 g Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
	1,504 g Glycin (40 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG
	100 ml Methanol	RCI Lab Scan
	Auf 500 ml <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
PBS-Tween (pH 7,4)	2 l PBS	Gibco
	2 ml Tween-20	Carl Roth GmbH & Co. KG
Probenpuffer	2 % SDS	Ferak
	10 % Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG
	5 mM EDTA, pH 8,0	Carl Roth GmbH & Co. KG
	62,5 mM Tris, pH 6,8	Carl Roth GmbH & Co. KG
	0,001 % Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
	5 % beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

	Auf 50 ml mit <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	6,06 g Tris (0,5 M)	Carl Roth GmbH & Co. KG
	0,4 g SDS	Ferak
	auf 100 ml <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Stripping-Lösung	43,1 ml <i>Aqua dest</i>	
	3,125 ml Tris (pH 6,7)	Carl Roth GmbH & Co. KG
	1 ml 10 % SDS	Ferak
	350 µL 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamid		Sigma-Aldrich
Transferpuffer	3 g TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG
	14,5 g Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
	10 % Methanol	J. T. Baker
	Auf 1 l <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Trenngelpuffer (pH 8,8)	36,33 g TRIS (1,5 M)	Carl Roth GmbH & Co. KG
	0,8 g SDS	Ferak
	auf 200 ml <i>Aqua dest</i> aufgefüllt	
Tween-20		Carl Roth GmbH & Co. KG

3.1.10 SOFTWARE

TABELLE 14: SOFTWARE

Beschreibung	Version	Hersteller
Biorender		Science Suite Inc.
GraphPad Prism 10	10.2.3	GraphPad Software Inc.
Image Studio Lite Version	5.2.5	LI-COR Inc.
Microsoft Word für Mac	16.16.27	Microsoft
Quant Studio TM	1.2	Applied Biosystems
Zotero	6.0.37	Corporation for Digital Scholarship

3.2 METHODEN

3.2.1 VERWENDETE ZELLEN

Das Fundament der Arbeiten stellten die zwei Pankreaskarzinomzelllinien Panc02 und 6606PDA dar. Die Panc02-Zelllinie wurde im Jahr 1984 von Corbett et al. (Corbett et al., 1984) aus einem 3-Methylcholanthren-induzierten Adenokarzinom des Pankreas einer weiblichen C57BL/6 Maus isoliert. Für die vorliegende Arbeit wurden die Zellen vom National Cancer Institute (Frederick, MD USA) bezogen und unter standardisierten Kulturbedingungen kultiviert. Die Panc02-Zelllinie zeigt morphologische und molekulare Eigenschaften, die denen des PDAC des Menschen ähneln und eignet sich daher als In-vitro-Modell für die Untersuchung der Pathobiologie und Therapie dieser Krebsart. Die 6606PDA-Zelllinie entstammt ursprünglich dem Adenokarzinom des Pankreas einer C57BL/6J-Maus, die nach p48-Cre-induzierten Expression des *Kras*^{G12D}-Onkogen im Pankreas isoliert wurden (Hingorani et al., 2003). Die murine Zelllinie wurde freundlicherweise von Professor David Tuveson (University of Cambridge, Cambridge, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

3.2.2 BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND NAVITOCCLAX

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für die Versuche mit Etoposid, Navitoclax oder dessen Lösungsmittel DMSO (Kontrollen) behandelt. Basierend auf Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe erwies sich eine Konzentration von 1 µM sowohl für Etoposid als auch für Navitoclax als optimal, um einen aussagekräftigen Effekt auf die Zellfunktion ermöglichen, ohne die Zellviabilität in einem Maße zu beeinträchtigen, das die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die endgültigen Konzentrationen, die nach den Behandlungen in allen *wells* vorlagen, waren 1 µM Navitoclax, 1 µM Etoposid und 0,01 % DMSO. Für jeden Versuch wurden Kontrollen mitgeführt, die sowohl ein Standardmedium mit 0,1 % DMSO, als auch eines ohne DMSO enthielten. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich in diesen Versuchen auf Kontrollen mit 0,1 % DMSO.

3.2.3 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Panc02-Zellen benötigen für die Kultivierung *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und einer Antibiotika-Kombination aus 10⁵ U/L Penicillin und 100 mg/L Streptomycin supplementiert wurde. Für die Kultivierung der 6606PDA-Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) verwendet. Auch dieses Medium wurde mit 10 % FKS und einer Antibiotika-Kombination aus 10⁵ U/L Penicillin und 100 mg/L Streptomycin angereichert. Das für die jeweilige Zelllinie (Panc02 und 6606PDA) beschriebene Medium wird im Folgenden als „Standardmedium“ bezeichnet.

Dieses Standardmedium kam in nahezu allen Zellkulturarbeiten zum Einsatz.

Die initial tiefgefrorenen Zellen wurden für ca. 2 min in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert, das Kryokonservierungsmedium entfernt und die Zellen in ihrem jeweiligen vorgewärmten Standardmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend an einer sterilen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom in sterile 6-*well*-Zellkulturplatten überführt und im befeuchteten Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Standardmediumwechsel und die Passagierung erfolgten alle 2-3 Tage bei ungefähr 90 % Konfluenz.

Für die Passage wurden die Zellen zunächst mikroskopisch beurteilt, um dasjenige *well* auszuwählen, das die höchste Zelldichte, ohne vollständige Konfluenz, aufwies und gleichzeitig die geringste Anzahl an abgestorbenen Zellen zeigte. Nach Auswahl des passenden *well*s erfolgte die Ablösung der adhären Zellen von der Plastikoberfläche der Zellkulturplatte durch die enzymatische Spaltung mithilfe der Protease Trypsin. Vor Zugabe von 0,5 ml Trypsin wurde das alte Standardmedium abpipettiert und das *well* einmal mit 1 ml PBS, pH 7,4 gespült. Das Trypsin wurde 1 min bei Raumtemperatur (RT) auf den Zellen belassen. Anschließend wurde es abpipettiert und die Zellen weitere 5 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Die Trypsin-Spaltung wurde mithilfe des Standardmediums (2,5 ml je *well*) abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden anschließend 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl des Vitalfarbstoffes Trypanblau (1:1 Verhältnis) vermischt und die Zellzahl unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Grundlage dafür bildete die folgende Gleichung:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{Mittelwert Zellzählung} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammervolumen}$$

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1.400 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in frischem Standardmedium resuspendiert. Mithilfe der Kenntnis über Zellzahl und Konzentration konnte die Menge an Standardmedium und Zellsuspension bestimmt werden, die benötigt wurden, um die exakte Zellzahl für die Passage oder den jeweiligen Versuch auszusäen.

3.2.4 ZELLVIABILITÄTSZÄHLUNG MIT TRYPANBLAU

Der Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Zellviabilität der Panc02- und 6606PDA-Zellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest quantifiziert. Trypanblau, ein anionischer Diazofarbstoff, dringt ausschließlich in tote Zellen ein.

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Zellen wurden auf 24-well-Platten ausgesät. Pro well wurde eine Zelldichte von 25.000 Zellen in 450 µl Standardmedium eingesät. Die Zellen wurden mit 1 µM Etoposid, 1 µM Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 48 h.

METHODE

Nach einer Behandlungsdauer von 48 h wurden die adhärent gewachsenen Zellen enzymatisch mithilfe von Trypsin gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension kurz zentrifugiert, das alte Medium abgenommen und mit 100 µl Standardmedium je well resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden im nächsten Schritt 25 µl mit 25 µl des vitalen Farbstoffes Trypanblau versetzt. Die Zellzahl wurde für jede Behandlung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde sowohl die Anzahl an lebenden als auch die Anzahl an toten Zellen gezählt. Mithilfe der folgenden Gleichung ließ sich die Zellzahl/µl errechnen:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{Mittelwert Zellzählung} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammervolumen}$$

3.2.5 SENESZENZ-ASSOZIIERTE-β-GALAKTOSIDASE-FÄRBUNG

Zur Analyse des Einflusses von Etoposid und Navitoclax auf die Seneszenz der Panc02- und 6606PDA-Zellen wurde der „Seneszenz-assoziierte-β-Galaktosidase-(SA-β-Gal)-Assay“ verwendet.

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Zellen wurden auf 24-well-Platten ausgesät, nachdem zuvor sterile Glasplättchen in jedes well eingelegt wurden. Pro well wurde eine Zelldichte von 5.000 Zellen in 450 µl Standardmedium eingesät. Am ersten Tag nach der Einsaat erfolgte die Behandlung der Zellen mit 1 µM Etoposid, 1 µM Navitoclax oder der Kombination beider.

FÄRBEMETHODE

Bei dem SA- β -Gal-Assay handelt es sich um eine Methode zur histochemischen Detektion der Aktivität des Enzyms β -Gal in Zellen mithilfe des synthetischen Substrates X-Gal. Diese beruht auf der Spaltung des chromogenen Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal) durch die intrazelluläre β -Gal in 5-Brom-4-chlor-infoxyl. Durch den Sauerstoff der Umgebungsluft folgt die Oxidierung von 5-Brom-4-Chlor-Infoxyl zu 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo. Senescente Zellen lassen sich durch die sichtbare Blaufärbung lichtmikroskopisch detektieren. Die Färbung der SA- β -Gal erfolgte mithilfe des *Senescence-Detection-Kits*. Die *Staining Supplements* des Kits wurden mindestens 1 h vor Versuchsbeginn unter regelmäßigem Vortexen aufgetaut.

Die primäre Behandlung der Zellen erfolgte nach oben beschriebenem Schema. Anschließend wurde aus jedem *well* das Standardmedium entfernt und durch Zugabe von 0,5 ml PBS, pH 7,4 je *well* einfach gespült. Daraufhin wurden die Zellen mithilfe der Fixier-Lösung des Kits (300 μ l je *well*) 10-15 min bei RT fixiert. Währenddessen wurde die Färbe-Lösung nach vorgegebenem Schema (24-*well* Platte, je *well*) angesetzt:

- 313,3 μ l *Staining Solution*
- 3,3 μ l (aufgetaute, kristallfreie, gevortexte) *Staining Supplements*
- 16,6 μ l X-Gal (20 mg/ml in DMF)

Nach Ablauf der Zeit wurde die Fixier-Lösung abpipettiert und jedes *well* 2-fach mit 300 μ l PBS, pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurden zu jedem *well* 300 μ l der Färbe-Lösung gegeben und die Platten über Nacht im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt, 98 % Luftfeuchtigkeit). Am nächsten Tag erfolgte initial eine mikroskopische Kontrolle der Blaufärbung, bevor die Fixier-Lösung abpipettiert und jedes *well* mit 500 μ l PBS, pH 7,4 gewaschen wurde. Um eine einheitliche Färbung der Zellkerne zu gewährleisten und dadurch die Blaufärbung der seneszenten Zellen zu quantifizieren, wurden anschließend in jedes *well* 300 μ l Kernechtrot hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Parallel dazu erfolgte die Beschriftung der Objektträger. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 500 μ l Aqua dest. gewaschen und anschließend in vier Schritten entwässert:

- 1x 300 μ l 70 % Ethanol (vergällt) für 3 min
- 1x 300 μ l 98 % Ethanol (vergällt) für 3 min
- 1x 300 μ l Isopropanol für 5 min
- 3x 300 μ l Xylol für je 5 min auf der Glasplatte unter dem Abzug

Anschließend wurden die Glasplättchen aus jedem *well* entnommen und mit den Zellen in Blickrichtung nach unten in Pertex eingebettet und auf dem Objektträger befestigt. Nach einer kurzen Trocknungszeit konnten die Zellen mikroskopisch ausgewertet werden.

AUSWERTUNG

Um eine objektive Datenerhebung zu ermöglichen, erfolgte eine Anonymisierung und Verblindung der Proben durch eine dritte Person. Für die Auswertung bestimmten zwei unabhängige Personen lichtmikroskopisch die Zelldichte, sowie den Anteil an SA- β -Gal exprimierender Zellen. Dazu wurden je 100 Zellen gezählt und anteilig der Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen bestimmt. Die teilweise flächige Anfärbung der Glasplättchen erschwerte die direkte Zählung der Zellen. Daher wurde ein semiquantitatives Scoring-System genutzt, das sowohl die Zellmenge als auch die Anzahl der blau gefärbten Zellen erfasste. Die Punkteskala reichte hierbei für die Zelldichte von 0 Punkten für keine sichtbaren Zellen bis zu 5 Punkten für eine hohe Zelldichte und für den Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen von 0 Punkten für keine sichtbaren bis zu 5 Punkten für einen hohen Anteil.

3.2.6 ZELLPROLIFERATIONSANALYSE

Die Zellproliferation wurde mithilfe des *Cell Proliferation ELISA* von Roche analysiert. BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) ist ein synthetisches Nukleosid-Analogon, das anstelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Durch Denaturierung und Fixierung der Zellen können die BrdU-Basen freigelegt und mittels Antikörperbindung markiert werden. Die an den Anti-BrdU-Antikörper gekoppelte Peroxidase (POD) katalysiert anschließend die Farbreaktion des zugegebenen farblosen Substrates Tetromethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt. Die Intensität der blauen Farbe korreliert mit der Menge des BrdU in den Zellen und verhält sich proportional zur Menge der umgesetzten DNA und damit der Zellproliferation.

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Aussaat der Panc02- und 6606PDA-Zellen erfolgte in 96-well *half area* Mikrotiterplatten (1.000 Zellen je well in 45 μ l Standardmedium). Daraufhin wurden die Zellen 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen analog der Stimulation des SA- β -Gal-Assays. 8 h vor Ende der Inkubationszeit wurden je 5 μ l einer mit Standardmedium verdünnten BrdU-Lösung zu jedem well hinzugegeben. Die Konzentration von BrdU lag bei 10 μ mol/l in jedem well. Die Platten wurden 8 Stunden im Brutschrank inkubiert.

METHODE

Zur Bestimmung und Vergleichbarkeit des Konfluenzgrads erfolgte eine mikroskopische Begutachtung der Zellen. Das Standardmedium wurde aus den wells entfernt und die Zellen für 30 min bei RT mit 100 μ l *FixDenat* je well inkubiert. Durch das *FixDenat* ließen sich die Zellen fixieren und gleichzeitig die DNA denaturieren ein entscheidender Schritt, um die anschließende Bindung des Antikörpers an BrdU zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Lösung

vorsichtig abgesaugt, und die Platte durch Klopfen auf ein saugfähiges Papier getrocknet. Der monoklonale Anti-BrdU-Peroxidase Antikörper wurde zunächst für 10 min in Aqua dest. resuspendiert und anschließend in einer 1:100 Verdünnung mit der Antikörperverdünnungslösung (Flasche 5) verdünnt. Zu jedem *well* wurden 50 µl dieser Lösung gegeben und die Platte 90 min bei RT auf einem Schüttler bei 300 U/min inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde die Platte durch Klopfen auf ein saugfähiges Papier getrocknet. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung. Hierfür wurden in jedes *well* 100 µl der Waschlösung gegeben. Zuvor wurde der Waschpuffer (Flasche 5) in einem 1:10 Verhältnis mit Aqua dest. verdünnt. Nach erneutem Trocknen der Platte folgte die Substratreaktion durch Zugabe von 50 µl Tetramethyl-benzidin (TMB) zu jedem *well*. Die an den Antikörper gebundene Peroxidase katalysierte die Oxidation des TMB und führte innerhalb weniger Minuten zu einem Farbumschlag von farblos zu blau. Um diesen Farbumschlag frühzeitig zu registrieren, wurde die Platte auf einem weißen Untergrund platziert. Der Farbumschlag war proportional zu der Menge an gebundenem Anti-BrdU-POD. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (1 mol/l) pro *well* abgestoppt, was zu einem Farbumschlag nach gelb führte. Die Extinktion jeder Probe wurde photometrisch bei 450 nm mithilfe eines ELISA-Readers gemessen. Nach Subtraktion des Leerwertes (unbeschickter *well*s) wurde die Extinktion jeder Probe auf die Extinktion einer Kontrollprobe normiert. Die Messung der BrdU Inkorporation ermöglichte den Vergleich der relativen DNA-Syntheseleistung unterschiedlicher Proben. Proben mit einer höheren Extinktion wiesen eine höhere DNA-Syntheserate auf.

3.2.7 SENESZENZ-ASSOZIIERTE HETEROCHROMATIN FOCI-FÄRBUNG

Bei DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung der DNA verwendet wird. DAPI bindet stark an Adenin-Thymidin-reiche Regionen in der DNA-Doppelhelix und emittiert bei UV-Anregung (365 nm) blaues Licht (460 nm).

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Zur Vorbereitung der DAPI-Färbung wurden 40 ml Methanol mit 2 µl DAPI (5 mg/ml) in einem lichtundurchlässigen 50-ml-Reaktionsgefäß aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die Zellen wurden analog zum SA-β-Gal-Assay auf Glasplättchen in 24-*well*-Platten ausgesät und nach gleichem Schema mit Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider behandelt.

METHODE

Nach Inkubation wurde das Standardmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS, pH 7,4 je *well* gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten unter gedämpftem Licht, um das Ausbleichen des DAPI durch Lichteinfall zu minimieren und damit einer Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. Zunächst wurden 400 µl der eiskalten Methanol-DAPI-Mischung jedem *well* zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen zweifach mit je 500 µl PBS, pH 7,4 gespült und jeweils weitere 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten in je 6 µl Dako (Fluoreszenzeinbettmedium) auf einem Objektträger fixiert und bei 4 °C gelagert.

AUSWERTUNG

Zur Quantifizierung der Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Foci (SAHF) wurden Aufnahmen der Zellen mit dem ZEISS *Cell Observer* Mikroskop gemacht. Hierfür wurde ein 20x PlanApo Objektiv in Kombination mit einem DAPI-Filter verwendet, das eine detaillierte Visualisierung der SAHF-Strukturen ermöglichte. Um eine objektive Auswertung zu gewährleisten, wurden die Proben und dokumentierten Bilder durch eine dritte Person verblindet. Zwei unabhängige Personen analysierten anschließend die Anzahl der SAHF-Strukturen in 20 Zellkernen pro Bild.

3.2.8 NUKLEINSÄUREANALYTIK

Um die Effekte von Etoposid und Navitoclax auf die Expression der in Tabelle 9 genannten Gene zu untersuchen, wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time PCR*, *qPCR*) genutzt. Sie ermöglicht die spezifische Detektion sowie die absolute und relative Quantifizierung von Ziel-Sequenzen in einer Probe. Um die relative Genexpression zu analysieren, kam für die anschließende Auswertung die $2^{\Delta\Delta\text{-CT}}$ -Methode zur Anwendung. Die Expression jedes untersuchten Gens wird hierbei zunächst auf die eines konstant exprimierten Haushaltsgens abgeglichen. Anschließend wurde die Expression der Gene noch auf die einer unbehandelten Kontrolle normalisiert, um experimentell induzierte Veränderungen in der Expression zu identifizieren.

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Für die Analyse der Expression der Zielgene in den zwei Zelllinien wurden die Panc02- und 6606PDA-Zellen auf 12-*well* Platten ausgesät. Je *well* wurden 100.000 Zellen in 900 µl ausgesät. Nach Abschluss der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax wurde das Standardmedium von der Platte entfernt und die Platte anschließend bei –80 °C gelagert.

RNA ISOLATION

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA-Kit von Macherey-Nagel. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Der Puffer wurde initial unter dem Abzug in zwei 5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt: Für 20 Proben benötigte man eine Mischung aus 7,7 ml des Lysis Buffers RA1 und 77 µl des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol. 353,5 µl dieses Gemischs wurde in jedes *well* pipettiert. Um die Zelllyse zu vervollständigen, wurden die Zellen im nächsten Schritt mechanisch homogenisiert. β -Mercaptoethanol diente zusätzlich zur Inaktivierung der RNasen. RNasen sind Enzyme, die RNA abbauen und somit die Integrität der RNA beeinflussen können. Die gewonnene Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und gevortext. Anschließend wurde die Zellsuspension zur Reduzierung der Viskosität und Klärung des Zelllysates durch eine NucleoSpin-Filtersäule zentrifugiert (11.000 g für 1 Minute). Die Pufferkomponenten des RA1-Puffers stellten hierbei den optimalen pH-Wert für die Bindung der RNA an die Silica-Membran der Säule ein. Nach Abwurf des Filters wurde zur Vermeidung von RNA-Kontamination sowie zur Verstärkung der RNA-Bindung an die Membran im folgenden Schritt 350 µl 70 %iges Ethanol auf das homogenisierte Lysat gegeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Komponenten vermisch. Anschließend wurden sie erneut durch eine NucleoSpin-Filtersäule filtriert und bei 11.000 g für 30 s zentrifugiert. Nach Abwurf des Filtrats, wurde die Membran auf ein neues 2 ml Sammelgefäß platziert. Um anhaftende Salze von der Membran zu entfernen, wurden anschließend 350 µl *Membrane-Desalting-Buffer* (MDB) auf jede Membran pipettiert und die Röhrchen 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der rDNase-Reaktions-Puffer in sterile 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen angesetzt, indem jeweils 10 µl rekonstituierte rDNase mit 90 µl Reaktionspuffer für rDNase gemischt wurden. Die gezielte Degradation der nach Zelllyse verbleibenden genomischen DNA durch spezifische rDNase gewährleistete eine höhere Reinheit der isolierten RNA. Von dem Puffer wurden 95 µl auf jede Membran gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Um unerwünschte Kontaminationen zu entfernen und die gereinigte RNA zu eluieren, wurde ein mehrstufiges Wasch- und Elutionsprotokoll eingehalten: Im ersten Schritt wurden je 200 µl RAW2-Puffer auf die Membran pipettiert und die Säulen für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde die Membran auf ein neues Röhrchen platziert. Im zweiten Waschschrift wurden 600 µl RA3-Puffer auf jede Membran gegeben und für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Membranen in die ursprünglichen Röhrchen eingesetzt. Im dritten Waschschrift folgte die Zugabe von 250 µl RA3-Puffer auf jede Membran, gefolgt von einer zweiminütigen Zentrifugation bei 11.000 g. Die Membranen wurden auf nukleasefreie 1,5 ml Reaktionsgefäße platziert und auf jede Membran wurden 40 µl RNase freies Wasser pipettiert, um die gebundene RNA zu eluieren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 g für eine Minute. Die eluierte RNA befand sich nun in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen und konnte für nachfolgende Analysen verwendet werden.

RNA KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben mithilfe der Spektralphotometrie am Implen NanoPhotometer. Die verdünnten RNA-Proben wurden in die Küvetten des NanoPhotometers pipettiert. Um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten, erfolgte zunächst eine Kalibrierung des NanoPhotometers mit der Referenzlösung. Die Quantifizierung der RNA basierte auf der Messung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm unter monochromatischem Licht. Da Nukleinsäuren, wie RNA, ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, war die gemessene Absorption proportional zur RNA-Konzentration der Probe. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Konzentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = OD * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Da Proteine, die Verunreinigungen in den RNA-Proben darstellten, bei 280 nm Licht absorbieren, konnte durch Bildung des Quotienten aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm zusätzlich Rückschluss auf die Reinheit der Proben gezogen werden. Bei Werten über 1,8 galt die extrahierte RNA als relativ rein.

AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Um zusätzlich zu der Reinheit der RNA auch die Qualität zu untersuchen, wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Bandenmuster auf dem Agarosegel ermöglichten dabei die Beurteilung der RNA-Integrität.

Für die Elektrophorese wurde ein 1 %iges Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurde zunächst 1 g Agarose in 100 ml 0,5 x Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat (TBE) Puffer in 0,1 % Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H₂O) aufgekocht. Anschließend wurde es mit 0,5 µl Ethidiumbromid unter dem Sicherheitsabzug gefärbt. Bei Ethidiumbromid handelte es sich um einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die Doppelhelix der Nukleinsäuren einlagerte und unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung mit einem Kamm für die Probentaschen in eine vorgefertigte Kammer gegossen. Der Probekamm wurde nach dreißigminütiger Aushärtung entfernt, das Gel in eine Elektrophorese Kammer gelegt und mit dem 50 %igen TBE-Puffer bedeckt. Die RNA-Proben wurden in die Probentaschen pipettiert. Zuvor wurde je 1 µg RNA je Probe in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit nukleasefreien H₂O gelöst und mit 2 µl 6x *Ladepuffer* versetzt. Zur Größenbestimmung der RNA-Fragmente diente ein 1 kB DNA-Marker. Das Gel wurde für 1 h an eine Spannung von 100 V angeschlossen. Die RNA-Moleküle wanderten im elektrischen Feld durch das Agarosegel und bildeten dabei Banden. Die Banden wurden mithilfe eines UV-Transilluminators visualisiert. Bei nicht-degradierter RNA erkannte man typischerweise zwei scharfe Banden, die der

ribosomalen 18S- und 28S-RNA. Anhand dieser ließ sich die Qualität der RNA abschätzen. Bei degradierter RNA zeigten sich diese Banden unscharf oder waren nicht sichtbar.

CDNA SYNTHESE

Da die meisten qPCR-Enzyme ausschließlich DNA amplifizieren können und cDNA im Vergleich zu RNA stabiler und spezifischer für qPCR-Primer ist, war eine Umwandlung der RNA in cDNA erforderlich. Dafür wurden reverse Transkriptasen genutzt, die das Umschreiben der mRNA katalysieren. Als Matrize der cDNA fungiert hierbei die Abfolge der Sequenzen der mRNA. Mithilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems erfolgte ein Umschreiben der RNA in komplementäre, einsträngige DNA (cDNA). Um die Ergebnisse zu standardisieren, wurde die RNA-Konzentration aller Proben auf 250 ng RNA vereinheitlicht. Dazu wurde für jede Probe anhand der RNA-Konzentration eine Verdünnung berechnet und in 600 µl Reaktionsgefäße pipettiert. Die Proben wurden mit nf-H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der qPCR-Mastermix (siehe Tabelle 15) vorbereitet und jeder Probe 10 µl zugegeben. Die Proben wurden gründlich vermischt und anschließend nach folgendem Schema inkubiert:

1. 10 min bei 25 °C
2. 120 min bei 37 °C
3. 5 min bei 85 °C

Nach der Inkubation wurden zu jeder Probe 40 µl nukleasefreies H₂O gegeben und diese bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert, um eine Degradation der cDNA zu verhindern.

TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG MASTERMIX ZUR REVERSE TRANSKRIPTION EINER RNA-PROBE

Bestandteil	Volumen
10X Puffer	2,0 µl
dNTPs	0,8 µl
nf-H ₂ O	4,2 µl
Random Primer	2,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl

REAL TIME PCR

Die Real-Time PCR-Methode wurde unter Verwendung der TaqMan-Technologie zur Quantifizierung der cDNA-Transkripte durchgeführt. Die Echtzeit-PCR bezeichnet eine Polymerase-Kettenreaktion, die die quantitative Messung der neu entstandenen DNA-Fragmente während der Reaktionsprozesse, also in Echtzeit, bestimmt. Die Reaktionsmischung (*Assay-on-Demand*) enthält dabei die spezifischen Primer sowie Sonden für die cDNA. Weiterhin wird ein DNA-Polymerase enthaltender Mastermix erstellt.

Ein Amplifikationszyklus der qPCR besteht aus Denaturierungs-, Primer-Hybridisierungs- und Elongationsphasen. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte bei 95 °C. Anschließend folgte die Primer-Hybridisierung, das *Annealing*. Hierbei kühlt die Probe auf 60 °C ab, sodass die spezifischen Primer an die komplementären Zielsequenzen der DNA binden können. Zusätzlich binden auch die genspezifischen Taqman Sonden während der Hybridisierungsphase an ihre komplementären DNA-Sequenzen. Bei den Sonden handelt es sich um modifizierte Oligonukleotide, die an ihren 5'-Ende ein fluoreszierendes Molekül, den Reporter, und an ihrem 3'-Ende ein weiteres Molekül, den Quencher besitzen. Die räumliche Nähe der beiden Moleküle (Fluorophore) ermöglicht den Transfer der Fluoreszenzresonanzenergie des Reporters auf den Quencher, wodurch die Emission des Reporters unterdrückt wird, solange die Sonde intakt bleibt. Dieses Phänomen wird FRET-Effekt genannt, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*. Während der folgenden Elongationsphase synthetisiert die Taq-Polymerase komplementäre DNA-Stränge. Durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität spaltet die Taq-Polymerase auch die an die Matrizen-DNA angelagerten Sonden. Durch die enzymatische Spaltung hebt sie durch die entstehende räumliche Trennung von Quencher und Reporter den FRET-Effekt auf. Dadurch wird eine Detektion der emittierten Fluoreszenzphotonen möglich. Jeweils 2,5 µl cDNA wurden in dreifacher Replikation in die Vertiefungen einer 96-*well*-Multititerplatten pipettiert. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Um Probenverluste zu minimieren, wurden *Low-Retention* Filterspitzen verwendet. Zusätzlich wurden noch 10 µl des PCR-Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 16) in jede Vertiefung pipettiert.

TABELLE 16: ZUSAMMENSETZUNG DES PCR-MASTERMIXES, JE PROBE

Bestandteil	Menge
Primer/Sonden Kombination	0,625 µl
nf-H ₂ O	3,125 µl
Mastermix	6,250 µl

Zum Schutz vor Verschmutzung der Proben wurde die Platte mit einer Folie abgedichtet, kurz zentrifugiert und anschließend in den Echtzeit-PCR-Cycler eingesetzt. Das folgende Temperaturprotokoll wurde für die qPCR verwendet:

TABELLE 17: PROTOKOLL DER PCR ZYKLEN

Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1	95	5:00 min
45	95	0:15 min
	60	1:00 min

Während der Amplifikation der DNA steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals ab einer gewissen Anzahl an durchlaufenen Zyklen an. Sobald das Signal einen definierten Schwellenwert (engl. Threshold Cycle, Ct-Wert) überschreitet, registriert das Gerät die entsprechende Zyklusnummer und gibt sie als Ct-Wert an. Dieser Schwellenwert kann nachträglich angepasst werden. Der Ct-Wert ermöglicht eine quantitative und vergleichende Aussage über die Ausgangsmenge der Ziel-DNA-Sequenz, wobei ein niedriger Ct-Wert mit einer höheren Anfangskonzentration der Zielsequenz korreliert.

AUSWERTUNG

Mithilfe der Software „Quant Studio Real Time PCR Version 1.2“ erfolgte die Auswertung der PCR-Daten. Durch Subtraktion des Ct-Wertes des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) von dem Ct-Wert der Probe konnte das Ergebnis im ersten Schritt normalisiert werden:

$$\Delta Ct = Ct_{probe} - Ct_{HPRT}$$

Dadurch ließen sich etwaige Schwankungen in der Gesamtmenge der cDNA und Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription ausgleichen. Um die experimentell induzierte Veränderung der Gene zu identifizieren, folgte im nächsten Schritt die zweite Normalisierung. Hierfür wurde für jede Probe der CT-Wert derselben unbehandelten Probe subtrahiert:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{probe} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

Die PCR ist ein exponentieller Prozess, die DNA-Menge verdoppelt sich mit jedem Schritt. Um von der Änderung im $\Delta\Delta Ct$ -Wert Rückschlüsse auf die Änderung der DNA-Menge ziehen zu können, folgte diese Berechnung:

$$relative\ Expression = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{1}{2^{\Delta\Delta Ct}}$$

Das Ergebnis gibt die relative Veränderung der Genexpression an. Dadurch lassen sich die Gruppen untereinander vergleichen und Unterschiede in der Genexpression in Hinsicht auf die Behandlung analysieren.

3.2.9 IMMUNOBLOT-ANALYSEN

Das Immunoblotting (auch als Western Blotting bezeichnet) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Proteinexpression in Zellen. Während der Seneszenz kommt es zu einer Reihe von zellulären Veränderungen, die sich auf molekularer Ebene durch Veränderungen in der Proteinexpression detektieren lassen. In dieser Arbeit wurde die Expression der Proteine LC3B, H2AX und γ H2AX analysiert.

VERSUCHSBEDINGUNGEN

Die Zellen wurden auf 24-*well*-Platten (25.000 Zellen je *well*, in 450 μ l Standardmedium) ausgesät. Am ersten Tag nach der Einsaat folgte die Behandlung mit 1 μ M Etoposid, 1 μ M Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen. Die Behandlungsdauer betrug 48 h.

PROBENGEWINNUNG

Der Probenpuffer wurde in einem 10 ml Reaktionsgefäß vor Ende der Inkubationszeit auf 95 °C erhitzt. Die Zusammensetzung des Probenpuffers entsprach der in der Tabelle 13 angegebenen Rezeptur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt. 300 μ l des heißen Probenpuffers wurden anschließend auf jedes *well* pipettiert und vorsichtig auf- und abpipettiert, um eine homogene Verteilung des Zelllysates zu gewährleisten. Der Probenpuffer enthielt Natriumdodecylsulfat (SDS), ein Detergens, das die Proteinstruktur auflöst und die Proteine in ihre Einzelbestandteile, die Polypeptidketten, denaturiert. Zusätzlich war als Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol im Probenpuffer enthalten, welches Disulfidbrücken in Proteinen spalten kann und ebenfalls denaturierend wirkt. Das Gemisch wurde daraufhin in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 2 min auf 95 °C erhitzt, um die Denaturierung der Proteine zu vervollständigen. Bei 95 °C binden die negativ geladenen Sulfatketten der SDS-Moleküle an die positiv geladenen Aminosäuren an der Außenseite der Polypeptidketten. Durch die SDS-Bindung erhalten alle Proteine eine stark negative Gesamtladung. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und bei -20 °C gelagert, bis sie für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet wurden.

SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine elektrophoretische Trennmethode, bei der Proteine aufgrund ihrer Ladung und Größe voneinander separiert werden. Die negativ geladenen Proteine wandern in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel zur Anode. Da die Eigenladung der Proteine im Vergleich zur SDS-Ladung vernachlässigbar gering ist, erfolgt die Trennung ausschließlich nach ihrer Größe. Dabei wirken die Poren im Gel wie ein Sieb, durch das kleinere Proteine schneller wandern können als große. Für die SDS-PAGE wurden zwei Gele verwendet: ein Sammelgel und ein Trenngel.

Das 8 % feinporige Trenngel wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß angesetzt (siehe Tabelle 13). Um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern, eine homogene Gelbildung zu gewährleisten und die Gelierzeit zu kontrollieren, wurden Tetraethylethylendiain (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) erst zuletzt hinzugefügt. Anschließend wurde das flüssige Trenngel vorsichtig in eine Minigel-Kammer gegossen. Zur Vermeidung von Luftblasen an der oberen Gelkante wurde das Gel mit einer dünnen Schicht destilliertem Wasser bedeckt. Während der 30-minütigen Polymerisation des Trenngels diente die Wasserschicht zusätzlich als Barriere gegen Luftsauerstoff. Anschließend wurde das destillierte Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel geschichtet. Um die Probenaschen zu formen und eine ebenfalls luftdichte Polymerisation des Sammelgels zu gewährleisten, wurde ein Probenkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Gele vorsichtig mitsamt den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde anschließend mit Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 13) befüllt und der Probenkamm entfernt. Anschließend wurden 10 µl jeder Probe in die Probenaschen des Trenngels geladen. Zusätzlich wurden 2,5 µl des *Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder* als Molekulargewichtsmarker in eine der äußeren Taschen des Sammelgels pipettiert. Der Probenpuffer enthielt Glycerol, um die Dichte der Proben zu erhöhen und so die Ansammlung am Boden der Probenaschen zu gewährleisten. Dies verhinderte ein Verlaufen der Proben während der Elektrophorese. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für eine Dauer von 30 min. Während der Elektrophorese wanderten die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine war dabei größenabhängig. Um den gleichzeitigen Eintritt aller Proteine in das Trenngel zu gewährleisten, fand ein Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert Verwendung. Der Elektrophoresepuffer enthielt Glycin und Chloridionen. Diese Ionen wanderten während der Elektrophorese ebenfalls im elektrischen Feld. Durch den geringen pH-Wert im Sammelgel migrierten die Glycinionen deutlich langsamer zur Anode als die Chloridionen. Diese unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten führten zur Komprimierung der Proteinproben zwischen den Glycin- und Chloridionen. Dieser Effekt resultierte in einer schmalen Startzone im anschließenden

Trenngel. Dadurch wurde die Auflösung der Proteinbanden verbessert. Im Trenngel hingegen lag ein höherer pH-Wert vor, der die meisten Glycinionen negativ lud. Infolgedessen wanderten die Glycinionen schneller zur Anode und hoben den komprimierenden Effekt auf. Die Proteine wurden nun nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei Proteine mit einer geringeren Molekülmasse schneller migrierten als solche mit einer größeren. Um die Laufgeschwindigkeit zu erfassen und den Zeitpunkt des Elektrophoreseendes zu bestimmen, enthielt der Probenpuffer den Farbstoff Bromphenolblau. Dieser Farbstoff migrierte schneller als die Proteine und bildete somit eine blaue Front im Gel.

PROTEINTRANSFER, SEMI DRY BLOTTER

Nach der SDS-PAGE erfolgte der Proteintransfer von dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) mithilfe eines Semi-Dry-Blotters. Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Sammelgel abgetrennt. Der Transfer erfolgte mithilfe der „Sandwich“-Technik, die einen gleichmäßigen Kontakt zwischen Gel und Membran gewährleistet und so den Transferprozess optimiert. Um die Hydrophobie der Membran zu reduzieren, wurde diese für 2 s in Methanol gelegt, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min in Transferpuffer eingeweicht. Der Aufbau des Semi-Dry-Blots erfolgte von oben nach unten gemäß folgendem Schema:

1. Kathodenseite der Blotting-Kassette
2. 3 Blätter mit Kathodentransferpuffer (siehe Tabelle 13) getränkte Filterpapiere (90x60x1 mm)
3. Polyacrylamidgel (um 180 Grad gewendet, der PVDF-Membran zugewandt)
4. 1 Blatt mit Anodentransferpuffer 1 (siehe Tabelle 13) getränktes Filterpapier
5. 2 Blätter mit Anodentransferpuffer 2 (siehe Tabelle 13) getränktes Filterpapier
6. Anodenseite der Blotting-Kassette

Um Lufteinschlüsse zwischen den Schichten zu vermeiden, wurde das Sandwich mithilfe einer Rolle ausgestrichen. Durch die Anoden-seitige Ausrichtung der Membran in Relation zum Gel wanderten die negativ geladenen Proteine nach Anlegen einer konstanten Spannung von 400 mA für 105 min vom Gel zur positiv geladenen Anode und wurden auf der Membran fixiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran aus dem Blot-Sandwich entnommen und für den anschließenden spezifischen Proteinnachweis präpariert.

SPEZIFISCHER PROTEINNACHWEIS

Die Membran wurde in eine Plastikbox transferiert und in PBS (pH 7,4) gewaschen, um Rückstände des Transferpuffers zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 1 h in verdünntem *Odyssey Blocking Buffer* (1:5 mit PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten auf einem Horizontalschüttler. Während der Inkubationszeit wurden 10 µl des Primärantikörpers in verdünntem *Odyssey Blocking Buffer* (1:5 mit PBS) mit 0,1 % Tween-20 gelöst. Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper stammten entweder aus Kaninchen oder Mäusen. Um die Zielproteine auf der Membran zu markieren, wurde diese im nächsten Schritt mit 5 ml der verdünnten Antikörperlösung (siehe Tabelle 18) bedeckt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten vier Waschschritte von je 5 min mit PBS (pH. 7,4) und 0,1 % Tween-20 bei Raumtemperatur, um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Während der Inkubationszeit wurden 10 µl des Sekundärantikörpers in verdünntem *Odyssey Blocking Buffer* (1:5 mit PBS) mit 0,1 % Tween-20 gelöst. Die Membran wurde anschließend 30 min mit 5 ml des verdünnten Sekundärantikörpers inkubiert. Der Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper, der Spezies-spezifisch die Fc-Regionen der zuvor applizierten Primärantikörper erkennt. Als Sekundärantikörper kam entweder ein IRDye 800 CW- oder IRDye 680 CW-konjugierter Antikörper zum Einsatz. Aufgrund seiner hohen Sensitivität erwies sich der IRDye 800 CW-konjugierte Antikörper bei schwachem Signal als vorteilhaft. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgten vier weitere 5-minütige Waschvorgängen mit PBS (pH. 7,4) und 0,1 % Tween-20 bei Raumtemperatur. Um Rückstände von Tween-20 zu beseitigen, wurde die Membran noch einmal mit PBS (pH. 7,4) gespült. Nach Abschluss der Waschschritte wurde die Membran am *Odyssey Infrared Imaging System* mit *Odyssey Application Software, Version 3*, entwickelt. Das Gerät ermöglicht die Visualisierung der Fluoreszenzsignale, die durch Bindung des Sekundärantikörpers an die Zielproteine auf der Membran entstanden sind. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 700 nm für IRDye 680CW (rot) und bei 800 nm für IRDye800 CW (grün).

TABELLE 18: VERDÜNNUNG DER IMMUNOBLOT ANTIKÖRPER UND APPARENTES MOLEKULARGEWICHT

Antikörper	Verdünnung in Blockpuffer (1:5 mit PBS) und 0,1 % Tween-20	Apparentes Molekulargewicht des zugehörigen Proteins
LC3BII	1:1000	15 kDA
H2AX	1:1000	20 kDA
γH2AX	1:1000	15 kDA
β-Actin	1:5000	42 kDA

Die Bilder wurden mithilfe der Programme *Image Studio Version 5.2* und *Microsoft Excel* ausgewertet. Dabei wurden die Signale der jeweiligen Proteine mit dem Signal des Haushaltproteins β -Actin abgeglichen. Dadurch konnten unterschiedliche Beladungsmengen der Probenaschen ausgeglichen werden. Für γ H2AX wurde zusätzlich das Signal auf H2AX normiert.

ANTIKÖRPER-STRIPPEN DER MEMBRANEN

Mithilfe des Strippens der Membran ließen sich Proteine ähnlicher Molekülgrößen auf einer Membran nachweisen. Beispielsweise um die Fluoreszenzsignalintensität eines phosphorylierten Proteins und des zugehörigen Gesamtproteins zu quantifizieren. Die Membran wurde zweimal für 20 min mit *Stripping*-Puffer im Wasserbad bei 65 °C inkubiert, um gebundene Antikörper effizient zu entfernen. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-Tween auf dem Plattenschüttler gewaschen. Um den Erfolg zu bestätigen, wurde die Membran nach einem erneuten Waschen mit PBS am *Odyssey Infrared Imaging System* entwickelt. Daraufhin konnten 10 μ l eines weiteren Primärantikörpers (in verdünntem *Odyssey Blocking Buffer* (1:5 mit PBS), mit 0,1 % Tween-20 gelöst) auf die Membran gegeben und die weiteren Schritte gemäß dem zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt werden.

3.2.10 STATISTISCHE DATENANALYSE

Die statistische Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der Software *GraphPadPrism 10.2.3*. Zunächst wurden die Daten mithilfe des Shapiro Wilk und Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung untersucht. Um zu überprüfen, ob sich die Mittelwerte mehrerer normalverteilter Gruppen signifikant voneinander unterschieden, wurde anschließend eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, an den sich bei signifikanten Unterschieden ein Post-hoc-Test (Tukey's Test für Mehrfachvergleiche) anschloss. Bei Verletzung der Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrische Alternative zur ANOVA eingesetzt und bei signifikanten Unterschieden durch einen anschließenden Dunn's Test für Mehrfachvergleiche Post-hoc-Test ergänzt. Für Analysen zwischen abhängigen Datengruppen wurde der Friedman Test angewendet, ebenfalls mit anschließendem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche. Als Signifikanzschwelle wurde in allen Vergleichen $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt.

IV. ERGEBNISSE

4.1 EFFEKTE VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE ZELLTODRATE

Um den Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Lebendzellzahl und den Zelltod der Panc02- und 6606PDA-Zellen zu analysieren, wurde eine Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Trypanblau, ein anionischer Diazofarbstoff, dringt ausschließlich in tote Zellen ein und erlaubt anschließend eine Zählung der blau gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop.

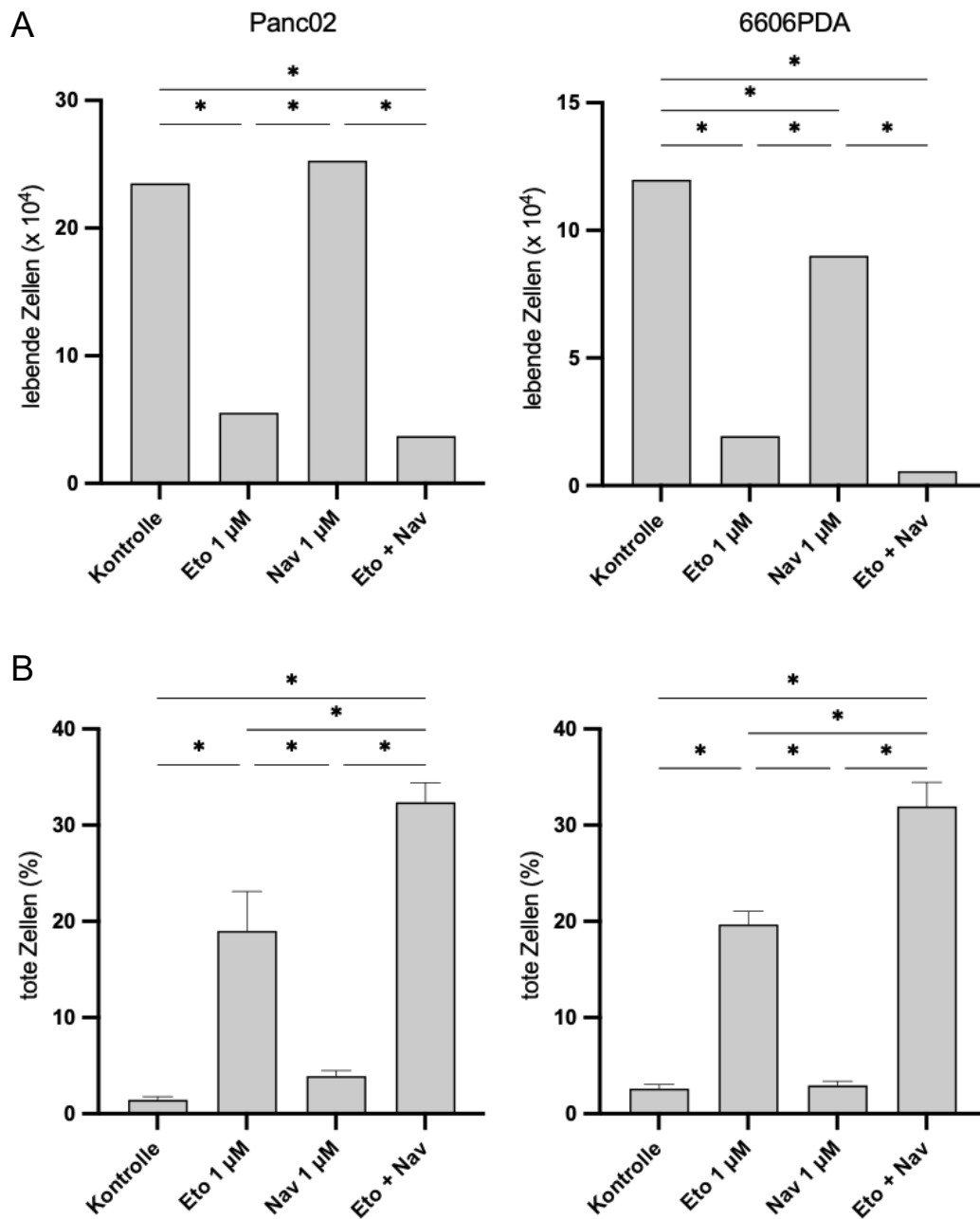


ABBILDUNG 3: ZELLVIABILITÄTS- UND ZELLTODZÄHLUNG VON PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN

Graphische Darstellung der Viabilität von Panc02- und 6606PDA-Zellen nach 48 h Behandlung mit 1 μ M Etoposid, 1 μ M Navitoclax und der Kombination aus 1 μ M Etoposid und 1 μ M Navitoclax. Die Zahl lebender und toter Zellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Die Kontrollen entsprechen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen.

A: Darstellung der Anzahl lebender Zellen, angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von 6 (Panc02) bzw. 8 (6606PDA) unabhängigen Zählungen. * $p < 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey's Test für Mehrfachvergleiche).

B: prozentualer Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl der 6 bzw. 8 Zählungen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM * $p < 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey's Test für Mehrfachvergleiche).

Abbildung 3A visualisiert die Auswirkungen der Behandlung von Panc02- und 6606PDA-Zellen mit Etoposid und/oder Navitoclax (je 1 μ M) auf die Anzahl lebender Zellen.

Die Behandlung mit Etoposid führte bei den Panc02-Zellen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellzahl um 76,6 % im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,001$). Eine Behandlung mit Navitoclax zeigte hingegen keine signifikante Veränderung der Zellzahl. Im Vergleich mit Etoposid und im Vergleich mit der kombinierten Behandlung wurde unter der Navitoclaxbehandlung eine signifikant höhere Zellzahl beobachtet (beide $p < 0,001$). Verglichen mit Etoposid vervielfachte sich die Zellzahl um den Faktor 4,78 und um den Faktor 6,8 im Vergleich mit der kombinierten Behandlung. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei den Panc02-Zellen, wie die alleinige Behandlung mit Etoposid, zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl um 84,3 % im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,001$).

Die 6606PDA-Zellen zeigten ein ähnliches Verhaltensmuster. Die Behandlungen mit Etoposid allein, Navitoclax allein und der Kombination aus Etoposid und Navitoclax führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Gegensatz zur Kontrolle. Unter der Behandlung mit Etoposid reduzierte sich die Zellzahl um 84 % ($p < 0,001$), unter Navitoclax um 25 % ($p < 0,001$) und unter der kombinierten Behandlung um 90 % ($p < 0,001$). Zusätzlich war der Unterschied zwischen den mit Etoposid allein behandelten Zellen und den mit Navitoclax behandelten Zellen signifikant, hierbei reduzierte sich die Zellzahl unter der Behandlung mit Etoposid um den Faktor 4,6 ($p < 0,001$) verglichen mit der mit Navitoclax behandelten Gruppe. Die kombinierte Behandlung bewirkte eine signifikante Reduktion der Zellzahl um 93,6 % ($p < 0,001$) im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Navitoclax.

Abbildung 3B veranschaulicht die Auswirkungen der Behandlungen mit Etoposid und/oder Navitoclax auf den Anteil toter Panc02- oder 6606PDA-Zellen an der Gesamtzellzahl.

Bei den Panc02-Zellen führte die Behandlung mit Etoposid zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an toten Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Der Mittelwert der Kontrolle lag bei 1,5 % toter Zellen, unter Etoposid betrug er 19 %. Die Behandlung mit

Navitoclax bewirkte eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen im Vergleich mit der Etoposid-Gruppe auf ein Niveau, das mit der Kontrollgruppe vergleichbar war ($p < 0,001$). Unter der Behandlung mit Navitoclax lag der durchschnittliche Anteil toter Zellen bei 3,9 %. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen. Der Anteil toter Panc02-Zellen betrug im Durchschnitt 32,4 %. Dieser Anstieg war sowohl im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) als auch zur Monotherapie mit Etoposid ($p = 0,0029$) und Navitoclax ($p < 0,001$) signifikant.

Die 6606PDA-Zellen zeigten ein ähnliches Verhaltensmuster wie die Panc02-Zellen: Sowohl die alleinige Behandlung mit Etoposid als auch die Behandlung mit der Kombination führten zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an toten Zellen an der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrolle (beide $p < 0,001$). Der Anteil an toten Zellen betrug bei der Kontrolle im Durchschnitt 2,7 %, unter Etoposid 19,7 % und unter der Kombination 32 %. Zusätzlich war der Unterschied zwischen der alleinigen Behandlung mit Etoposid und der kombinierten Behandlung mit Etoposid und Navitoclax signifikant ($p < 0,001$). Die Behandlung mit Navitoclax führte zu keinem statistisch signifikanten Anstieg. Dort betrug der Anteil an toten Zellen durchschnittlich 3,0 %.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl eine Behandlung mit Etoposid als auch der Kombination aus Etoposid und Navitoclax bei beiden Zelllinien einen deutlich minimierenden Effekt auf die Zellviabilität hatten und der prozentuale Anteil an toten Zellen signifikant anstieg. Die Behandlung mit Navitoclax führte bei den Panc02-Zellen zu einem Anstieg, bei den 6606PDA-Zellen zu einem Abfall der Zellviabilität. Der prozentuale Anteil an toten Zellen stieg bei beiden Zelllinien numerisch unter der Behandlung mit Navitoclax. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax verstärkte bei beiden Zelllinien den durch Etoposid induzierten Anstieg toter Zellen signifikant, während die Zahl lebender Zellen unter der kombinierten Behandlung lediglich numerisch weiter abfiel.

4.2 SENESZENZ-ASSOZIIERTE- β -GAL-FÄRBUNG

Um die Auswirkungen der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax auf die Seneszenz der Panc02- und 6606PDA-Zellen zu untersuchen, wurde der SA- β -Gal-Assay durchgeführt. Die SA- β -Gal ist ein Biomarker, der mit dem seneszenten Phänotyp assoziiert ist (Itahana et al., 2007).

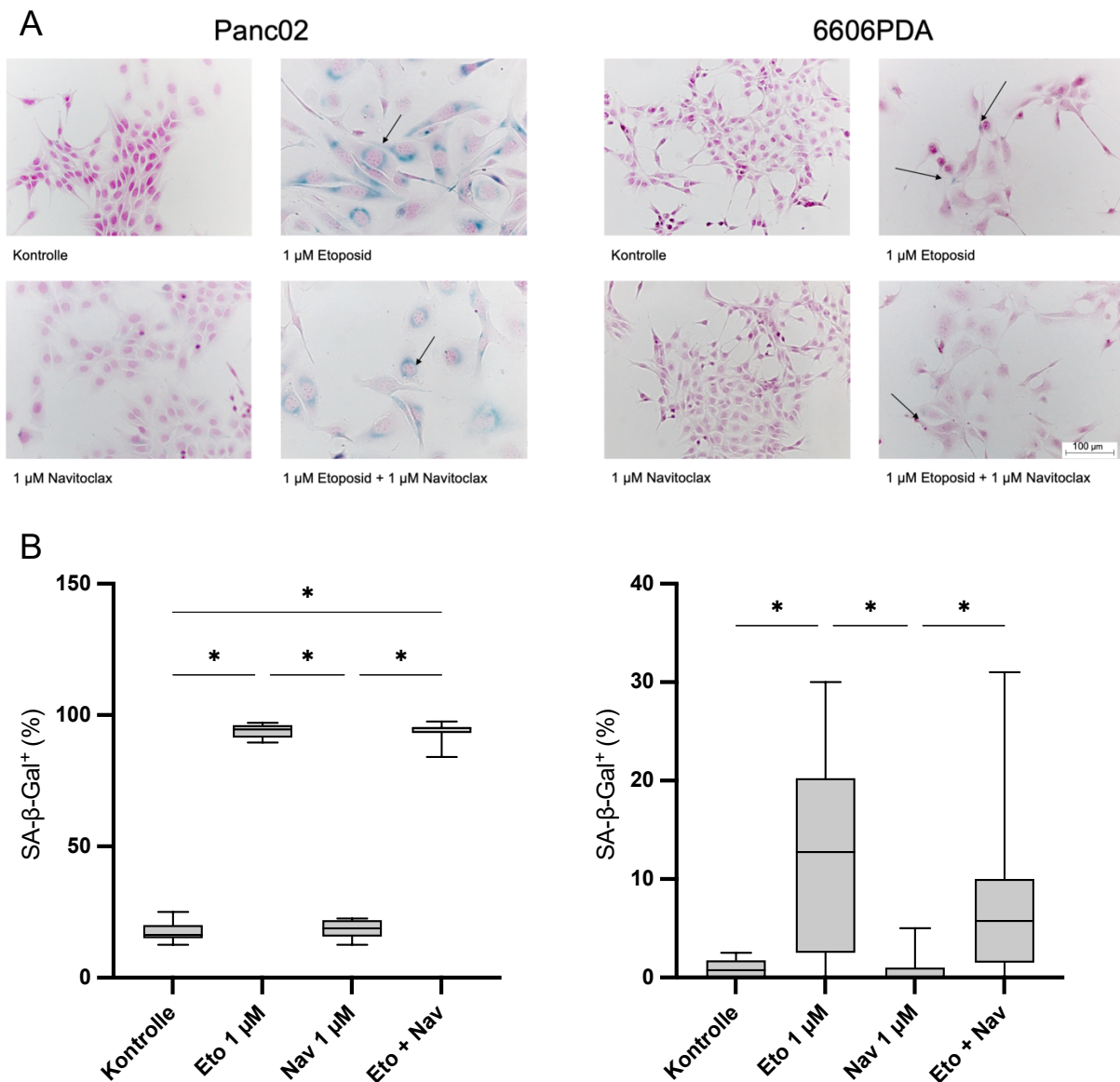


ABBILDUNG 4: PROZENTUALER ANTEIL SA- β -GAL⁺-PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN

Die Zellen wurden jeweils 48 h nach Behandlung (1 μ M Etoposid (Eto), 1 μ M Navitoclax (Nav) oder die Kombination) mithilfe des *Senescence Detection Kits* gefärbt und der Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen an 100 Zellen verblindet ausgezählt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt.

A: beispielhafte Aufnahmen der SA- β -Gal-Färbung (200-fache Vergrößerung), die als SA- β -Gal⁺ gezählten Zellen wurden exemplarisch mit einem Pfeil markiert.

B: Dargestellt sind die Daten in Form von Boxplots unter Anzeige des Medians und des Interquartilsabstands, die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Einzelmesswerte der Einzelversuche (Panc02: n = 8; 6606PDA: n = 14). * p < 0,05 (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Test für Mehrfachvergleiche)

Abbildung 4 stellt den prozentualen Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl unter Behandlungen mit Etoposid und/oder Navitoclax bei Panc02- und 6606PDA-Zellen dar.

Die Behandlung mit Etoposid induzierte bei den Panc02 eine signifikante Erhöhung an SA- β -Gal⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (p = 0,003). Hierbei stieg der prozentuale Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen im Median von 16,2 % bei den Kontrollen auf 94,5 % unter der Behandlung mit Etoposid. Die Behandlung mit Navitoclax bewirkte keine signifikante Veränderung der Anzahl SA- β -Gal⁺-Zellen, im Median betrug sie 18,8 %. Der Unterschied zwischen den mit Navitoclax behandelten und den mit Etoposid behandelten Zellen war signifikant (p = 0,09). Die Behandlung mit der Kombination führte zu einer signifikanten Erhöhung (p = 0,001) des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen auf einen Median von 95 % im Vergleich mit der Kontrolle. Dieser Unterschied war ebenfalls im Vergleich mit der alleinigen Navitoclaxbehandlung signifikant (p = 0,004). Im Vergleich mit der alleinigen Etoposidbehandlung stieg der Median numerisch auf 95 %.

Die 6606PDA-Zellen zeigten ein vergleichbares Verhalten, jedoch weniger stark ausgeprägt als die Panc02-Zellen: auch hier führte die Behandlung mit Etoposid zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen im Vergleich mit der Kontrolle (p < 0,001): Unter Etoposid betrug der Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen im Median 12,75 %, bei den Kontrollen 0,75 %. Die Behandlung mit Navitoclax führte zu einer geringen Abnahme des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen im Vergleich mit der Kontrolle, die Reduktion war im Vergleich mit den mit Etoposid behandelten Zellen signifikant (p < 0,001). Die kombinierte Behandlung aus Etoposid und Navitoclax führte zu einem numerischen Anstieg des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen im Vergleich mit der Kontrolle. Verglichen mit den mit Navitoclax behandelten Zellen war dieser Anstieg signifikant (p = 0,016). Verglichen mit den mit Etoposid behandelten Zellen reduzierte sich der Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen numerisch im Median auf 5,75 %. Insgesamt stellte sich bei den 6606PDA-Zellen verglichen mit den Panc02-Zellen eine stärkere Streuung der Messwerte dar. Die mikroskopische Betrachtung beider Zelllinien ergab zudem morphologische Veränderungen bei den mit Etoposid und den mit der Kombination aus Etoposid und Navitoclax behandelten Zellen im Vergleich mit den Kontrollen (siehe Abbildung 4A)

Die behandelten Zellen wiesen ein breiteres und flächigeres Erscheinungsbild auf als die Kontrollen. Zudem ließ sich die SA- β -Gal-Färbung bei den Panc02-Zellen intensiver und deutlicher erkennen als bei den 6606PDA. Dies spiegelte sich auch in den Diagrammen wider: bei den Panc02-Zellen waren deutlich mehr SA- β -Gal⁺-Zellen unter der Behandlung mit Etoposid und der Kombination zu zählen als bei den 6606PDA-Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Behandlung mit Etoposid zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Zahl an SA- β -Gal⁺-Zellen bei beiden Zelllinien führte. Die Intensität der Färbung und der Anstieg an SA- β -Gal⁺-Zellen war bei den Panc02-Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den 6606PDA-Zellen. Bei den Panc02-Zellen waren unter Etoposid fast alle Zellen SA- β -Gal⁺. Die Behandlung mit Navitoclax allein führte bei den Panc02-Zellen zu einem geringen Anstieg des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen, bei den 6606PDA führte Navitoclax zu einem geringen Abfall. Unter der kombinierten Behandlung mit Etoposid und Navitoclax ergab sich bei den Panc02-Zellen das gleiche Bild wie bei der alleinigen Etoposid-Behandlung: nahezu alle Zellen waren SA- β -Gal-positiv. Bei den 6606PDA-Zellen hingegen ging der signifikante Etoposid-Effekt durch die Hinzunahme des Navitoclax verloren, es blieb nur noch ein numerischer Anstieg.

4.3 EINFLUSS VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE ZELLPROLIFERATIONSANALYSE

Um den Einfluss der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax auf die Proliferationsrate von Panc02- und 6606PDA-Zellen zu quantifizieren, wurde der BrdU-Einbaustest verwendet. Die BrdU-Inkorporationsrate wurde als Indikator für die DNA-Synthese und demnach für die Zellproliferation genutzt.

Abbildung 5 zeigt die BrdU-Inkorporation in Panc02- und 6606PDA-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Etoposid, Navitoclax oder der Kombination.

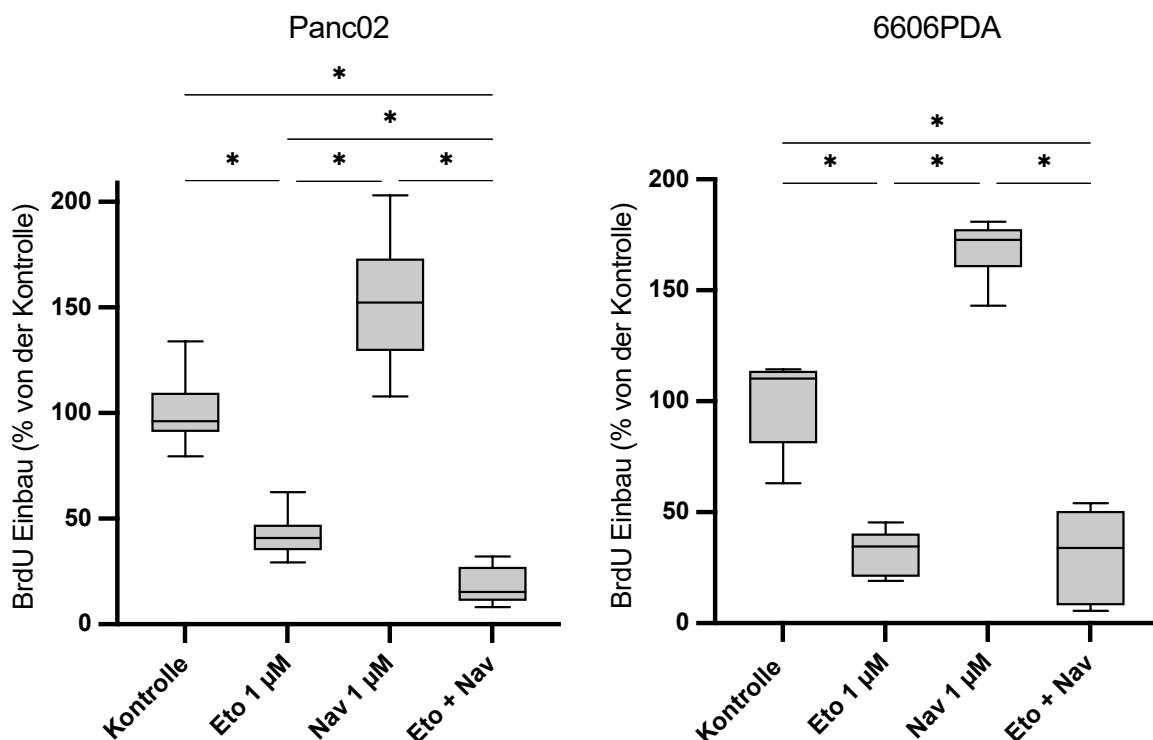


ABBILDUNG 5: PROZENTUALER BROMDESOXYURIDIN (BRDU) EINBAU IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Daten sind in Form von Boxplots unter Anzeige des Medians der Einzelversuche (Panc02 n = 20, 6606PDA n = 9) dargestellt, die Whisker zeigen das Minimum und das Maximum der Einzelmesswerte. Die Mittelwerte der unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * p < 0,05.

Die Behandlung mit Etoposid führte bei den Panc02-Zellen zu einer statistisch signifikanten (p = 0,029) Reduktion des BrdU-Einbaus um 55,3 % im Vergleich mit der Kontrolle. Unter der Behandlung mit Navitoclax zeigte sich ein numerischer Anstieg des BrdU-Einbaus im Vergleich mit der Kontrolle, während die Einbaurate im Vergleich mit der mit Etoposid behandelten

Gruppe signifikant um 56,3 % zunahm ($p < 0,001$). Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax verstärkte den reduzierenden Effekt der alleinigen Behandlung mit Etoposid: der BrdU-Einbau reduzierte sich signifikant um 83,9 % gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$), um 89,9 % gegenüber der alleinigen Behandlung mit Navitoclax ($p < 0,001$) und um 62,9 % gegenüber der alleinigen Behandlung mit Etoposid ($p = 0,042$).

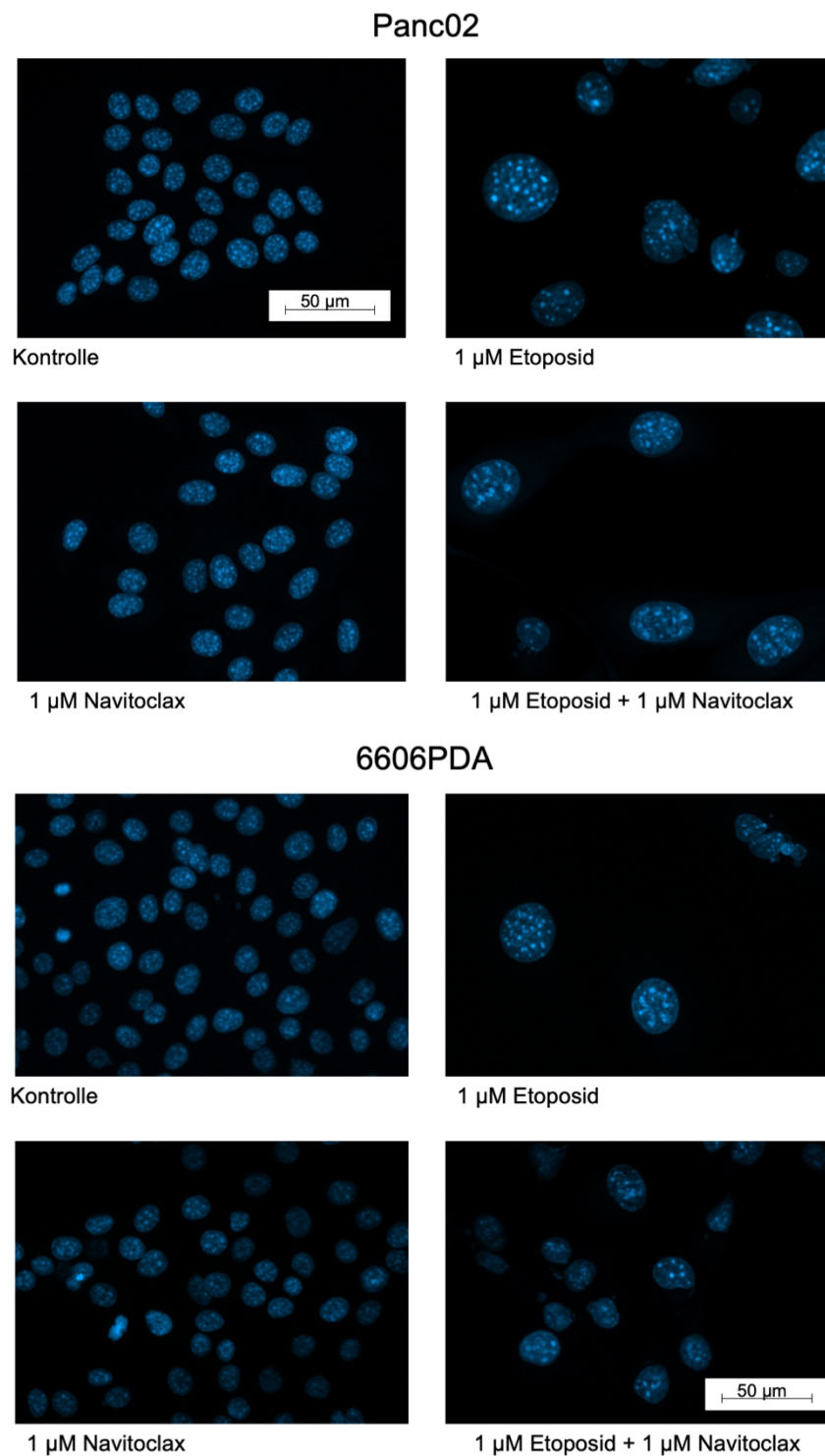
Ähnlich wie bei den Panc02-Zellen führte auch die Behandlung der 6606PDA-Zellen mit Etoposid zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus um 68,1 % verglichen mit der Kontrolle ($p = 0,046$). Die Behandlung mit Navitoclax führte zu einer numerischen Erhöhung des BrdU-Einbaus um 56,7 %. Im Vergleich mit der alleinigen Etoposidbehandlung war dieser Anstieg signifikant ($p < 0,001$). Die Behandlung der 6606PDA-Zellen mit der Kombination aus Etoposid und Navitoclax resultierte in einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus verglichen mit der Kontrolle um 69,2 % ($p = 0,033$). Im Vergleich mit der alleinigen Navitoclaxbehandlung reduzierte sich der BrdU-Einbau unter der kombinierten Behandlung signifikant um 80,3 % ($p < 0,001$). Im Vergleich mit den mit Etoposid behandelten Zellen reduzierte sich der BrdU-Einbau unter der kombinierten Behandlung numerisch um 2 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit Etoposid bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus führte, während die Behandlung mit Navitoclax allein zu einer signifikanten Steigerung der BrdU-Inkorporation führte. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den Panc02-Zellen war diese Reduktion darüber hinaus signifikant im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Etoposid, die Hinzunahme von Navitoclax schien den reduzierenden Effekt der Behandlung mit Etoposid zu verstärken. Bei den 6606PDA-Zellen zeigte sich dieser Effekt numerisch.

4.4 ERGEBNISSE DER HETEROCHROMATIN-FÄRBUNG

Um den Einfluss von Etoposid und Navitoclax auf die Anzahl der SAHF zu quantifizieren, wurden die Panc02- und 6606PDA-Zellen 48 h nach Behandlung mit DAPI gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Seneszente Zellen entwickeln eine spezifische Art von Heterochromatin, die SAHF (Narita et al., 2003).

A



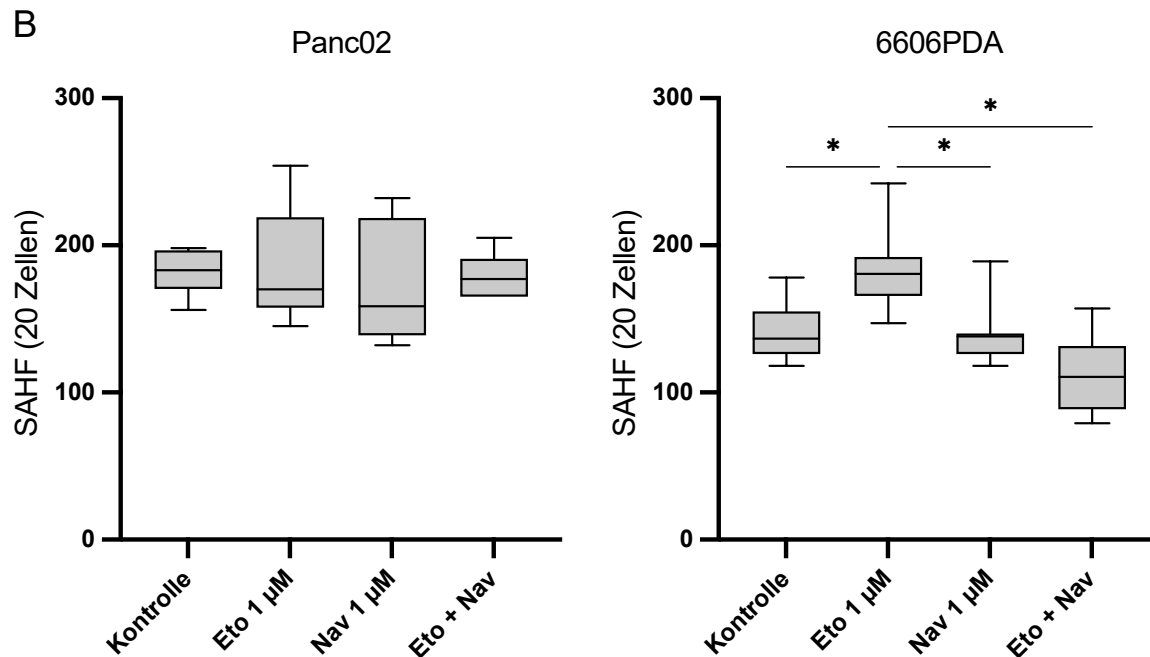


ABBILDUNG 6: SAHF PRO 20 ZELLKERNEN VON PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN

Die Zellen wurden jeweils 48 h nach Behandlung mit Etoposid, Navitoclax oder der Kombination mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden mit dem *ZEISS Cell Observer* mit einem *20x PlanApo* Objektiv Aufnahmen der Zellen gemacht. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. A: Beispielhafte Aufnahmen der DAPI-Färbung, für jede Zelllinie ist einmal jede Behandlung abgebildet. Die gezählten Foci sind exemplarisch mit einem Pfeil markiert. B: Dargestellt sind die Daten von $n = 6$ (Panc02) bzw. $n = 8$ (6606PDA) Zählungen in Form von Boxplots unter Anzeige des Medians, die Whiskers zeigen das Minimum und das Maximum der Einzelmesswerte. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Abbildung 6 zeigt repräsentative DAPI-Färbungen der Zellkerne von Panc02- und 6606PDA-Zellen. Die Bilder wurden mit dem *ZEISS Cell Observer* mit einem *20x PlanApo* Objektiv aufgenommen. Während in unbehandelten Panc02-Zellen zahlreiche Kerne sichtbar waren, führte die Behandlung mit Etoposid zu einer Reduktion der Zellkernzahl. Zudem erschien die Kernfläche vergrößert und aufgehellt, was auf eine Akkumulation der SAHF hindeuten könnte. Navitoclax hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Kernmorphologie. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte zu einer optischen Abschwächung der durch Etoposid hervorgerufenen morphologischen Veränderungen. Die charakteristische Vergrößerung und Aufhellung der Kerne waren in der kombinierten Gruppe weniger ausgeprägt.

Vergleichbare Effekte waren bei den 6606PDA-Zellen zu beobachten: Durch die Behandlung mit Etoposid verringerte sich die Anzahl an sichtbaren Kernen, während die verbleibenden Zellkerne im Vergleich zur Kontrolle vergrößert, flächiger und heller erschienen. Die Anzahl und Morphologie der mit Navitoclax behandelten Kerne waren vergleichbar mit der Kontrolle.

Die gemeinsame Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei den 6606PDA-Zellen ebenfalls zu optisch vergrößerten, zahlenmäßig reduzierten, jedoch weniger intensiv leuchtenden Zellkernen, als die mit nur Etoposid behandelten Kerne.

Abbildung 6 zeigt die graphische Darstellung der SAHF pro 20 Zellkerne in Panc02- und 6606PDA-Zellen. Bei den Panc02-Zellen ließen sich in Abbildung 6 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erkennen. Sie zeigten eine deutlich größere Variabilität der SAHF-Anzahl zwischen den Behandlungsgruppen, als die 6606PDA-Zellen.

Bei den 6606PDA-Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Behandlung mit Etoposid führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an SAHF in 20 Zellkernen um 32,2 % im Vergleich mit der Kontrolle ($p = 0,015$). Die mit Navitoclax behandelte Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied mit der Kontrolle. Im Vergleich mit den mit Etoposid behandelten Zellen wiesen die mit Navitoclax behandelten Zellen eine signifikant reduzierte Anzahl an SAHF in 20 Zellkernen um 23,5 % auf ($p = 0,020$). Die Kombination aus Etoposid und Navitoclax resultierte bei den 6606PDA-Zellen in der numerisch niedrigsten Anzahl an SAHF. Im Vergleich mit der Etoposid-Behandlung betrug die Reduktion 38,8 %. Dieser Effekt war signifikant ($p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Während Etoposid in 6606PDA-Zellen zu einer signifikanten Zunahme der SAHF in 20 Zellkernen im Vergleich mit der Kontrolle führte und Navitoclax allein keinen Einfluss zeigte, resultierte die Kombination aus Etoposid und Navitoclax in einer deutlichen Reduktion der SAHF. Dieser Effekt war im Vergleich mit Etoposid signifikant, was sowohl auf eine verstärkende Wirkung der Behandlung mit Navitoclax als auch auf eine Abschwächung der Wirkung von Etoposid hinweisen könnte. Die Panc02-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Aufnahmen der DAPI-Färbung der Zellkerne unterstrichen die quantitativen Ergebnisse. Etoposid-behandelte Zellen beider Ziellinien zeigten vergrößerte und flächigere Zellkerne als die unbehandelten Zellen. Navitoclax schien keinen sichtbaren Effekt auf die Kernmorphologie zu haben, die kombinierte Behandlung führte zu einer ähnlichen, aber weniger ausgeprägten Veränderung der Kernmorphologie als die Behandlung mit Etoposid allein.

4.5 EINFLUSS VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE GENEXPRESSION

Die Effekte der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax auf die Expression ausgewählter Gene von Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Im Einzelnen wurde dabei die mRNA-Expression von *Cdkn1a*, *Cdk5*, *Cxcl2*, *il6*, *Mdm2*, *Trp53*, *Tgf-β1* sowie *Serpine1* analysiert.

4.5.1 CDKN1A

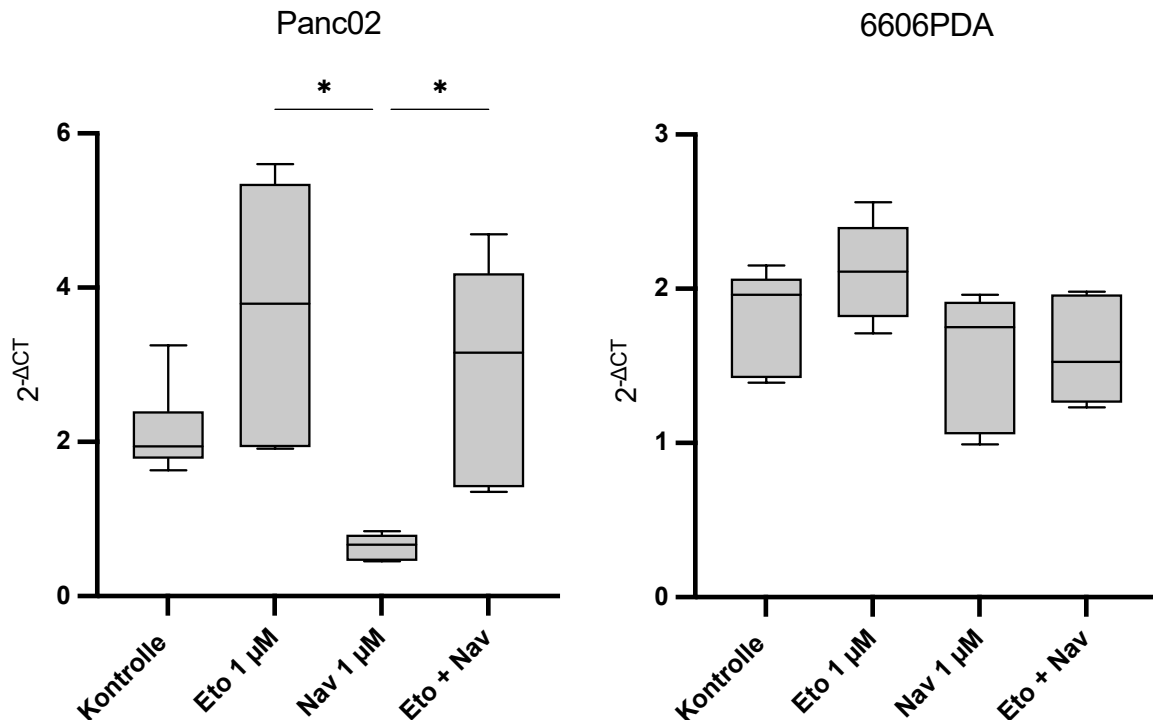


ABBILDUNG 7: CDKN1A GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, stieg die *Cdkn1a*-Expression der Panc02-Zellen unter der Behandlung mit Etoposid im Vergleich mit der Kontrolle numerisch an. Die Behandlung mit Navitoclax resultierte in einem Abfall der *Cdkn1a*-Spiegel. Verglichen mit den *Cdkn1a*-Spiegeln

der mit Etoposid behandelten Gruppe waren die *Cdkn1a*-Spiegel der mit Navitoclax behandelten Gruppe mit einem p-Wert von 0,001 signifikant reduziert. Die kombinierte Behandlung der Panc02-Zellen mit Etoposid und Navitoclax führte zu einem Anstieg der *Cdkn1a*-Expression im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Verglichen mit der mit Etoposid behandelten Gruppe reduzierte sich der *Cdkn1a*-Spiegel unter der kombinierten Behandlung numerisch um 16,72 %. Der Unterschied der *Cdkn1a*-Expression zwischen der kombinierten Behandlung und der mit Navitoclax behandelten Gruppe war mit einem p-Wert von 0,026 signifikant.

Bei den 6606PDA-Zellen führten die Behandlungen mit Etoposid und/oder Navitoclax zu keinen signifikanten Veränderungen der *Cdkn1a*-Spiegel. Die mit Etoposid behandelte Gruppe zeigte eine numerische Erhöhung der *Cdkn1a*-Spiegel verglichen mit der Kontrolle.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass insbesondere bei den Panc02-Zellen die Behandlung mit Navitoclax zu einer Reduktion des *Cdkn1a*-Spiegels führte. Während sich diese Reduktion im Vergleich mit der Kontrolle numerisch darstellte, war sie im Vergleich mit der mit Etoposid behandelten Gruppe und der mit der Kombination behandelten Gruppe signifikant. Bei den 6606PDA-Zellen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden in den Behandlungsgruppen.

4.5.2 CDK5

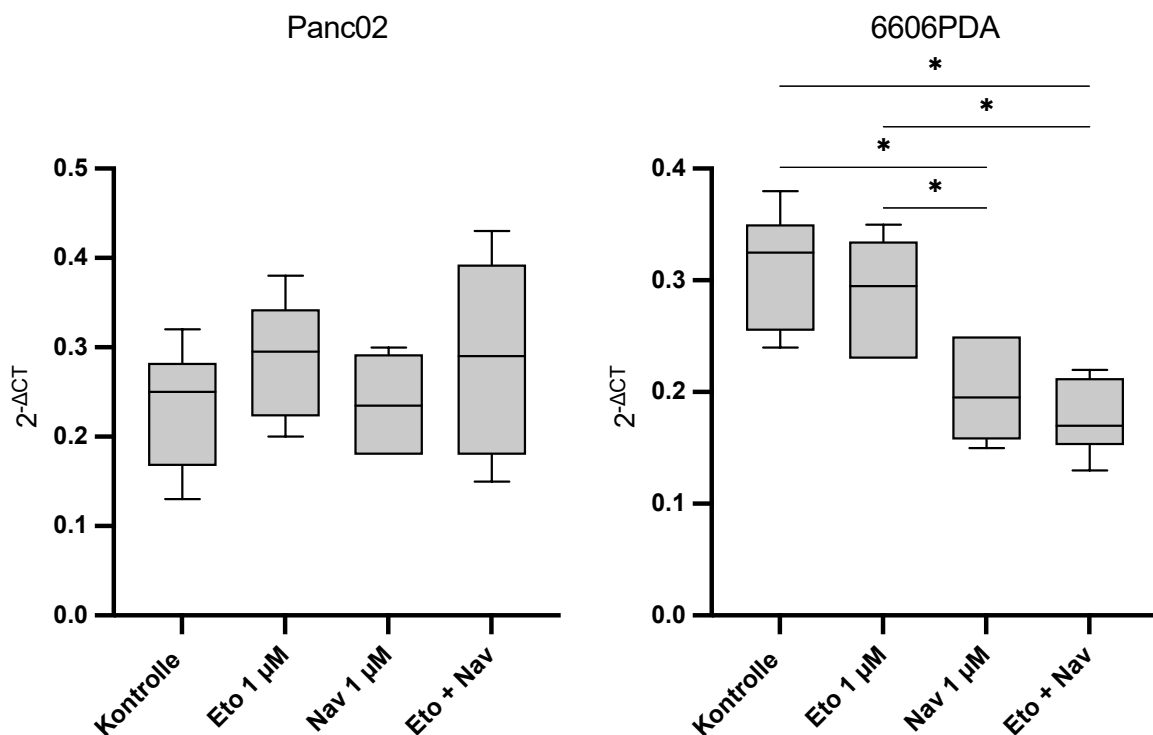


ABBILDUNG 8: *CDK5* GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta C_t}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten der Panc02-Zellen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, die statistische Analyse der 6606PDA-Zellen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Für die Panc02-Zellen zeigten sich in Abbildung 8 keine statistisch signifikanten Unterschiede der $2^{-\Delta C_t}$ -Werte zwischen den Behandlungsgruppen. Die Behandlung mit Etoposid resultierte in einem numerischen Anstieg des *Cdk5*-Spiegels im Vergleich mit der Kontrolle. Die Behandlung mit Navitoclax reduzierte den *Cdk5*-Spiegel numerisch. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax resultierte in einem vergleichbaren Anstieg wie die alleinige Behandlung mit Etoposid.

Bei den 6606PDA-Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Behandlung mit Etoposid führte zu einem numerischen Anstieg des *Cdk5*-Spiegels im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die mit Navitoclax behandelte Gruppe zeigte signifikant reduzierte *Cdk5*-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,002$) und der alleinigen Behandlung mit Etoposid ($p = 0,015$). Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax resultierte bei den 6606PDA-Zellen in einer weiteren Reduktion des *Cdk5*-Spiegels. Diese Reduktion war verglichen mit der Kontrollgruppe mit einem p -Wert von $< 0,001$ und verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Etoposid mit einem p -Wert von $< 0,002$ signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Panc02-Zellen keine signifikanten Veränderungen der *Cdk5*-Spiegel zwischen den Behandlungsgruppen zeigten. Bei den 6606PDA-Zellen reduzierte die Behandlung mit Etoposid den *Cdk5*-Spiegel numerisch. Navitoclax und die Kombination aus Etoposid und Navitoclax führten zu signifikant reduzierten *Cdk5*-Spiegeln im Vergleich mit der Kontrollgruppe und der alleinigen Behandlung mit Etoposid. Die kombinierte Behandlung zeigte dabei die stärkste Reduktion des *Cdk5*-Spiegels.

4.5.3 CXCL2

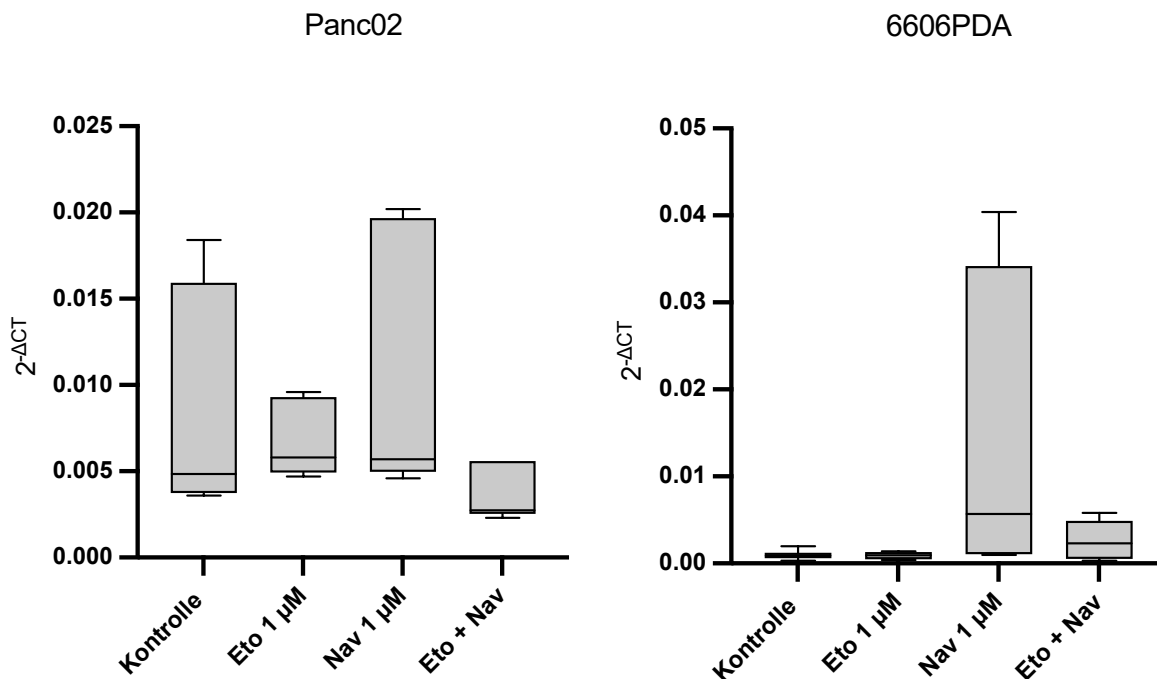


ABBILDUNG 9: CXCL2 GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION MITTELS DER $2^{-\Delta CT}$ -METHODE.

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, kam es weder bei den Panc02-Zellen noch bei den 6606PDA-Zellen zu statistisch signifikanten Änderungen der *Cxcl2*-Spiegel zwischen den Behandlungsgruppen. Die Daten zeigten eine breite Streuung. Auffällig waren der tendenzielle Abfall der *Cxcl2*-Spiegel unter der kombinierten Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bei den Panc02-Zellen sowie der Anstieg der *Cxcl2*-Spiegel in den mit Navitoclax behandelten 6606PDA-Zellen.

4.5.4 MDM2

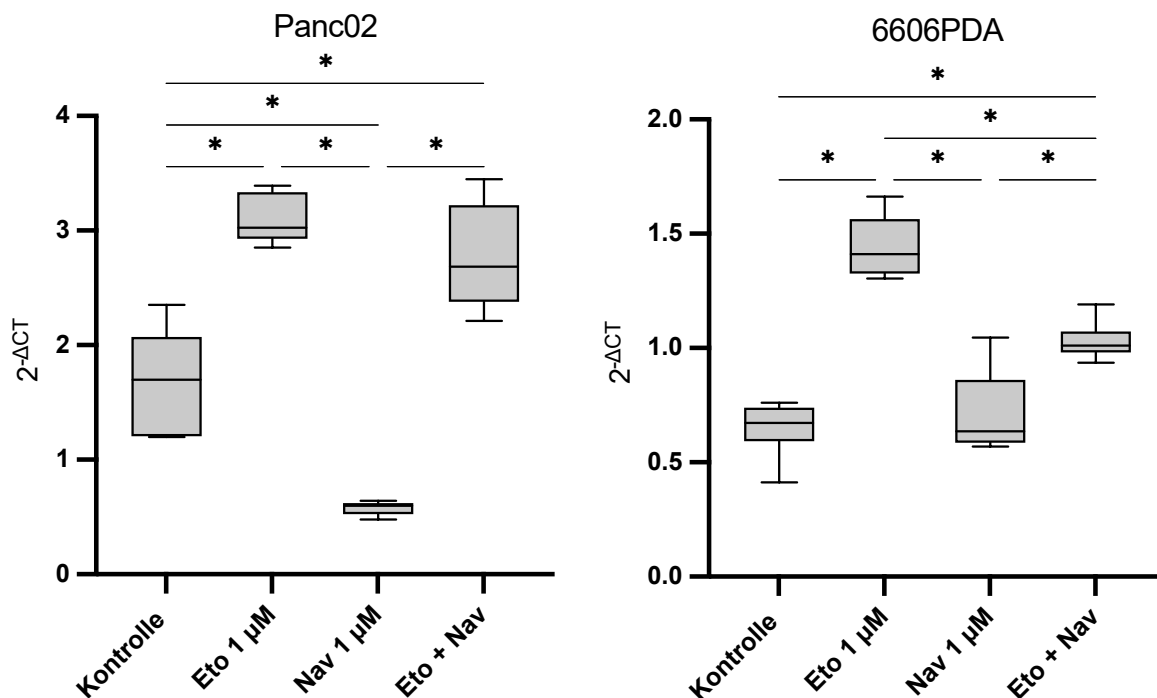


ABBILDUNG 10: *Mdm2* GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION MITTELS DER $2^{-\Delta CT}$ -METHODE.

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Bei den Panc02-Zellen führte die Behandlung mit Etoposid zu einem signifikanten Anstieg der *Mdm2*-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,001$), wie in Abbildung 10 dargestellt. Die Behandlung mit Navitoclax resultierte in einer signifikanten Abnahme der *Mdm2*-Spiegel ($p < 0,001$). Auch im Vergleich mit der mit Etoposid behandelten Gruppe war diese Reduktion signifikant ($p < 0,001$). Die kombinierte Behandlung bewirkte einen Anstieg der *Mdm2*-Spiegel. Verglichen mit der Kontrolle und der mit Navitoclax behandelten Gruppe war dieser Effekt signifikant ($p < 0,001$). Im Vergleich mit der mit Etoposid behandelten Gruppe führte die Kombination zu einem zahlenmäßig geringeren Anstieg des *Mdm2*-Spiegels.

Die 6606PDA-Zellen zeigten ein vergleichbares Verhalten: Bei der mit Etoposid behandelten Gruppe war der *Mdm2*-Spiegel signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,001$). Die Behandlung mit Navitoclax resultierte in einem vergleichbaren *Mdm2*-Spiegel wie bei der

Kontrolle. Verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Etoposid war die *Mdm2*-Expression unter der Behandlung mit Navitoclax mit einem p-Wert von $< 0,001$ signifikant reduziert. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax resultierte in einem Anstieg des *Mdm2*-Spiegels. Dieser Effekt war verglichen mit der Kontrolle ($p < 0,001$) und im Vergleich mit der mit Navitoclax behandelten Gruppe signifikant ($p = 0,003$). Verglichen mit der Etoposid-Monotherapie reduzierte sich der *Mdm2*-Spiegel unter der Kombination signifikant ($p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl bei den Panc02- als auch bei den 6606PDA-Zellen die Behandlung mit Etoposid die *Mdm2*-Spiegel signifikant erhöhte. Die Behandlung mit Navitoclax führte bei beiden Zelllinien zu einer reduzierten Expression von *Mdm2*, bei den Panc02-Zellen war dieser Effekt signifikant. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax resultierte bei beiden Zelllinien verglichen mit der Kontrolle und der alleinigen Behandlung mit Navitoclax in signifikant erhöhten *Mdm2*-Spiegeln. Im Vergleich mit der mit Etoposid behandelten Gruppe waren sie jedoch reduziert. Während dieser Effekt bei den Panc02-Zellen nur numerisch sichtbar war, war er bei den 6606PDA-Zellen signifikant.

4.5.5 TRP53

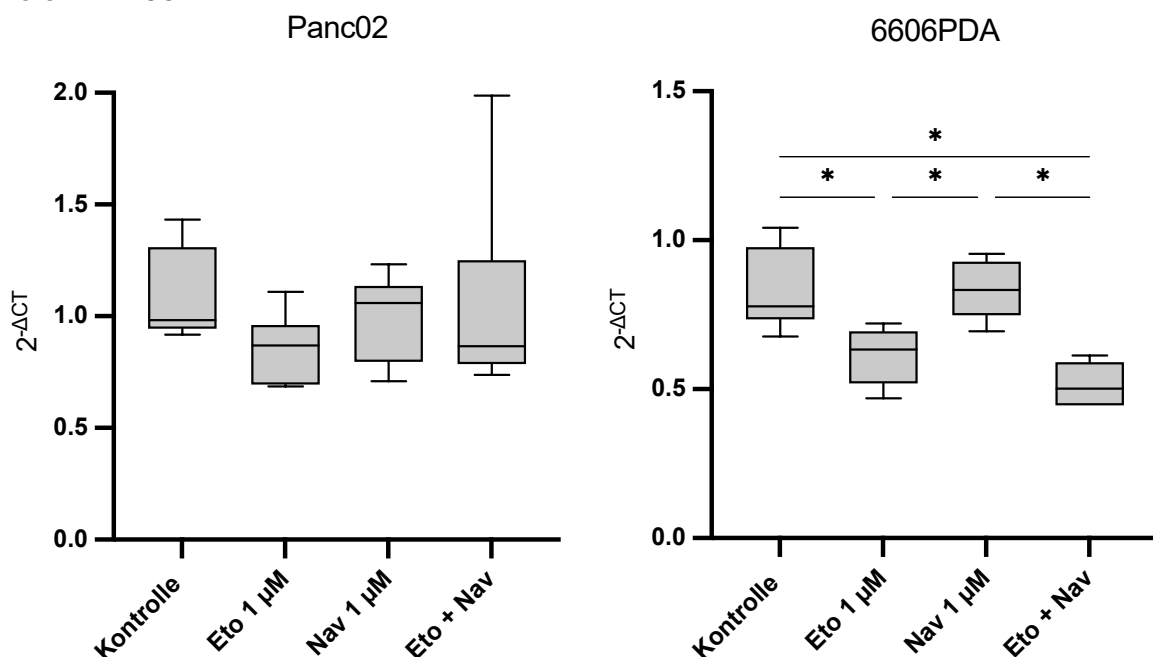


ABBILDUNG 11: *TRP53* GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige

des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 11 dargestellt führten weder die Einzelbehandlungen mit Etoposid und Navitoclax, noch die Kombination beider zu signifikanten Veränderungen der *Trp53*-Spiegel der Panc02-Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es zeigten sich lediglich numerische Trends: Etoposid und die kombinierte Behandlung reduzierten die *Trp53*-Spiegel.

In den 6606PDA-Zellen führte die Behandlung mit Etoposid zu signifikant reduzierten *Trp53*-Spiegeln verglichen mit der Kontrolle und der mit Navitoclax behandelten Gruppe ($p = 0,008$). Während die mit Navitoclax behandelte Gruppe einen vergleichbaren *Trp53*-Spiegel wie die Kontrolle zeigte, reduzierte die kombinierte Behandlung den *Trp53*-Spiegel. Dieser Effekt war verglichen mit der Kontrollgruppe und der mit Navitoclax behandelten Gruppe signifikant ($p < 0,001$). Verglichen mit der mit Etoposid behandelten Gruppe führte die Kombination zu einer numerischen Reduktion der *Trp53*-Expression.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Während die Behandlungen der Panc02-Zellen mit Etoposid und/oder Navitoclax zu rein numerischen Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen führten, zeigten die 6606PDA-Zellen signifikante Veränderungen der *Trp53*-Spiegel. Etoposid reduzierte die *Trp53*-Spiegel signifikant, während Navitoclax allein zu keiner Veränderung führte. Die Kombination beider Substanzen reduzierte den *Trp53*-Spiegel der 6606PDA-Zellen noch stärker, als die alleinige Etoposidbehandlung. Die Tendenzen der Veränderungen der *Trp53*-Spiegel der Panc02-Zellen folgten den signifikanten Unterschieden der 6606PDA-Zellen.

4.5.6 SERPINE1

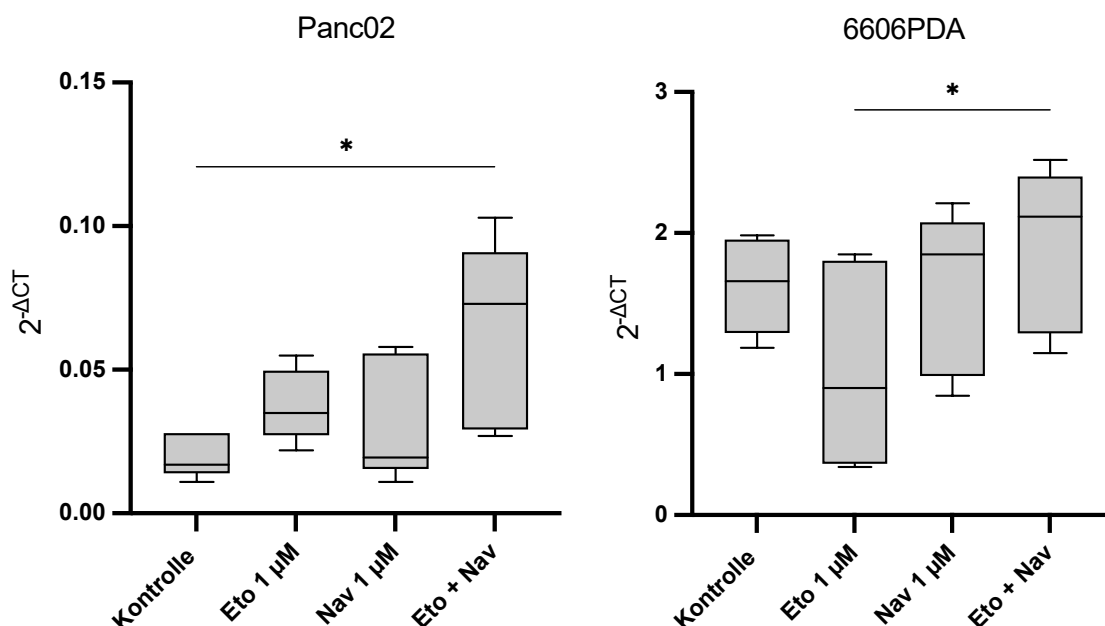


ABBILDUNG 12: *SERPINE1* GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Die Behandlung der Panc02-Zellen mit Etoposid führte zu einem leichten Anstieg des *Serpine1*-Spiegels verglichen mit der Kontrolle, wie in Abbildung 12 dargestellt. Die Behandlung mit Navitoclax resultierte in einem vergleichbaren Spiegel wie die Kontrollgruppe. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax zeigte einen signifikanten Anstieg des *Serpine1*-Spiegels verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,011$). Verglichen mit den Etoposid- und Navitoclax-Behandlungen stieg der *Serpine1*-Spiegel durch die kombinierte Behandlung numerisch an.

Bei den 6606PDA-Zellen führte die Behandlung mit Etoposid zu einer numerischen Reduktion des *Serpine1*-Spiegels verglichen mit der Kontrolle. Navitoclax und die kombinierte Behandlung führten zu numerisch höheren *Serpine1*-Spiegeln als die Kontrollgruppe. Zwischen der mit der Kombination behandelten und der mit Etoposid behandelten Gruppe war der Unterschied des *Serpine1*-Spiegels signifikant ($p = 0,042$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax in beiden Zelllinien den stärksten Einfluss auf die *Serpine1*-Spiegel hatte. Bei den Panc02-Zellen war dieser Anstieg des *Serpine1*-Spiegels verglichen mit der Kontrollgruppe, bei den 6606PDA-Zellen verglichen mit der mit Etoposid behandelten Gruppe signifikant. Die alleinigen Behandlungen mit Etoposid und Navitoclax resultierten bei beiden Zelllinien in numerischen Unterschieden der *Serpine1*-Spiegel.

4.5.7 TGF- β 1

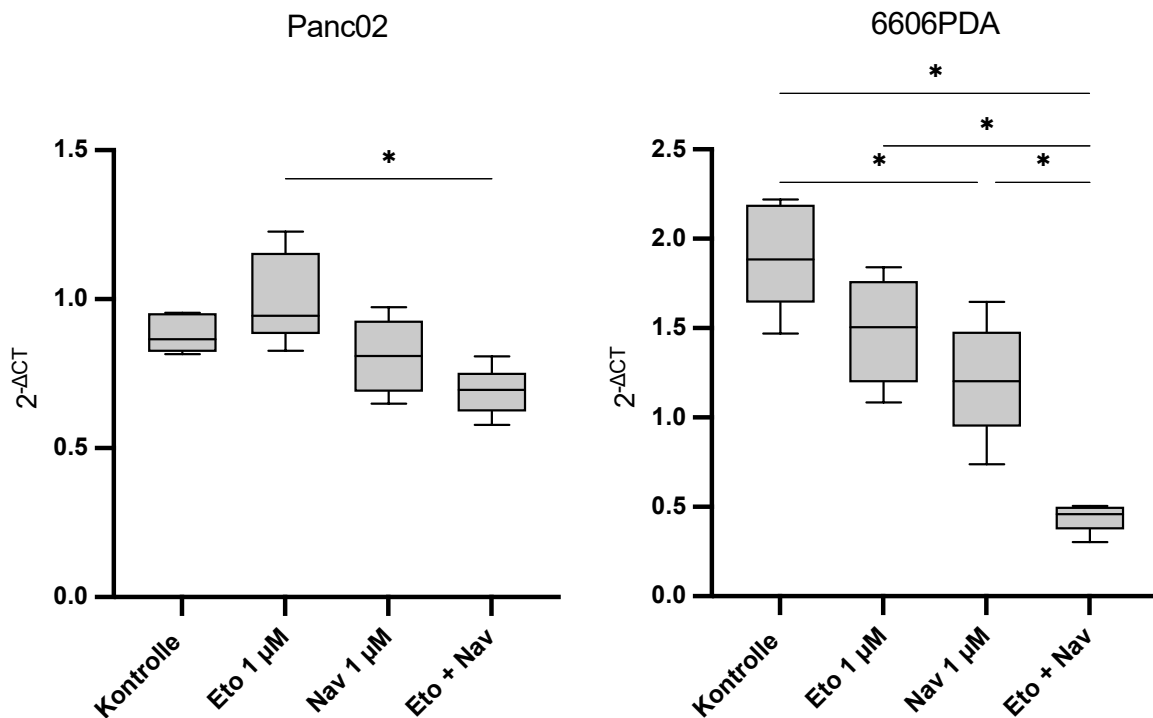


ABBILDUNG 13: TGF- β 1 GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μ M Etoposid, 1 μ M Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time-PCR-Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 13 dargestellt führte die Behandlung mit Etoposid bei den Panc02-Zellen zu einem numerischen Anstieg der Tgf- β 1-Spiegel. In der mit Navitoclax behandelte Gruppe waren die Tgf- β 1-Spiegel vergleichbar mit denen der Kontrolle. Die kombinierte Behandlung resultierte in der stärksten Reduktion der Tgf- β 1-Spiegel. Verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Etoposid war dieser Effekt signifikant ($p = 0,005$).

Die Behandlung mit Etoposid führte bei den 6606PDA-Zellen zu einer numerischen Reduktion der Tgf- β 1-Spiegel verglichen mit der Kontrolle. Navitoclax reduzierte die Spiegel signifikant verglichen mit der Kontrolle ($p = 0,001$). Die stärkste Reduktion des Tgf- β 1-Spiegel zeigte sich bei der mit Etoposid und Navitoclax behandelten Gruppe. Diese Reduktion war im Vergleich mit der Kontrollgruppe sowie Etoposid- und Navitoclax-Gruppe signifikant ($p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit Etoposid bei beiden Zelllinien zu numerischen Unterschieden der *Tgf-β1*-Spiegel führte. Die Behandlung mit Navitoclax führte bei den 6606PDA-Zellen zu signifikant reduzierten *Tgf-β1*-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe. Bei beiden Zelllinien reduzierte die kombinierte Behandlung die *Tgf-β1*-Spiegel am stärksten. Bei den Panc02-Zellen war dieser Effekt im Vergleich mit der Etoposidbehandlung signifikant, bei den 6606PDA-Zellen verglichen mit allen Behandlungsgruppen.

4.5.8 IL6

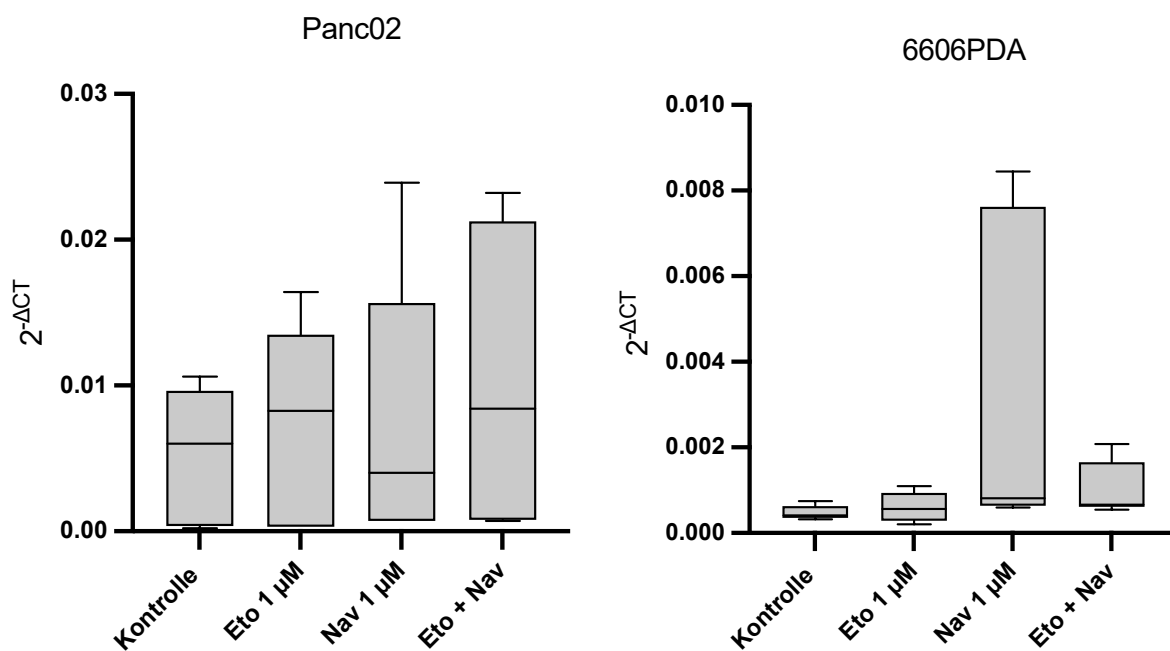


ABBILDUNG 14: IL6 GENEXPRESSION IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID, NAVITOCCLAX ODER DER KOMBINATION

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden für 48 h mit je 1 μM Etoposid, 1 μM Navitoclax oder der Kombination behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Mithilfe der Real-Time PCR Methode nach der TaqMan®-Technologie konnte die mRNA-Expression quantifiziert werden. Die C_t -Werte des Housekeepinggens *hprt* wurden von den C_t -Werten der Zielgene abgezogen und in einen $2^{-\Delta CT}$ -Wert transformiert. Die Verteilung der Daten aus mindestens 6 Einzelversuchen wurde unter Anzeige des Medians in Form von Boxplots dargestellt, die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Daten an. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * $p < 0,05$.

Sowohl bei den Panc02-Zellen, als auch bei den 6606PDA-Zellen führten die Behandlungen mit Etoposid und/oder Navitoclax zu keinen signifikanten Unterschieden der *IL6*-Spiegel zwischen den Behandlungsgruppen, wie in Abbildung 14 dargestellt. Bei den Panc02-Zellen zeigten die Daten eine breite Streuung, bei den 6606PDA-Zellen war der numerische Anstieg der *IL6*-Spiegel unter der Behandlung mit Navitoclax auffällig.

4.6 EINFLUSS VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE EXPRESSION AUSGEWÄHLTER PROTEINE

Um die Auswirkungen der Behandlung mit Etoposid und Navitoclax auf ausgewählte Protein-spiegel der Panc02- und 6606PDA-Zellen zu quantifizieren, wurden Immunoblotanalysen durchgeführt. Die Proteinquantifizierung von LC3B und γ H2AX, einschließlich der Normalisierung auf das Haushaltsprotein β -Actin und H2AX, erfolgten wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben.

4.6.1 LC3B

Als zentraler Bestandteil des Autophagiemechanismus dient LC3B als Marker für die Beurteilung der Autophagie-Aktivität. LC3B ist in zwei verschiedenen Isoformen vorhanden: LC3BI und LC3BII, die zytoplasmatische und membrangebundene Form (Schaaf et al., 2016). Wird Autophagie induziert, nimmt der Anteil an LC3BII zu und LC3BI ab (Chu et al., 2020) (Gong et al., 2014).

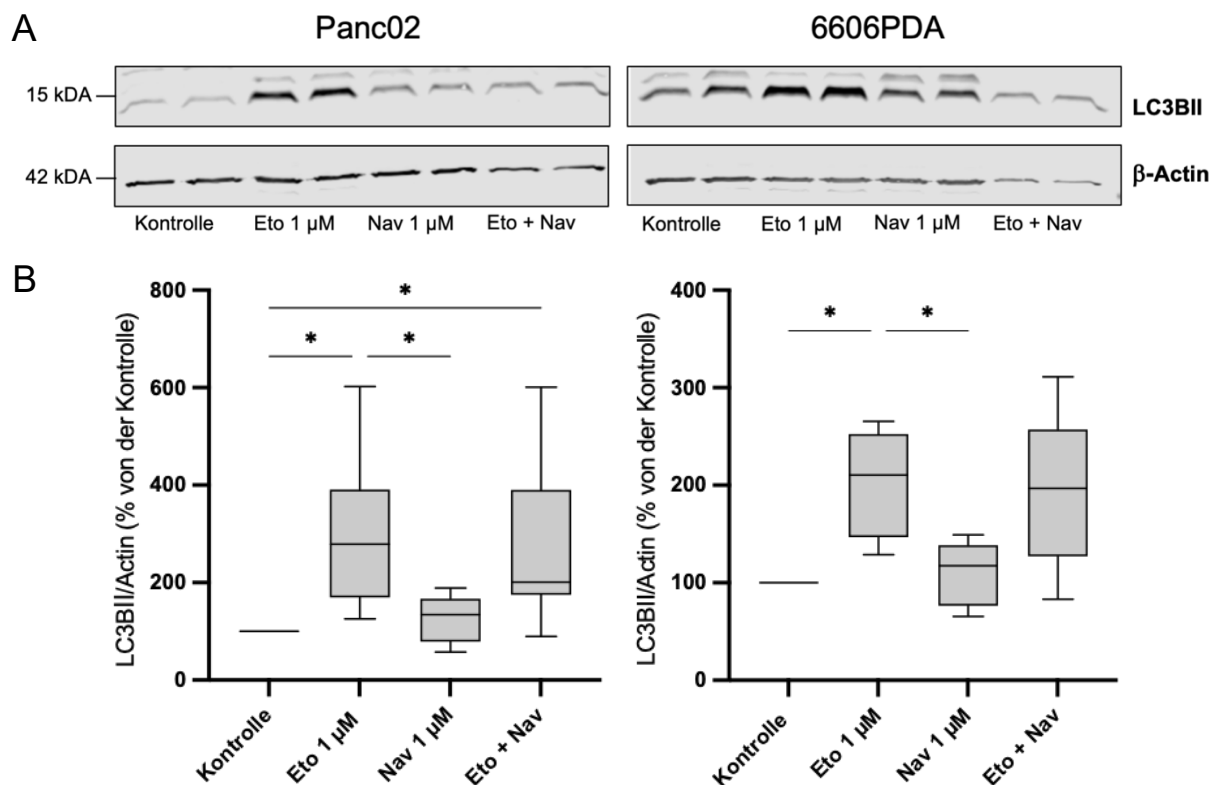


ABBILDUNG 15: EXPRESSION VON LC3BII IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND/ODER NAVITOCCLAX.

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden 48 h mit 1 μ M Etoposid, 1 μ M Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach Gewinnung der Zelllysate und SDS-PAGE folgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Die Proteinmenge von LC3BII wurde mittels indirekter Immundetektion unter Einsatz des *Odyssey Infrared Imaging* Systems quantifiziert. β -Actin diente hierbei als Haushaltsprotein zur Normalisierung der Proteinladung.

A) Beispielhafte Bilder der fluoreszenzmarkierten LC3BII- bzw. β -Actin-Proteinbanden. B) Durch β -Actin normalisierter LC3BII Gehalt, bezogen auf die Kontrolle. Dargestellt sind die Daten der Einzelversuche (Panc02 n = 8, 6606PDA n = 9) in Form von Boxplots unter Anzeige des Medians. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Einzelmesswerte. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Friedman Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * p < 0,05.

Abbildung 15A zeigt repräsentative Bilder der fluoreszenzmarkierten LC3BII- und β -Actin-Protein Banden in doppelter Bestimmung. Die Intensität der LC3BII-Bande schien rein optisch in Abhängigkeit der Behandlungen zu variieren. Sowohl bei den Panc02-Zellen als auch bei den 6606PDA-Zellen ließen sich bei den mit Etoposid behandelten Proben eine Steigerung der Intensität der LC3BII-Banden wahrnehmen. Die Behandlung mit Navitoclax bewirkte keinen optischen Unterschied. Die kombinierte Behandlung führte zu einer optisch abgeschwächten Signalintensität, sowohl für LC3BII als auch für β -Actin. Diese Eindrücke konnten durch eine anschließende Quantifizierung der Intensitäten der Banden bestätigt werden (Abbildung 15B) Die in Abbildung 15B dargestellten Daten zeigten eine statistisch signifikante Zunahme des LC3BII-Gehaltes durch die Behandlung der Panc02-Zellen mit Etoposid im Vergleich mit der Kontrolle (p = 0,003). Die Behandlung mit Navitoclax führte zu einer vergleichbaren Menge an LC3BII wie die Kontrolle. Verglichen mit den mit Etoposid behandelten Zellen war die Menge an LC3BII unter der Behandlung mit Navitoclax signifikant reduziert (p = 0,022). Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte zu einem Anstieg der LC3BII-Spiegel. Dieser Anstieg war verglichen mit der Kontrolle statistisch signifikant (p = 0,022). Verglichen mit der alleinigen Etoposidbehandlung war der LC3BII-Gehalt geringer.

Die 6606PDA-Zellen zeigten ein vergleichbares Verhalten wie die Panc02-Zellen. Die Behandlung mit Etoposid erhöhte die LC3BII-Spiegel statistisch signifikant (p < 0,001) im Vergleich mit der Kontrolle. Der Median lag bei 210 %. Navitoclax allein hatte keinen Einfluss auf die LC3BII-Spiegel im Vergleich mit der Kontrolle. Verglichen mit der alleinigen Etoposidbehandlung war die Menge an LC3BII bei den mit Navitoclax behandelten Zellen signifikant reduziert (p = 0,006). Die kombinierte Behandlung der 6606PDA-Zellen resultierte in einem Anstieg der LC3BII-Spiegel im Vergleich mit der Kontrollgruppe, der jedoch weniger ausgeprägt war als unter der alleinigen Etoposid-Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit Etoposid eine signifikante Zunahme der LC3BII-Proteinspiegel bei den Panc02- und 6606PDA-Zellen bewirkte. Die Behandlung mit Navitoclax hatte keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle. Die kombinierte Behandlung aus Etoposid und Navitoclax ging bei beiden Zelllinien mit erhöhten Proteinspiegeln von LC3BII einher. Bei den Panc02-Zellen war dieser Effekt, bezogen auf die Kontrolle, statistisch signifikant. Die Proteinspiegel unter der kombinierten Behandlung waren bei beiden Zelllinien numerisch niedriger als nach alleiniger Behandlung mit Etoposid.

4.6.2 γ H2AX

γ H2AX ist die phosphorylierte Form des Histonproteins H2AX. Durch Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, wie in seneszenten Zellen, wird H2AX phosphoryliert und dient somit als charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen (Biran et al., 2017) (Kuilman et al., 2010).

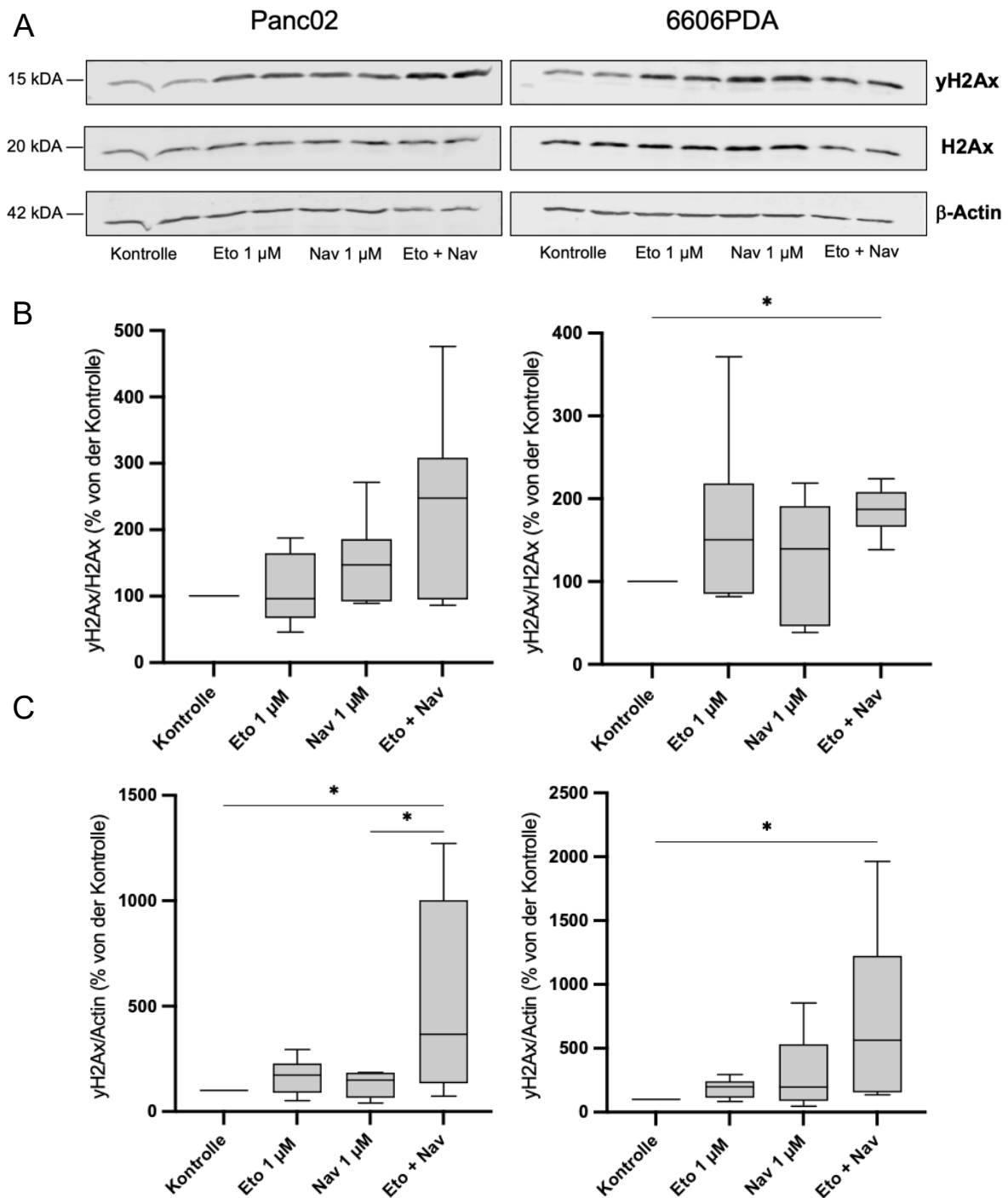


ABBILDUNG 16: EXPRESSION VON γ H2AX IN PANC02- UND 6606PDA-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND/ODER NAVITOCCLAX

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen wurden 48 h mit 1 μ M Etoposid, 1 μ M Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach Gewinnung der Zelllysate und SDS-PAGE folgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Die Proteinmenge von γ H2AX wurde mittels indirekter Immundetektion unter Einsatz des *Odyssey Infrared Imaging* Systems quantifiziert. β -Actin diente hierbei als Haushaltsprotein zur Normalisierung der Proteinladung. A) Beispielhafte Bilder der fluoreszenzmarkierten γ H2AX- bzw. β -Actin-Proteinbanden. B) Durch H2AX normalisiertes γ H2AX-Gehalt, bezogen auf die Kontrolle. C) Durch β -Actin normalisiertes γ H2AX Gehalt, bezogen auf die Kontrolle. Dargestellt sind die Daten der Einzelversuche (Panc02 n = 6, 6606PDA n = 8) in Form von Boxplots unter Anzeige des Medians. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum der Einzelmesswerte. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Friedman Test und anschließend Dunn's Test für Mehrfachvergleiche, * p < 0,05.

Abbildung 16 zeigt repräsentative Western-Blot-Bilder fluoreszenzmarkierter γ H2AX-, H2AX- und β -Actin-Proteine in Panc02- und 6606PDA-Zellen. Die Intensität der γ H2AX-Banden schien optisch in Abhängigkeit der Behandlungen zu variieren. Bei beiden Zelllinien nahm die Intensität der γ H2AX-Banden durch die Behandlungen mit Etoposid und/oder Navitoclax optisch zu. Insbesondere bei den Panc02-Zellen führte die kombinierte Behandlung zu einer deutlich gesteigerten optischen Intensität der γ H2AX-Banden. Diese Befunde wurden durch die quantitative Analyse der Proteinbanden bestätigt (siehe Abbildung 16B und C).

Abbildung 16B zeigt die quantitativ ermittelte und auf H2AX normalisierte Proteinmenge von γ H2AX. Bei den Panc02-Zellen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen. Die höchsten γ H2AX-Spiegel zeigten sich in der mit Etoposid und Navitoclax behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrolle.

Bei den 6606PDA-Zellen führten die Behandlungen mit Etoposid oder Navitoclax zu einem numerischen Anstieg der γ H2AX-Spiegel im Vergleich mit der Kontrolle. Die Behandlung der 6606PDA-Zellen mit der Kombination aus Etoposid und Navitoclax resultierte in einem signifikanten Anstieg des γ H2AX-Gehaltes im Vergleich mit der Kontrolle (p = 0,02).

Abbildung 16C zeigt die quantitativ ermittelte und auf β -Actin normalisierte Proteinmenge von γ H2AX. In Panc02-Zellen erhöhten sich unter der Behandlung mit Etoposid die γ H2AX-Spiegel um 72,6 % verglichen mit der Kontrolle. Die Behandlung mit Navitoclax führte ebenfalls zu einem numerischen Anstieg um 49 %. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax resultierte bei den Panc02-Zellen in einem signifikanten Anstieg des γ H2AX-Spiegels um 357 % verglichen mit der Kontrolle (p = 0,021). Dieser Anstieg des γ H2AX-Spiegels war auch im Vergleich mit der alleinigen Behandlung mit Navitoclax signifikant (p = 0,021).

Bei den 6606PDA-Zellen führten die alleinigen Behandlungen mit Etoposid oder Navitoclax zu einem numerischen Anstieg der γ H2AX-Spiegel im Vergleich mit der Kontrolle. Die Behandlung der 6606PDA-Zellen mit der Kombination aus Etoposid und Navitoclax resultierte in einem signifikanten Anstieg des γ H2AX-Gehaltes im Vergleich mit der Kontrolle (p = 0,001).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl bei den Panc02-Zellen als auch bei den 6606PDA-Zellen die alleinigen Behandlungen mit Etoposid und Navitoclax zu numerischen Erhöhungen der γ H2AX-Spiegeln führten, die jedoch nicht signifikant über dem Kontrollniveau lagen. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bewirkte bei beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme der auf β -Actin normalisierten γ H2AX-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe. Bei den Panc02-Zellen war dieser Effekt zudem im Vergleich mit den mit Navitoclax behandelten Zellen signifikant. Darüber hinaus zeigte sich in den 6606PDA-Zellen eine signifikante Zunahme der auf H2AX normalisierten γ H2AX-Spiegel unter der kombinierten Behandlung.

V. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung der biologischen Effekte des sequenziellen Einsatzes von Triggern der Seneszenz und der Senolyse anhand eines Modells zweier muriner Pankreaskarzinomzelllinien. In der Diskussion werden nachfolgend die experimentellen Ergebnisse des Einsatzes von Etoposid und Navitoclax analysiert, insbesondere in Hinblick auf die Induktion von Seneszenz und die Effizienz der Senolyse. Dabei lag der Fokus darauf, die Effekte in Panc02- und 6606PDA-Zellen zu untersuchen und mögliche zugrunde liegende Mechanismen sowie Zelltyp-spezifische Unterschiede zu diskutieren.

5.1 DIE ZELLVIABILITÄT UNTER DER BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND NAVITOCCLAX: HINWEISE AUF SENESZENZ UND SENOLYSE

Ein zentrales Charakteristikum seneszenten Zellen stellt der Zellzyklusarrest dar (Huang et al., 2022). Im Trypanblau-Ausschlusstest werden Zellen, basierend auf der Integrität ihrer Zellmembran, in lebend und tot klassifiziert. Da seneszente Zellen in der Regel eine intakte Zellmembran aufweisen und metabolisch aktiv bleiben, werden sie mittels Trypanblau-Ausschlusstest zu lebenden Zellen gezählt und erscheinen farblos. Auf dieser Grundlage wurde die Viabilität der Panc02- und 6606PDA-Zellen nach einer 48 h Behandlung mit je 1 μM Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen untersucht.

Bei den Panc02- sowie den 6606PDA-Zellen zeigte sich unter alleiniger Behandlung mit Etoposid eine signifikante Reduktion der Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es wurde angenommen, dass Etoposid die Seneszenz in Pankreaskarzinomzellen induziert, wie in mehreren Studien beschrieben wurde (Bang et al., 2019) (Teng et al., 2021). Daher wurde ein Wachstumsstopp erwartet, der sich in einer Stabilisierung der Anzahl lebender Zellen äußern sollte. Die Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, dass Etoposid nicht nur Seneszenz induziert, sondern auch zytotoxische und/oder pro-apoptotische Effekte auf die Zellen ausübt, was den beobachteten zusätzlichen Verlust an Zellviabilität hervorruft. Loison et al. berichten, dass in Zellen ein Wechsel von Seneszenz zu Apoptose durch verstärkte DNA-Schädigung ausgelöst werden kann, beispielsweise durch die Kombination O-GlcNAcylierungs-Inhibitoren mit niedrig dosierter Chemotherapie (Loison et al., 2024). Ergänzend dazu weisen Studien darauf hin, dass niedrigere Dosen Chemotherapie bevorzugt einen seneszenten Zustand induzieren, während höhere Dosen zur Apoptose führen (Lee and Lee, 2014) (Wang et al., 2022).

In den hier untersuchten Zelllinien könnte die durch Etoposid verursachte DNA-Schädigung diesen Schwellenwert überschritten haben, was den beobachteten Verlust der Zellviabilität

durch Apoptose erklärt. Die in Vorversuchen als optimal ermittelte Etoposid-Konzentration von 1 μ M, die eine aussagekräftige und zugleich zellschonende Wirkung zeigte, könnte Auswirkungen auf die Zellviabilität gehabt haben. Darüber hinaus ist es denkbar, dass seneszente Zellen mit geschädigter Zellmembran fälschlicherweise als tot klassifiziert wurden, obwohl sie noch metabolisch aktiv waren.

Die Monotherapie mit Navitoclax führte bei den Panc02-Zellen zu einem leichten Anstieg lebender Zellen, während bei den 6606PDA-Zellen eine Reduktion derselben beobachtet wurde. Diese Ergebnisse stimmten mit der Annahme überein, dass Navitoclax allein keinen konsistenten oder signifikanten Effekt auf die Viabilität der Pankreaskarzinomzellen ausübt.

Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bewirkte hingegen bei beiden Zelllinien einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität. Im Vergleich zur Monotherapie mit Etoposid reduzierte die Kombination die Zahl lebender Zellen numerisch weiter. Dies lässt darauf schließen, dass die Kombination eine verstärkte Wirkung entfaltet und steht im Einklang mit einer möglichen senolytischen Wirkung von Navitoclax, wie sie in früheren Studien beschrieben wurde (Bussian et al., 2018) (Zhu et al., 2016) (Chang et al., 2016).

Weiterhin wurde der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl analysiert. Dieser stieg bei beiden Zelllinien sowohl unter der Etoposid-Behandlung als auch der kombinierten Behandlung mit Etoposid und Navitoclax signifikant an. Bemerkenswert war dabei, dass der Anteil toter Zellen bei der kombinierten Behandlung im Vergleich zur Monotherapie mit Etoposid bei beiden Zelllinien signifikant stärker ausgeprägt war. Die beobachteten Effekte sind konsistent mit einer möglichen senolytischen Wirkung von Navitoclax, die durch die Reaktivierung apoptotischer Signalwege vermittelt wird, wie in früheren Arbeiten beschrieben (Kale et al., 2018) (Basu, 2022). Dennoch könnten diese Effekte auch, für sich allein betrachtet, auf eine Seneszenz-unabhängige Zytotoxizität der Substanzkombination zurückzuführen sein.

Zusammenfassend reduzierte Etoposid die Anzahl lebender Zellen in beiden Zelllinien signifikant, was mit einem Anstieg an toten Zellen einherging. Die Hinzunahme von Navitoclax verstärkte diesen Effekt durch eine zusätzliche Reduktion der Zellzahl und einen signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen.

5.2 SA- β -GAL-FÄRBUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG VON ETOPOSID-INDUZIERTER SENESZENZ UND NAVITOCCLAX-VERMITTELTEN SENOLYSE

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität des Enzyms SA- β -Gal analysiert, einem etablierten Biomarker für Seneszenz, dessen Aktivität in seneszenten Zellen gesteigert ist (Mohamad Kamal et al., 2020) (Crouch et al., 2022). Bereits 1995 von *Dimri* et al. beschrieben, gilt die SA- β -Gal-Färbung als eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Charakterisierung

des seneszenten Phänotyps (Dimri et al., 1995) (Itahana et al., 2007). Sie wird darüber hinaus häufig als Goldstandard-Marker für den Nachweis seneszenten Zellen bezeichnet (Ashraf et al., 2023). Die Zellen wurden für 48 h mit je 1 μ M Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt.

Es wurde erwartet, dass Etoposid den Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen erhöht, während Navitoclax diesen im Falle der Bestätigung seiner postulierten senolytischen Wirkung reduziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit Etoposid in beiden Zelllinien zu einem signifikant erhöhten Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen führte, was auf eine erfolgreiche Seneszenz-induktion hinweist. Dieser Effekt war bei den Panc02-Zellen mit einem Medianwert von 94,5 % nahezu vollständig ausgeprägt, bei den 6606PDA-Zellen fiel der Effekt hingegen deutlich geringer aus. Die beobachteten Unterschiede lassen auf zellspezifische Variationen in der Empfindlichkeit gegenüber der von Etoposid-induzierten Seneszenz schließen, die auf unterschiedliche biologische Eigenschaften der Zelllinien zurückzuführen sein könnten. Die Studie von *Partecke et al.* zeigte, dass Panc02-Tumoren, verglichen mit 6606PDA-Tumoren, ein undifferenziertes, aggressiveres Wachstum mit kürzerer Überlebenszeit der Mäuse aufwiesen (Partecke et al., 2011). Diese Merkmale könnten eine unterschiedliche Sensibilität der Pankreaskarzinomzellen gegenüber Seneszenz-induzierenden Behandlungen erklären.

Die alleinige Behandlung mit Navitoclax bewirkte keine signifikante Veränderung des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen bei beiden Zelllinien.

Interessanterweise führte die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bei den Panc02-Zellen ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des Anteils an SA- β -Gal⁺-Zellen verglichen mit der Kontrolle. Der Anteil an SA- β -Gal⁺-Zellen war nahezu identisch den mit Etoposid behandelten Zellen, was zunächst nahelegt, dass Navitoclax bei dieser Zelllinie keinen zusätzlichen Effekt hatte. Allerdings ist die insgesamt stark reduzierte Zellzahl zu beachten. Absolut betrachtet nahm sowohl die Zahl seneszenten als auch nicht-seneszenten Zellen ab. Bei den 6606PDA-Zellen hingegen wurde der signifikante Effekt von Etoposid durch die Zugabe von Navitoclax aufgehoben, was auf eine potenziell senolytische Wirkung von Navitoclax in dieser Zelllinie hinweist.

Trotz dieser Effekte waren bei beiden Zelllinien auch nach der kombinierten Behandlung noch senescente Zellen nachweisbar, was darauf hindeutet, dass Navitoclax nicht in der Lage war, alle seneszenten Zellen zu eliminieren. Da die Gesamtzellzahl durch die Behandlung reduziert wurde und tote Zellen von der Zählung ausgeschlossen wurden, könnte der Anteil verbleibender SA- β -Gal⁺-Zellen überrepräsentiert sein. Eine genaue Quantifizierung und weiterführende Analysen sind notwendig, um die tatsächliche Dynamik der Seneszenzinduktion und der Elimination seneszenten Zellen präzise zu bewerten.

Zudem unterstreichen die Ergebnisse eine Zelllinien-spezifische Wirkung der Kombination mit

Etoposid und Navitoclax. Nur bei den 6606PDA-Zellen ergaben sich deutliche Hinweise auf eine senolytische Wirkung des Bcl-2-Inhibitors. Diese Beobachtung stützt die Hypothese einer Zelltyp-spezifischen Ausprägung der Seneszenz, wie sie auch von *Hernandez-Segura et al.* beschrieben wurde (Hernandez-Segura et al., 2017).

Die nahezu vollständige Positivität der Panc02-Zellen für SA- β -Gal in der mit Etoposid behandelten Gruppe deutet darauf hin, dass diese Zelllinie besonders empfindlich auf die Seneszenz-induzierenden Effekte von Etoposid reagiert. Im Gegensatz dazu weisen die 6606PDA-Zellen eine größere Streuung auf, was auf eine größere Variabilität der Seneszenzantwort hinweist. Die in Vorversuche getestete Konzentration von 1 μ M könnte unterschiedlich intensive Effekte auf die Zelllinien haben. Obwohl die Verwendung einer einheitlichen Konzentration die Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien gewährleistet, stellt sie auch eine methodische Limitation dar, da mögliche Sensibilitätsunterschiede unberücksichtigt bleiben.

5.3 PROLIFERATIONSRATE ALS INDIKATOR DER SENESZENZINDUKTION UND SENOLYSE DURCH ETOPOSID UND NAVITOCCLAX

Darüber hinaus wurde zur detaillierten Untersuchung des Seneszenz-bedingten Wachstumsstopps und des Zellzyklus-Arrest die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen mithilfe des BrdU-Einbautest analysiert. Die Zellen wurden hierfür 48 h mit je 1 μ M Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt.

Ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen ist deren Wachstumsstopp, der sie daran hindert, weitere Zellteilungen durchzuführen (Hernandez-Segura et al., 2018). Entsprechend wurde unter der Behandlung mit Etoposid eine reduzierte Proliferationsrate im BrdU-Einbautest erwartet. Unter der Annahme, dass Navitoclax seneszente Zellen selektiv eliminiert, wurde bei der Kombination beider Substanzen eine stabile oder leicht erhöhte Proliferationsrate angenommen.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus unter der Behandlung mit Etoposid, was auf eine erfolgreiche Induktion des Zellzyklusarrests hinweist.

Interessanterweise bewirkte die alleinige Behandlung mit Navitoclax eine signifikante Zunahme des BrdU-Einbaus. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass Navitoclax bereits seneszent gewordene Zellen eliminierte und so den Zugang zu Nährstoffen und Raum für die übrigen Zellen erleichterte, was ihre Proliferationsaktivität erleichterte. Unterstützend dazu zeigten die Zellviabilitätszählungen unter der Navitoclaxbehandlung eine reduzierte Zellzahl, was diesen Zusammenhang zusätzlich bekräftigte (s. oben).

Diese Beobachtungen werfen darüber hinaus die Frage auf, ob eine Monotherapie mit Senolytika wie Navitoclax ungewollt zur Tumorprogression beitragen könnte. Aktuelle Studien

untersuchen den Einsatz von Senolytika vor allem in der Hautalterung und verbesserter Wundheilung. Beispielsweise zeigten *Shvedova et al.* in ihrer Studie positive Effekte der topischen Anwendung von Navitoclax auf die Wundheilung bei Mäusen (*Shvedova et al.*, 2024). *Takaya et al.* berichten zudem, dass Navitoclax Altersphänomene menschlicher Haut verbessert, ohne dabei Nebenwirkungen hervorzurufen (*Takaya et al.*, 2023). Diese Befunde sind jedoch kritisch zu betrachten vor dem Hintergrund, dass eine Monotherapie mit Navitoclax zumindest bei Pankreaskarzinomzellen offenbar einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation zu haben scheint.

Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei den Panc02-Zellen zu einer signifikanten Reduktion des BrdU-Einbaus verglichen mit der alleinigen Etoposidbehandlung. Bei den 6606PDA-Zellen zeigte sich ein nahezu stabiler BrdU-Einbau ohne signifikante Veränderung. Dieses Ergebnis entspricht teilweise den anfänglichen Erwartungen: Während die kombinierte Behandlung der 6606PDA-Zellen das erwartete Muster einer stabilen Proliferationsrate zeigte, führte sie bei den Panc02-Zellen zu einer Reduktion des BrdU-Einbaus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der durch Navitoclax-induzierten Senolyse liegen, die die Gesamtzellzahl verringert und somit die Anzahl proliferierender Zellen reduziert, was wiederum die gemessene Proliferationsrate beeinflussen könnte.

Eine wichtige methodische Einschränkung bei der Interpretation der Ergebnisse liegt im BrdU-Einbautest selbst: Eine stark reduzierte Zellzahl kann die Ergebnisse verzerren, indem sie die relative Proliferationsrate der verbleibenden Zellen überrepräsentiert.

5.4 SAHF ALS MARKER SENESZENTER ZELLEN UND DEREN MODULATION DURCH ETOPOSID UND NAVITOCCLAX

Um das Verständnis der charakteristischen Merkmale seneszenten Zellen zu vertiefen, wurde im nächsten Schritt die Bildung Seneszenz-assoziiierter Heterochromatin-Foci untersucht. Dies sind spezifische Heterochromatinstrukturen, die mikroskopisch in seneszenten Zellen nachgewiesen werden können (*Narita et al.*, 2003). Zur Analyse dieser Strukturen wurden die Zellen für 48 h mit je 1 μ M Etoposid, Navitoclax oder der Kombination beider Substanzen behandelt und anschließend mithilfe der DAPI-Färbung quantifiziert. Neben der Bildung von SAHF zählen die Vergrößerung des Zellkernes und des Zellkörpers sowie ein verbreitertes und flächigeres Erscheinungsbild zu den typischen Merkmalen seneszenten Zellen.

Unter der Annahme, dass Etoposid Seneszenz in den Pankreaskarzinomzellen induziert, sollten die Zellen ein verbreitertes, flächigeres Erscheinungsbild sowie eine Zunahme der SAHF aufweisen. Navitoclax allein sollte keinen sichtbaren Einfluss auf die Pankreaskarzinomzellen haben. Bei einer angenommenen senolytischen Wirkung durch die Hinzunahme

von Navitoclax sollte die kombinierte Behandlung eine Elimination der seneszenten Zellen und dementsprechend eine Reduktion der SAHF bewirken.

Die morphologischen Veränderungen der mit Etoposid behandelten Zellen entsprachen weitgehend den Erwartungen. Die Zellen beider Zelllinien zeigten eine Vergrößerung der Zellkerne und ein breiteres, helleres Erscheinungsmuster, vergleichbar mit den Befunden der SA- β -Gal-Färbung. Dieser Befund deutet einmal mehr auf eine Seneszenz-Induktion durch Etoposid hin. In der Auswertung der DAPI-Färbung zeigten jedoch nur die 6606PDA-Zellen die erwartete signifikante Zunahme an SAHF. Bei den Panc02-Zellen hingegen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erkennbar. Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, dass bei den 6606PDA-Zellen eine Seneszenzinduktion erfolgreich war, andererseits unterstreichen sie die bereits erwähnten Zelltyp-spezifischen Unterschiede der Seneszenzausprägung unterschiedlicher Zellen. Kosar et al. berichteten in ihrer Studie über die eingeschränkte Ausprägung von SAHF bei Genotoxin-induzierter Seneszenz, wie sie sich auch hier darstellt (Kosar et al., 2011).

Zellen, die mit Navitoclax behandelt wurden, zeigten weder im Erscheinungsbild noch in der Anzahl der SAHF Unterschiede zu der Kontrollgruppe; die Zellkerne wirkten ebenfalls klein und rund. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass Navitoclax allein keine direkte Wirkung auf die Bildung von SAHF und damit auf die Seneszenzinduktion hat.

Die mit der Kombination beider Substanzen behandelten Zellen ähnelten im Erscheinungsbild den mit Etoposid behandelten Zellen, traten jedoch in deutlich geringerer Anzahl auf. Zudem waren deutlich mehr Zellfragmente sichtbar, was auf apoptotische Vorgänge im Rahmen einer Senolyse der kombinierten Behandlung hinweisen könnte. Die Anzahl an SAHF unterstützte diese Aussage zumindest bei den 6606PDA-Zellen: Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der SAHF im Vergleich mit der Kontrollgruppe, was auf eine mögliche selektive Elimination seneszenten Zellen durch Navitoclax hindeutet. Bei den Panc02-Zellen hingegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der SAHF.

Die Diskrepanz der Befunde bei den beiden Zelllinien wirft Fragen auf. In der Literatur wird diskutiert, inwieweit SAHF ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen darstellen und wie eng sie in kausalem Zusammenhang zum Eintreten der Seneszenz stehen (Kumari and Jat, 2021) (Paluvai et al., 2020) (Kosar et al., 2011).

Darüber hinaus bleiben methodische Limitierungen zu diskutieren, wie die möglicherweise durch die reduzierte Zellzahl erschwerte Zählung oder die potenziell eingeschränkte Genauigkeit durch die Analyse am Computerbildschirm. Trotz dieser methodischen Überlegungen ist anzumerken, dass die Zelllinien unter identischen Bedingungen behandelt wurden, sodass die Unterschiede eher auf Zelltyp-spezifische Eigenschaften und nicht auf technische Variabilitäten zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer

Untersuchungen, um die Rolle von SAHF in der Seneszenz sowie Zelltyp-spezifische Unterschiede besser zu verstehen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren.

5.5 WIRKUNG VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE EXPRESSION SENESZENZASSOZIIERTER GENE

Die Analyse der Genexpression in den Zelllinien Panc02 und 6606PDA mittels Real-Time PCR sollte Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen von Etoposid und Navitoclax bei der Induktion von Seneszenz bzw. Senolyse liefern. Seneszenten Zellen zeichnen sich durch charakteristische Veränderungen ihres Genexpressionsprofils aus. Daher liefert die Analyse der mRNA-Expression ausgewählter Seneszenz-assoziiierter Gene wichtige Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen der Seneszenz. Der Fokus lag auf Genen, die Modulatoren oder Marker für den Zellzyklusarrest darstellen, wie *Cdkn1a*, *Trp53* und *Mdm2* (López-Domínguez et al., 2021) (Vousden and Prives, 2009) (Huang et al., 2022) (Shi and Gu, 2012) sowie auf wesentlichen Komponenten des SASP, darunter CXCL2, IL6, TGF- β 1 und Serpine1 (Acosta et al., 2013) (Islam et al., 2023) (Rovira et al., 2022). *Cdk5* wurde aufgrund seiner potenziellen Rolle in Tumorzellprozessen und Signalregulation untersucht (Shupp et al., 2017). Erwartet wurde, dass unter der Behandlung mit Etoposid die Expression der Marker des Zellzyklusarrests, *Cdkn1a*, *Trp53* und *Mdm2*, ansteigt. Die durch Etoposid induzierten DNA-Schäden aktivieren p53-vermittelte Signalwege. Als Folge wird *Cdkn1a* hochreguliert, wodurch der Zellzyklus blockiert und eine Seneszenzantwort ausgelöst wird (Di Micco et al., 2021).

Tatsächlich zeigte sich bei den Panc02- und 6606PDA-Zellen eine numerische Erhöhung der *Cdkn1a*-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle. Das für p21 codierende Gen *Cdkn1a* fungiert als Regulator der Zellzyklusprogression in der G1-Phase und gilt als etablierter Biomarker der Seneszenz (Huang et al., 2022). Dieser Anstieg, auch wenn er statistisch nicht signifikant war, deutet auf eine erfolgreiche Seneszenzinduktion durch Etoposid hin. Entgegen den Erwartungen reduzierte die Behandlung mit Etoposid die *Trp53*-Spiegel in den 6606PDA-Zellen signifikant, während bei den Panc02-Zellen kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden von Ge et al. und He et al. beschrieben, die einen Rückgang der *Trp53*-Spiegel in bestimmten Zellen nach dem Eintritt in die Seneszenz dokumentierten (Ge et al., 2021) (He et al., 2020). Auch in der aktuellen Studie von Govender et al. wurde nach induzierter Seneszenz kein Unterschied in den *Trp53*-Spiegeln festgestellt (Govender et al., 2024). Beck et al. berichten zudem, dass in späten Stadien der Seneszenz sogar ein Rückgang der *Trp53*-Spiegel beobachtet werden kann (Beck et al., 2020). Obwohl die Inkubationszeit von 48 h in Vorversuchen als optimal identifiziert wurde, könnte sie eine Limitation darstellen und nicht ausreichen, um späte Seneszenzprozesse vollständig abzubilden.

Die *Mdm2*-Spiegel waren bei beiden Zelllinien unter der Behandlung mit Etoposid signifikant erhöht, was auf die Rückkopplungsschleife zwischen P53 und MDM2 hindeutet. Das Gen MDM2 ist ein negativer Regulator von P53 (Shi and Gu, 2012) und wird laut Lin et al. in Tumoren häufig überexprimiert (Lin et al., 2024).

Die Behandlung mit Navitoclax führte bei den Panc02- und 6606PDA-Zellen zu keinen signifikanten Veränderungen der *Cdkn1a*- und *Trp53*-Spiegel. Hingegen reduzierte Navitoclax die *Mdm2*-Spiegel bei den Panc02-Zellen signifikant, was wiederum auf die negative Rückkopplungsschleife zwischen P53 und MDM2 zurückzuführen sein könnte. Unterstützend beschreiben Wang et al. eine Modulation und Reduktion der Expression von MDM2 durch ein stabilisiertes P53 (Wang, 2023). Bei den 6606PDA-Zellen war dieser Effekt nicht erkennbar. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Panc02- und 6606PDA-Zellen unterschiedliche Sensibilitäten gegenüber Navitoclax aufweisen. Zhu et al. beschreiben unterstützend ebenfalls eine Zelltypspezifische senolytische Wirkung von Navitoclax (Zhu et al., 2016).

Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bewirkte bei beiden Zelllinien eine numerische Reduktion der *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Spiegel verglichen mit der alleinigen Etoposidbehandlung, wobei die Reduktion der *Mdm2*-Spiegel bei den 6606PDA-Zellen signifikant war. Die Hinzunahme von Navitoclax schien den Effekt von Etoposid abgeschwächt zu haben, was auf eine potenzielle Senolyse hindeutet. Die *Trp53*-Spiegel waren ebenfalls numerisch reduziert, bei den 6606PDA-Zellen war die Reduktion, verglichen mit der Kontrolle, signifikant.

Die Gene *Cxcl2*, *Il6*, *Serpine1* und *Tgf- β 1* repräsentieren wichtige SASP-Faktoren und dienen als Indikatoren für die sekretorischen Eigenschaften seneszenten Zellen (Dong et al., 2024). Die analysierten SASP-Faktoren zeigten unter der Behandlung mit Etoposid keine signifikante Veränderung verglichen mit der Kontrolle. Bei den Panc02-Zellen wurden lediglich numerische Anstiege der Spiegel beobachtet. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Birch und Gil, die den SASP als ein heterogenes und dynamisches Phänomen beschreiben, dessen Zusammensetzung sowohl vom Zelltyp als auch von der Art der auslösenden Faktoren beeinflusst wird (Birch and Gil, 2020). Die aktuelle Studie von Kumar et al. zeigt ergänzend, dass selbst zwei Substanzen, die dasselbe Enzym Topoisomerase II hemmen – Etoposid und Doxorubicin – zu signifikanten Unterschieden in ihren SASP-Profilen führen können (Kumar et al., 2024). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Fehlen einer Hochregulation einzelner SASP-Faktoren nicht zwingend als Ausschlusskriterium für eine erfolgreich induzierte Seneszenz gewertet werden kann. Vielmehr ist eine ganzheitliche Betrachtung des SASP erforderlich, um Rückschlüsse auf die Seneszenz zu ziehen.

Die *Il6*-Spiegel zeigten in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings war die Expression des Gens in den verwendeten Zellen generell niedrig. Der teilweise über 30 liegende CT-Wert von *Il6* deutet darauf hin, dass die mRNA-Expression

nahe der Nachweisgrenze lag, was die Zuverlässigkeit der Quantifizierung beeinträchtigen könnte.

Die Behandlung mit Navitoclax bewirkte Zelllinien-spezifische Unterschiede in der Genexpression der SASP-Faktoren. Insbesondere führte Navitoclax bei den 6606PDA-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der *Tgf-β1*-Spiegel. Dieser Befund könnte auf eine mögliche senolytische Wirkung von Navitoclax hindeuten, da TGF-β1 eine zentrale Rolle im SASP einnimmt und die sekretorischen Eigenschaften seneszenten Zellen maßgeblich beeinflusst (Acosta et al., 2013).

Unter der Annahme, dass Navitoclax als Senolytikum seneszente Zellen selektiv eliminiert, wurden für die SASP-Faktoren unter der kombinierten Behandlung reduzierte Spiegel erwartet. Tatsächlich führte die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der *Tgf-β1*-Spiegel im Vergleich zur alleinigen Etoposidbehandlung. Bei den 6606PDA-Zellen war dieser Effekt zudem im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Diese Befunde stützen die Hypothese einer möglichen senolytischen Wirkung durch Hinzunahme von Navitoclax. Bei den Panc02-Zellen reduzierten sich die *Cxcl2*-Spiegel numerisch. Die Studie von Takikawa et al. berichtete, dass die *Cxcl2*-Spiegel in pankreatischen Sternzellen nach induzierter Seneszenz deutlich erhöht waren (Takikawa et al., 2022). Die beobachtete Reduktion der *Cxcl2*-Spiegel bei den Panc02-Zellen könnte als ein weiterer Hinweis auf die senolytische Aktivität von Navitoclax interpretiert werden.

Interessanterweise zeigte die kombinierte Behandlung in den Panc02-Zellen einen signifikanten Anstieg der *Serpine1*-Spiegel entgegen der Annahme, dass SASP-Faktoren generell reduziert werden. Das *Serpine1*-Gen codiert den Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), der als Mediator der Seneszenz gilt. Wang et al. und Zhang et al. beschreiben einen Anstieg von *Serpine1* als Marker der Seneszenzinduktion (Wang et al., 2023) (Zhang et al., 2024). Der beobachtete Anstieg der *Serpine1*-Spiegel unter der Kombinationstherapie könnte der Hypothese einer Senolyse durch Navitoclax widersprechen. Vielmehr deutet er darauf hin, dass die Kombinationstherapie in den Zelllinien unterschiedliche und möglicherweise gegensätzliche Mechanismen aktiviert. Andererseits sind die Funktionen von *Serpine1* in Pankreaskarzinomzellen bisher wenig erforscht, und es bleibt unklar, ob dieses Gen in dem konkreten Kontext als verlässlicher Seneszenzmarker betrachtet werden kann.

Darüber hinaus wurden die *Cdk5*-Spiegel analysiert. Bei den Panc02-Zellen führte die Behandlung mit Etoposid zu einem numerischen Anstieg der *Cdk5*-Spiegel. Laut Mao und Hinds ist CDK5 an den morphologischen Veränderungen seneszenten Zellen beteiligt (Mao and Hinds, 2010), weshalb diese Erhöhung als weiterer Hinweis auf eine erfolgreiche Seneszenzinduktion gelten kann. Allerdings zeigten die Panc02-Zellen keine signifikanten Unterschiede der *Cdk5*-Spiegel zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Behandlung mit Navitoclax reduzierte die *Cdk5*-Spiegel bei den 6606PDA-Zellen signifikant. *Cdk5* wird in *Kras*-mutierten Pankreaskarzinomen, wie den 6606PDA-Zellen, überexprimiert und durch die Spaltung des Proteins p35 zu p25 aktiviert, wonach es die Migration und Invasion von Tumorzellen fördert (Nikhil and Shah, 2023) (Eggers et al., 2011). Diese Aktivierung ist zudem essenziell für die morphologischen Veränderungen seneszenten Zellen (Mao and Hinds, 2010). Die beobachtete Reduktion der *Cdk5*-Spiegel passt daher zu einer senolytischen Wirkung von Navitoclax, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die kombinierte Behandlung die *Cdk5*-Spiegel der 6606PDA-Zellen zusätzlich numerisch reduzierte.

Zusammengefasst ergab die Analyse der Genexpression somit mehrfache Hinweise, dass Etoposid in beiden Zelllinien Seneszenz induzierte. Navitoclax zeigte Zelltyp-spezifische senolytische Effekte, die durch die Kombinationstherapie verstärkt hervortraten.

5.6 EFFEKTE VON ETOPOSID UND NAVITOCCLAX AUF DIE PROTEINE LC3B UND γ H2AX

LC3BII ist die membrangebundene Form von LC3B und dient als etablierter Marker für die Autophagieaktivität (Chu et al., 2020). Autophagie ist ein essenzieller zellulärer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase durch Abbau und Recycling beschädigter oder fehlgefalteter Proteine sowie defekter Organellen (Talukdar et al., 2021). Wird Autophagie induziert, nimmt der Anteil an LC3BII zu und LC3BI ab (Chu et al., 2020) (Gong et al., 2014). Obwohl Autophagie in seneszenten Zellen verstärkt auftritt, bleiben die genauen Funktionen in der Regulation der Seneszenz weiterhin Bestandteil aktueller Forschung (Kwon et al., 2017). In beiden untersuchten Zelllinien führte die Behandlung mit Etoposid zu einem statistisch signifikanten Anstieg der LC3BII-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Etoposid durch die Induktion von DNA-Schäden eine erhöhte Autophagieaktivität bewirkt. Interessanterweise wurde LC3 in der Literatur nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern lokalisiert, wo es im basalen Zustand mit Lamin B1 interagiert (Cassidy and Narita, 2022). Die Studie von Dou et al. zeigte zudem, dass diese Interaktion unter zellulärem Stress den Abbau von Lamin B1 einleitet und so die Seneszenz fördert (Dou et al., 2015). Der durch Etoposid-induzierte Anstieg der Autophagieaktivität könnte somit auch als Hinweis auf induzierte Seneszenz gewertet werden.

Die Frage, ob die erhöhten LC3BII-Spiegel tatsächlich mit der Induktion von Seneszenz korrelieren, bleibt jedoch offen. Während Bernard et al. in ihrer Studie zeigten, dass Autophagie in Fibroblasten die Seneszenz fördert (Bernard et al., 2020) und Baisantry et al. diese Beobachtung durch Hinweise auf proseneszente Veränderungen durch Autophagie stützten (Baisantry et al., 2016), beschrieben Livingston et al. im Gegensatz dazu, dass erhöhte Autophagie mit einer Suppression von Seneszenzmarkern assoziiert ist (Livingston et al., 2023).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der Beziehung zwischen Autophagie und Seneszenz.

Navitoclax hatte keinen signifikanten Effekt auf die LC3BII-Spiegel im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Beobachtung steht im Einklang mit der Funktion von Navitoclax als BCL-2-Inhibitor und Senolytikum, das primär die Elimination seneszenten Zellen bewirkt, ohne direkt die Autophagie zu modulieren.

Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei beiden Zelllinien zu einem Anstieg der LC3BII-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle, jedoch in geringerem Ausmaß als unter der alleinigen Etoposidbehandlung. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung ist, dass Navitoclax durch die Senolyse die Zellpopulation reduziert, wodurch die Anzahl potenziell Autophagie-aktiver Zellen abnimmt.

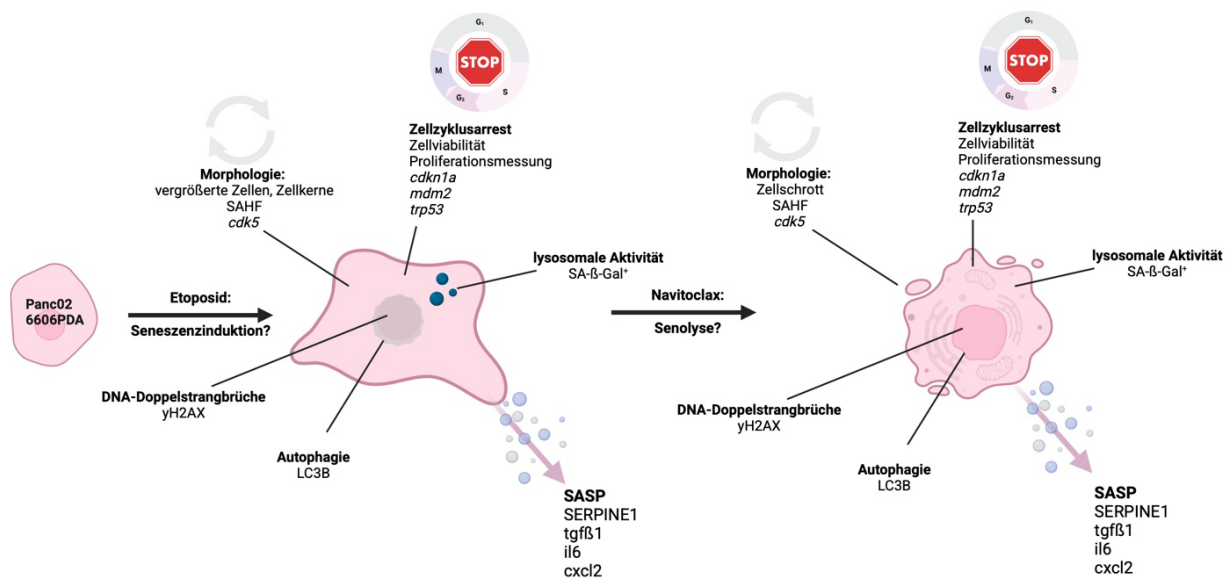
Die phosphorylierte Form der Histon-Variante H2AX, auch bekannt als γ H2AX, wird häufig als äußerst sensibler und spezifischer Marker für DNA-Doppelstrangbrüche verwendet (Basei et al., 2024). Studien zeigen, dass die Phosphorylierung von H2AX erforderlich ist, um den Zellzyklusarrest einzuleiten (Fragkos et al., 2009). Darüber hinaus werden erhöhte γ H2AX-Spiegel als charakteristisches Merkmal für die Induktion von Seneszenz betrachtet (Biran et al., 2017) (Kuilman et al., 2010).

Unter der Etoposidbehandlung zeigten beide Zelllinien eine numerische Zunahme der auf β -Actin normalisierten γ H2AX-Proteinspiegel. Dies stützt die Hypothese, dass Etoposid durch DNA-Schäden die Induktion von Seneszenz fördert. Govender et al. berichten ergänzend von einer verstärkten Bildung von γ H2AX-Foci nach induzierter Seneszenz (Govender et al., 2024). Chin et al. beschreiben die Phosphorylierung von H2AX zudem als molekularen Marker der Seneszenz (Chin et al., 2023).

Neben der Seneszenz könnte die Erhöhung von γ H2AX jedoch auch auf andere DNA-Schadensantworten, insbesondere die Apoptose, hinweisen. Liu et al. zeigen, dass eine Reduktion von H2AX die Aktivierung proapoptotischer Signalwege begünstigt (Liu et al., 2019). Zudem beschreiben Kuno et al., dass die Phosphorylierung von H2AX an Ser139 die Aktivierung von NRF2 vermittelt, was über erhöhte ROS apoptotische Signalwege stimuliert (Kuno et al., 2023). Auch Qiu et al. berichten in ihrer aktuellen Studie von einer Korrelation zwischen H2AX-Phosphorylierung und Apoptose (Qiu et al., 2024). Der unter Etoposid beobachtete Anstieg könnte sowohl Seneszenz- als auch Apoptose-assoziierte Mechanismen widerspiegeln. Die Behandlung mit Navitoclax bewirkte bei beiden Zelllinien leichte numerische Anstiege der γ H2AX-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe. Dieser Befund steht im Einklang mit der bekannten Wirkweise von Navitoclax, das durch seine hohe Affinität zu anti-apoptotischen BCL-2-Proteinen als BCL-2-Inhibitor agiert, jedoch keinen primären DNA-Schaden induziert (Mohamad Anuar et al., 2020).

Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte bei beiden Ziellinien zu einer signifikanten Erhöhung der auf β -Actin normalisierten γ H2AX-Spiegel verglichen mit der Kontrolle. Bei den 6606PDA-Zellen war dieser Anstieg zudem bei den auf H2AX normalisierten Spiegeln signifikant. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Kombination entweder verstärkt Seneszenz- oder Apoptose-assoziierte Prozesse aktiviert. Eine Aktivierung apoptotischer Mechanismen würde die Hypothese einer Wirkung von Navitoclax als Senolytikum unterstützen, das seneszente Zellen durch die Induktion von Apoptose eliminiert (Zhu et al., 2016). Navitoclax bindet an die BH3-Domänen von BCL-2, BCL-XL sowie BCL-W und verdrängt die pro-apoptotischen Effektoren BAK und BAX. Dadurch werden pro-apoptotische Signalwege reaktiviert (Kale et al., 2018) (Basu, 2022). Die Kombination könnte somit gezielt Zellen eliminieren, die durch Etoposid-induzierte DNA-Schäden entstanden sind.

5.7 INTEGRATIVE BETRACHTUNG DER ZELLSPEZIFISCHEN REAKTIONEN UND AUSBLICK



	Panc02-Zellen			6606PDA-Zellen		
	Eto	Nav	Kombi (zu Eto)	Eto	Nav	Kombi (zu Eto)
Zelltodrate	↑	=	↑	↑	=	↑
Lebende Zellen	↓	=	↓ (n.s.)	—	=	↓ (n.s.)
SA-β-Gal ⁺ -Zellen	↑	=	=	↑	=	↓ (n.s.)
Proliferation	↓	=	↓	↓	=	↓ (n.s.)
Anzahl SAHF	=	=	=	↑	=	↓
<i>Cdkn1a</i>	↑ (n.s.)	=	↓ (n.s.)	↑ (n.s.)	=	↓ (n.s.)
<i>Cdk5</i>	=	=	=	=	↓	↓
<i>Cxcl2</i>	=	=	↓ (n.s.)	=	=	=
<i>Mdm2</i>	↑	↓	↓ (n.s.)	↑	=	↓ (n.s.)
<i>Trp53</i>	=	=	=	↓	=	↓ (n.s.)
<i>Serpine1</i>	=	=	=	=	=	↑
<i>Tgf-β1</i>	=	=	↓	=	↓	↓
<i>Il6</i>	=	=	=	=	=	=
LC3BII	↑	=	↓ (n.s.)	↑	=	↓ (n.s.)

γ H2AX/H2AX	=	=	↑ (n.s.)	=	=	↑ (n.s.)
γ H2AX/ β -Actin	=	=	↑ (n.s.)	=	=	↑ (n.s.)

↑ Erhöhung des Parameters

↓ Abnahme des Parameters

= kein Unterschied

n.s. Unterschied ohne Signifikanz

ABBILDUNG 17: INTEGRATIVE BETRACHTUNG

Die Abbildung veranschaulicht die Effekte der Behandlungen mit Etoposid (Eto), Navitoclax (Nav) und ihrer Kombination (Kombi) auf verschiedene zelluläre Parameter in Panc02- und 6606PDA-Zellen.

Der obere Teil der Abbildung stellt schematisch die untersuchten Parameter hinsichtlich einer durch Etoposid induzierten Seneszenz und durch Navitoclax induzierten Senolyse dar. Der untere Teil der Abbildung fasst die tatsächlich beobachteten Effekte der Behandlungen mit Etoposid, Navitoclax und ihrer Kombination auf zelluläre und molekulare Parameter in Panc02- und 6606PDA-Zellen zusammen. Die Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Veränderungen dargestellt: Ein „↑“ kennzeichnet eine Erhöhung, ein „↓“ eine Abnahme, ein „=“ keine Veränderung und „n.s.“ markiert die Unterschiede ohne Signifikanz. Die Ergebnisse der Behandlungen mit Etoposid und Navitoclax beziehen sich jeweils auf die Kontrollgruppe, während die kombinierte Behandlung aus Gründen der Übersichtlichkeit mit der mit Etoposid behandelten Gruppe verglichen wurde.

Erstellt mit Biorender.com. Eigene Darstellung.

In der Gesamtschau zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung mit Etoposid als Topoisomerase-II-Inhibitor einen seneszenten Zustand in beiden murinen Pankreaskarzinomzelllinien induziert (Abbildung 17). Die im Abschnitt „Zielstellung der Arbeit“ formulierte Arbeitshypothese wurde somit bestätigt. Die Seneszenz ging mit den in Abbildung 17 dargestellten charakteristischen zellulären und molekularen Veränderungen einher, wie einem stabilen Zellzyklusarrest, verstärkter Autophagie und DNA-Schäden. Die nahezu vollständige SA- β -Gal-Positivität der Panc02-Zellen und die signifikante, wenn auch geringere, Zunahme in 6606PDA-Zellen bestätigten die erfolgreiche Seneszenzinduktion. Morphologische Veränderungen wie vergrößerte Zellkerne und die Bildung von SAHF, insbesondere in 6606PDA-Zellen, untermauern diese Schlussfolgerung. Die Ergebnisse stimmen mit aktuellen Studien überein, die Etoposid als effektiven Seneszenzinduktor beschreiben und nutzen (Kumar et al., 2024) (Huang et al., 2024). Der signifikante Verlust an Zellviabilität unter Etoposid weist jedoch darauf hin, dass zytotoxische und apoptotische Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen.

Die Effekte von Navitoclax auf die Seneszenz und Senolyse waren weniger konsistent. Sie reichten von einer Verstärkung der Effekte von Etoposid bis hin zu einer Reduktion spezifischer Seneszenzmarker. Die kombinierte Behandlung mit Etoposid und Navitoclax führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität und einer erhöhten Anzahl toter Zellen, wobei dieser Effekt bei den 6606PDA-Zellen besonders ausgeprägt war. Die Reduktion des Anteils SA- β -Gal⁺-Zellen sowie die Abnahme der SAHF bei den 6606PDA-Zellen deuten

auf eine senolytische Wirkung von Navitoclax hin. Ergänzend dazu zeigten beide Zelllinien im Vergleich der Kombinations- mit der alleinigen Etoposid-Behandlung reduzierte *Cdkn1a*-, *Mdm2*- und *Tgf- β 1*-Spiegel, während in den 6606PDA-Zellen zusätzlich die *Cdk5*- und *p53*-Spiegel abnahmen. Bemerkenswert ist, dass Navitoclax in der Monotherapie tendenziell die Zellproliferation erhöhte, während ein wachstumshemmender Effekt nur unter der kombinierten Behandlung mit Etoposid sichtbar wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Navitoclax seine volle senolytische Wirkung erst nach erfolgreicher Induktion von Seneszenz entfalten kann. Insgesamt unterstützen die Befunde die eingangs formulierter Arbeitshypothese, dass Navitoclax selektiv seneszente Zellen durch Reaktivierung apoptotischer Signalwege eliminieren kann. Dies steht im Einklang mit der bekannten Wirkweise des Bcl-2-Inhibitors. Gleichzeitig zeigen die Befunde jedoch Zelllinien-spezifische Unterschiede, da der senolytische Effekt in den 6606PDA-Zellen stärker ausgeprägt war. Somit wird die dritte These aus dem Abschnitt „Zielstellung Dieser Arbeit“ zur Reproduzierbarkeit der Effekte in beiden Zelllinien nur teilweise bestätigt. Die Ergebnisse verdeutlichen die heterogene, dynamische Natur der Seneszenz und des SASP, wie sie auch in der aktuellen Studie von Dong et al. beschrieben wird (Dong et al., 2024). Unter diesem Aspekt muss die vierte These kritisch betrachtet werden: Zwar bieten die ausgewählten Seneszenzmarker in dieser Arbeit eine valide Grundlage zur Bewertung der Seneszenz, jedoch bleibt fraglich, ob sie aufgrund der heterogenen Ausprägung der Seneszenz universelle Aussagen zulassen. Dennoch liefert diese Arbeit wichtige Hinweise zur weiteren Erforschung dieses Themas, besonders im Blick auf die untersuchten Pankreaskarzinomzellen.

Ob Navitoclax das optimale Senolytikum darstellt, bleibt offen. Während es in der vorliegenden Arbeit wichtige Hinweise auf senolytische Aktivitäten lieferte, ist anzumerken, dass Navitoclax in alleiniger Anwendung die Zellproliferation der Panc02-Zellen erhöhte, was ein potenzielles Risiko für die Tumorprogression darstellen könnte. Die aktuelle Weiterentwicklung neuer Senolytika eröffnet jedoch vielversprechende Perspektiven. Innovative Ansätze nutzen spezifische Eigenschaften seneszenten Zellen, etwa für die Entwicklung SA- β -Galaktosidase-aktivierter Prodrugs oder Nanopartikel (Chaib et al., 2022). Ergänzend dazu könnten OMICs-Technologien wie Genomik, Proteomik und Metabolomik, tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen seneszenten Zellen liefern und so die Entwicklung gezielter Senolytika vorantreiben (Song et al. 2022). Darüber hinaus könnte der Beitrag KI-gestützter Substanzscreenings zur Identifizierung selektiver Senolytika erheblich sein (Lelarge et al., 2024).

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die potenzielle Funktionalität der Kombination von Seneszenztriggern und Senolytika. Diese Kombination stellt insgesamt eine theoretisch vielversprechende, zukunftsweisende therapeutische Strategie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms dar, die durch Fortschritte in der medizinischen Forschung definitiv optimiert werden könnte und müsste.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Pankreaskarzinom (PDAC) zählt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 11 % zu den tödlichsten onkologischen Erkrankungen. Die Hauptursachen dafür liegen in der späten Diagnostik, den begrenzten therapeutischen Optionen und einem unzureichenden Verständnis der biologischen Mechanismen.

Ein vielversprechender Therapieansatz, der bereits erfolgreich an anderen Tumorzellen getestet wurde, kombiniert die gezielte Induktion zellulärer Seneszenz mit der anschließenden Elimination seneszenten Zellen durch Senolytika. Seneszenz ist ein zellulärer Zustand, der durch irreversiblen Zellzyklusarrest sowie charakteristische Veränderungen des Sekretoms, den sogenannten *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP) charakterisiert ist.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen Therapieansatz an PDAC-Zellen zu untersuchen. Im Fokus standen dabei die Fähigkeit von Etoposid, einem Topoisomerase-II-Inhibitor, Seneszenz in zwei murinen Pankreaskarzinomzelllinien (Panc02 und 6606PDA) zu induzieren, sowie die Wirksamkeit des Bcl-2-Inhibitors Navitoclax, diese seneszenten Zellen selektiv zu eliminieren (Senolyse).

Die Panc02- und 6606PDA-Zellen erhielten Einzel- oder Kombinationsbehandlungen mit Etoposid und Navitoclax. Zur Analyse der Effekte dienten Parameter, die Seneszenzmarker repräsentieren oder von seneszenten Zellen modulierte Prozesse abbilden. Die Zellviabilität wurde mittels Trypan-Blau-Färbung und die Proliferation mittels Bromdesoxyuridin-Einbautest untersucht. Seneszente Zellen ließen sich durch Seneszenzassoziierte- β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Färbung und Analyse von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) identifizieren. Die Genexpression von *Cdkn1a*, *Cdk5*, *Cxcl2*, *Il6*, *Mdm2*, *Trp53* und *Serpine1* wurde auf mRNA-Ebene analysiert. Ergänzend wurden mittels Immunoblotting Proteine wie LC3B und γ H2AX analysiert, um DNA-Schäden und autophagische Prozesse zu erfassen. Die Kombination dieser Methoden erlaubte Rückschlüsse auf die Seneszenzinduktion und die senolytischen Effekte.

Die Behandlung mit Etoposid reduzierte in beiden Zelllinien die Zellzahl, erhöhte den Anteil toter Zellen und senkte die Proliferationsrate. Panc02-Zellen waren fast vollständig SA- β -Gal-positiv, während 6606PDA-Zellen schwächer, aber signifikant positiv reagierten. Die Anzahl von SAHF stieg in 6606PDA-Zellen. Darüber hinaus erhöhten sich die *Cdkn1a*- und γ H2AX-Spiegel numerisch sowie die *Mdm2*- und LC3B-Spiegel signifikant in beiden Zelllinien. Die Panc02-Zellen zeigten erhöhte *Cdk5*-, *Serpine1*- und *Tgf- β 1*-Spiegel, während in 6606PDA-Zellen die *Trp53*- und *Tgf- β 1*-Spiegel signifikant reduziert waren. Die *Cxcl2*- und *Il6*-Spiegel blieben unverändert.

Die Monotherapie mit Navitoclax zeigte begrenzte Effekte. Die Zellzahl blieb weitgehend unverändert, die Proliferationsrate nahm in den Panc02-Zellen leicht zu. SA- β -Gal-, SAHF-Färbungen sowie die *Cdkn1a*-, *Cxcl2*-, *Trp53*-, *Serpine1*-, *Il6*-, LC3B- und γ H2AX-Spiegel wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Navitoclax reduzierte die *Mdm2*-Spiegel signifikant in Panc02-Zellen sowie die *Cdk5*- und *Tgf- β 1*-Spiegel in 6606PDA-Zellen.

Die Kombinationstherapie mit Etoposid und Navitoclax verstärkte den Verlust der Zellviabilität und erhöhte die Anzahl toter Zellen im Vergleich zur Etoposid-Monotherapie. Während die Proliferationsrate in den 6606PDA-Zellen stabil blieb, nahm sie in den Panc02-Zellen numerisch ab. In den 6606PDA-Zellen reduzierte sich der Anteil SA- β -Gal⁺-Zellen numerisch, die Zahl der SAHF signifikant. Durch Hinzunahme von Navitoclax sanken die *Cdkn1a*- und LC3B-Spiegel numerisch und die *Tgf- β 1*-Spiegel signifikant in beiden Zelllinien, während die *Serpine1*-Spiegel signifikant anstiegen und die *Il6*-Spiegel unverändert blieben. Panc02-Zellen zeigten numerische Abnahmen der *Cxcl2*-, *Trp53*- und *Mdm2*-Spiegel, während in den 6606PDA-Zellen die *Cdk5*- und *Mdm2*-Spiegel signifikant sanken und die *Trp53*-Spiegel verglichen mit der Kontrolle signifikant reduziert waren. Die γ H2AX-Spiegel waren im Vergleich zur Kontrollgruppe in beiden Zelllinien signifikant erhöht.

Die Ergebnisse zeigen, dass Etoposid als Topoisomerase-II-Inhibitor in beiden Pankreaskarzinomzelllinien erfolgreich Seneszenz induzierte. Dies wurde durch typische Merkmale, wie Zellzyklusarrest, hohe SA- β -Gal-Positivität, vermehrte SAHF-Bildung in 6606PDA-Zellen, verstärkte Autophagie und DNA-Schäden bestätigt. Numerisch erhöhte *Cdkn1a*- und signifikant erhöhte *Mdm2*-Spiegel unterstützen diese Schlussfolgerung. Navitoclax zeigte in der Monotherapie begrenzte Effekte und führte in Panc02-Zellen teilweise zu einer erhöhten Proliferation. In der Kombination mit Etoposid wirkte Navitoclax teilweise senolytisch, reduzierte die Zellviabilität signifikant und erhöhte den Anteil toter Zellen. In den 6606PDA-Zellen nahm der Anteil SA- β -Gal⁺-Zellen sowie die Anzahl der SAHF ab. Beide Zelllinien wiesen reduzierte *Cdkn1a*-, *Mdm2*- und *Tgf- β 1*-Spiegel auf, während in den 6606PDA-Zellen zusätzlich eine Reduktion der *Cdk5*- und *Trp53*-Spiegel beobachtet wurde.

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Ausprägung und Dynamik des seneszenten Phänotyps, insbesondere des SASP, und in der Reaktion auf Senolytika. Sie eröffnen spannende Perspektiven für die Onkologie, betonen jedoch zugleich die Notwendigkeit, Senolytika weiter zu erforschen, um ihr Potenzial vollständig zu verstehen und zu nutzen.

VII. THESEN

1. Das Pankreaskarzinom bleibt auch 2025 eine Erkrankung mit schlechter Prognose und einem Mangel an effektiven, zielgerichteten Therapiemöglichkeiten.
2. Etoposid induziert eine zelluläre Seneszenz in Pankreaskarzinomzellen.
3. Die Panc02- und 6606PDA-Zellen zeigen spezifische und voneinander abweichende Seneszenzausprägungen.
4. Die Behandlung mit Etoposid führt zu einem Proliferationsstopp und einer Zellzahlreduktion der Pankreaskarzinomzellen, was auf apoptotische und zytotoxische Mechanismen hinweist.
5. Die SA- β -Gal-Positivität gilt als Biomarker seneszenten Zellen, die Ausprägung variiert jedoch zwischen Panc02- und 6606PDA-Zellen.
6. SAHF stellen kein universelles Merkmal seneszenten Zellen dar.
7. Die Behandlung mit Navitoclax zeigt Hinweise auf senolytische Aktivitäten in Panc02- und 6606PDA-Zellen.
8. Navitoclax ist nicht in der Lage, seneszente Panc02- und 6606PDA-Zellen vollständig gezielt zu eliminieren.
9. Die senolytische Wirksamkeit von Navitoclax ist in den 6606PDA-Zellen stärker ausgeprägt als in den Panc02-Zellen.
10. Der SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) ist ein komplexer, heterogener Phänotyp seneszenten Zellen, der sich in Panc02- und 6606PDA-Zellen unterschiedlich ausprägt.
11. Navitoclax wirkt senolytisch durch die Reaktivierung apoptotischer Signalwege.
12. Die untersuchten Seneszenz-assoziierten Gene und Proteine eignen sich nur in Kombination als Marker seneszenten Zellen, da ihre Aussagekraft einzeln nicht ausreicht.
13. Es besteht dringender Bedarf an spezifischen und universell anwendbaren Seneszenzmarkern, falls diese existieren.
14. Der kombinierte Einsatz von Seneszenztriggern und Senolytika zur Therapie des Pankreaskarzinoms sollte in weiterführenden Arbeiten vertieft werden.
15. Der Einsatz von Senolytika zu kosmetischen oder alterspräventiven Zwecken sollte mit Vorsicht betrachtet werden, da potentielle Nebenwirkungen und Langzeitrisiken noch nicht ausreichend untersucht sind.

VIII. LITERATUR

- 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, 978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., Schmid, R.M., 2007. Mechanisms of Disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas—a potential role for pancreatic stellate cells? *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 454–462. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0881>
- Andersen, D.K., Korc, M., Petersen, G.M., Eibl, G., Li, D., Rickels, M.R., Chari, S.T., Abbruzzese, J.L., 2017. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes* 66, 1103–1110. <https://doi.org/10.2337/db16-1477>
- Ansari, D., Friess, H., Bauden, M., Samnegård, J., Andersson, R., 2018. Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment. *Oncotarget* 9, 6644–6651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24019>
- Ashraf, H.M., Fernandez, B., Spencer, S.L., 2023. The intensities of canonical senescence biomarkers integrate the duration of cell-cycle withdrawal. *Nat. Commun.* 14, 4527. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40132-0>
- Bailly, C., 2023. Etoposide: A rider on the cytokine storm. *Cytokine* 168, 156234. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156234>
- Baisantry, A., Bhayana, S., Rong, S., Ermeling, E., Wrede, C., Hegermann, J., Pennekamp, P., Sörensen-Zender, I., Haller, H., Melk, A., Schmitt, R., 2016. Autophagy Induces Prosenescent Changes in Proximal Tubular S3 Segments. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27, 1609–1616. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111059>
- Bang, M., Kim, D.G., Gonzales, E.L., Kwon, K.J., Shin, C.Y., 2019. Etoposide Induces Mitochondrial Dysfunction and Cellular Senescence in Primary Cultured Rat Astrocytes. *Biomol. Ther.* 27, 530–539. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.151>
- Basei, F.L., Moura, L.A.D.R., Ferreira, V. da C., Nascimento, A.F.Z., Kobarg, J., 2024. Proximity Ligand Assay to Localize Proteins in DNA Damage Sites. *J. Vis. Exp. JoVE*. <https://doi.org/10.3791/67072>
- Basisty, N., Kale, A., Jeon, O.H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., Schilling, B., 2020. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* 18, e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- Basu, A., 2022. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 230, 107943. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107943>
- Beck, J., Horikawa, I., Harris, C., 2020. Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models. *Vet. Pathol.* 57, 747–757. <https://doi.org/10.1177/0300985820943841>
- Bellanger, A., Madsen-Østerbye, J., Galigniana, N.M., Collas, P., 2022. Restructuring of Lamin-A-Associated Domains in Senescence and Cancer. *Cells* 11, 1846. <https://doi.org/10.3390/cells11111846>
- Bernard, M., Yang, B., Migneault, F., Turgeon, J., Dieudé, M., Olivier, M.-A., Cardin, G.B., El-Diwany, M., Underwood, K., Rodier, F., Hébert, M.-J., 2020. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy* 16, 2004–2016. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1713640>
- Beyer, G., Habtezion, A., Werner, J., Lerch, M.M., Mayerle, J., 2020. Chronic pancreatitis. *Lancet Lond. Engl.* 396, 499–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31318-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31318-0)
- Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., Krizhanovsky, V., 2017. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* 16, 661–671. <https://doi.org/10.1111/acer.12592>

- Birch, J., Gil, J., 2020. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev.* 34, 1565–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Bourdens, M., Jeanson, Y., Taurand, M., Juin, N., Carrière, A., Clément, F., Casteilla, L., Bul-teau, A.-L., Planat-Bénard, V., 2019. Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* 9, 8671. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45191-2>
- Bozic, M., Wilkinson, S., 2020. Selective Autophagy Conceals the Enemy: Why Cytotoxic T Cells Don't (MH)C Pancreatic Cancer. *Mol. Cell* 79, 6–8. <https://doi.org/10.1016/j.mol-cel.2020.06.009>
- Buscail, L., Bournet, B., Cordelier, P., 2020. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 153–168. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0245-4>
- Bussian, T.J., Aziz, A., Meyer, C.F., Swenson, B.L., Van Deursen, J.M., Baker, D.J., 2018. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>
- Cai, J., Chen, H., Lu, M., Zhang, Y., Lu, B., You, L., Zhang, T., Dai, M., Zhao, Y., 2021. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Lett.* 520, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.027>
- Campisi, J., 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>
- Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Carnero, A., 2013. Markers of cellular senescence. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 965, 63–81. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_4
- Carpenter, V.J., Saleh, T., Gewirtz, D.A., 2021. Senolytics for Cancer Therapy: Is All that Glitters Really Gold? *Cancers* 13, 723. <https://doi.org/10.3390/cancers13040723>
- Cassidy, L.D., Narita, M., 2022. Autophagy at the intersection of aging, senescence, and cancer. *Mol. Oncol.* 16, 3259–3275. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13269>
- Chaib, S., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., 2022. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat. Med.* 28, 1556–1568. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01923-y>
- Chambers, C.R., Ritchie, S., Pereira, B.A., Timpson, P., 2021. Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Mol. Oncol.* 15, 3242–3255. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13042>
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., Zhou, D., 2016. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* 22, 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
- Chen, M.S., Lee, R.T., Garbern, J.C., 2022. Senescence mechanisms and targets in the heart. *Cardiovasc. Res.* 118, 1173–1187. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab161>
- Chin, C., Ravichandran, R., Sanborn, K., Fleming, T., Wheatcroft, S.B., Kearney, M.T., Tokman, S., Walia, R., Smith, M.A., Flint, D.J., Mohanakumar, T., Bremner, R.M., Sureshbabu, A., 2023. Loss of IGFBP2 mediates alveolar type 2 cell senescence and promotes lung fibrosis. *Cell Rep. Med.* 4, 100945. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100945>
- Chu, P., Wang, S., Zhu, X., Yang, Ying, Li, H., Tesfaldet, T., Shopit, A., Yang, Yongliang, Ma, X., Peng, J., Tang, Z., Sun, Z., 2020. Selaginellin B induces apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells via the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* 12, 7127–7143.
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A.C., Raoul, J.-L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J.J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., Kavan, P., Texereau, P., Bouhier-Leporrier, K., Khemissa-Akouz, F., Legoux, J.-L., Juzyna, B., Gourgou, S.,

- O'Callaghan, C.J., Jouffroy-Zeller, C., Rat, P., Malka, D., Castan, F., Bachet, J.-B., Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group, 2018. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 379, 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Corbett, T.H., Roberts, B.J., Leopold, W.R., Peckham, J.C., Wilkoff, L.J., Griswold, D.P., Schabel, F.M., 1984. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* 44, 717–726.
- Crouch, J., Shvedova, M., Thanapaul, R.J.R.S., Botchkarev, V., Roh, D., 2022. Epigenetic Regulation of Cellular Senescence. *Cells* 11, 672. <https://doi.org/10.3390/cells11040672>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., Hoeijmakers, J.H.J., de Bruin, A., Hara, E., Campisi, J., 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* 31, 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V., AWMF, 2024. S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Version 3.1 [WWW Document]. URL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/pankreaskarzinom> (accessed 10.29.24).
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., d'Adda di Fagagna, F., 2021. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., Grützmann, R., 2014. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Res. Int.* 2014, 474905. <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Dong, M., Yang, L., Qu, M., Hu, X., Duan, H., Zhang, X., Shi, W., Zhou, Q., 2018. Autocrine IL-1 β mediates the promotion of corneal neovascularization by senescent fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 315, C734–C743. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00205.2017>
- Dong, Z., Luo, Y., Yuan, Z., Tian, Y., Jin, T., Xu, F., 2024. Cellular senescence and SASP in tumor progression and therapeutic opportunities. *Mol. Cancer* 23, 181. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02096-7>
- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B.C., Drake, A.M., Shah, P.P., Catanzaro, J.M., Ricketts, M.D., Lamark, T., Adam, S.A., Marmorstein, R., Zong, W.-X., Johansen, T., Goldman, R.D., Adams, P.D., Berger, S.L., 2015. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>
- Eggers, J.P., Grandgenett, P.M., Collisson, E.C., Lewallen, M.E., Tremayne, J., Singh, P.K., Swanson, B.J., Andersen, J.M., Caffrey, T.C., High, R.R., Ouellette, M., Hollingsworth, M.A., 2011. Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Amplified and Overexpressed in Pancreatic Cancer and Activated by Mutant K-Ras. *Clin. Cancer Res.* 17, 6140–6150. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2288>
- Faget, D.V., Ren, Q., Stewart, S.A., 2019. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 19, 439–453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>
- Fragkos, M., Jurvansuu, J., Beard, P., 2009. H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2828–2840. <https://doi.org/10.1128/MCB.01830-08>
- Gandhi, S., De La Fuente, J., Murad, M.H., Majumder, S., 2022. Chronic Pancreatitis Is a Risk Factor for Pancreatic Cancer, and Incidence Increases With Duration of Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 13, e00463. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000463>
-

- Ge, L., Pan, B., Song, F., Ma, J., Zeraatkar, D., Zhou, J., Tian, J., 2017. Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy. *BMJ Open* 7, e018175. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018175>
- Ge, M., Hu, L., Ao, H., Zi, M., Kong, Q., He, Y., 2021. Senolytic targets and new strategies for clearing senescent cells. *Mech. Ageing Dev.* 195, 111468. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111468>
- Ghaneh, P., Palmer, D., Cicconi, S., Jackson, R., Halloran, C.M., Rawcliffe, C., Sripadam, R., Mukherjee, S., Soonawalla, Z., Wadsley, J., Al-Mukhtar, A., Dickson, E., Graham, J., Jiao, L., Wasan, H.S., Tait, I.S., Prachalias, A., Ross, P., Valle, J.W., O'Reilly, D.A., Al-Sarireh, B., Gwynne, S., Ahmed, I., Connolly, K., Yim, K.-L., Cunningham, D., Armstrong, T., Archer, C., Roberts, K., Ma, Y.T., Springfield, C., Tjaden, C., Hackert, T., Büchler, M.W., Neoptolemos, J.P., European Study Group for Pancreatic Cancer, 2023. Immediate surgery compared with short-course neoadjuvant gemcitabine plus capecitabine, FOLFIRINOX, or chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer (ESPAC5): a four-arm, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 8, 157–168. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00348-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00348-X)
- Gong, J., Muñoz, A.R., Chan, D., Ghosh, R., Kumar, A.P., 2014. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth. *Oncotarget* 5, 2529–2541. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1810>
- Gonzalez-Meljem, J.M., Apps, J.R., Fraser, H.C., Martinez-Barbera, J.P., 2018. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumourigenesis. *Br. J. Cancer* 118, 1283–1288. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0066-1>
- Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A.B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J.F., Robbins, P.D., Schmitt, C.A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., Demaria, M., 2019. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179, 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Govender, S., Kruger, M.J., van de Vyver, M., 2024. Counteracting diabetes-induced adipose tissue derived-stromal cell senescence. *Biochimie* 220, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.12.001>
- Haeberle, L., Esposito, I., 2019. Pathology of pancreatic cancer. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 50. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.06.02>
- Halbrook, C.J., Lyssiotis, C.A., Pasca di Magliano, M., Maitra, A., 2023. Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell* 186, 1729–1754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>
- He, S., Sharpless, N.E., 2017. Senescence in Health and Disease. *Cell* 169, 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- He, Y., Li, W., Lv, D., Zhang, Xin, Zhang, Xuan, Ortiz, Y.T., Budamagunta, V., Campisi, J., Zheng, G., Zhou, D., 2020. Inhibition of USP7 activity selectively eliminates senescent cells in part via restoration of p53 activity. *Aging Cell* 19, e13117. <https://doi.org/10.1111/accel.13117>
- Hernandez-Segura, A., De Jong, T.V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., Demaria, M., 2017. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr. Biol.* 27, 2652–2660.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., Demaria, M., 2018. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 28, 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Hessmann, E., Buchholz, S.M., Demir, I.E., Singh, S.K., Gress, T.M., Ellenrieder, V., Neesse, A., 2020. Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol. Rev.* 100, 1707–1751. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2019>
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson,

- D.A., 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00309-x)
- Ho, W.J., Jaffee, E.M., Zheng, L., 2020. The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0363-5>
- Hosein, A.N., Brekken, R.A., Maitra, A., 2020. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 487–505. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0300-1>
- Hu, J.-X., Zhao, C.-F., Chen, W.-B., Liu, Q.-C., Li, Q.-W., Lin, Y.-Y., Gao, F., 2021. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J. Gastroenterol.* 27, 4298–4321. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i27.4298>
- Hu, Z.I., O'Reilly, E.M., 2024. Therapeutic developments in pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00840-w>
- Huang, W., Hickson, L.J., Eirin, A., Kirkland, J.L., Lerman, L.O., 2022. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat. Rev. Nephrol.* 18, 611–627. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>
- Huang, Y., Wang, S., Hu, D., Zhang, L., Shi, S., 2024. ALKBH5 regulates etoposide-induced cellular senescence and osteogenic differentiation in osteoporosis through mediating the m6A modification of VDAC3. *Sci. Rep.* 14, 23461. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75033-9>
- Hwang, H.J., Lee, Y.-R., Kang, D., Lee, H.C., Seo, H.R., Ryu, J.-K., Kim, Y.-N., Ko, Y.-G., Park, H.J., Lee, J.-S., 2020. Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells. *Cancer Lett.* 490, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.019>
- Isaji, S., Mizuno, S., Windsor, J.A., Bassi, C., Fernández-Del Castillo, C., Hackert, T., Hayasaki, A., Katz, M.H.G., Kim, S.-W., Kishiwada, M., Kitagawa, H., Michalski, C.W., Wolfgang, C.L., 2018. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* 18, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.11.011>
- Islam, M.T., Taday, E., Allen, S., Kim, J., Trott, D.W., Holland, W.L., Donato, A.J., Lesniewski, L.A., 2023. Senolytic drugs, dasatinib and quercetin, attenuate adipose tissue inflammation, and ameliorate metabolic function in old age. *Aging Cell* 22, e13767. <https://doi.org/10.1111/accel.13767>
- Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G.P., 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 371, 21–31. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_3
- Joseph, A.M., Al Aiyani, A., Al-Ramadi, B., Singh, S.K., Kishore, U., 2024. Innate and adaptive immune-directed tumour microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Front. Immunol.* 15, 1323198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1323198>
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W., 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 25, 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Karamitopoulou, E., 2019. Tumour microenvironment of pancreatic cancer: immune landscape is dictated by molecular and histopathological features. *Br. J. Cancer* 121, 5–14. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0479-5>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., Neoptolemos, J.P., 2016. Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Klein, A.P., 2021. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., Bartek, J., 2011. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a

- cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16^{ink4a}. *Cell Cycle* 10, 457–468. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707>
- Kowald, A., Passos, J.F., Kirkwood, T.B.L., 2020. On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell* 19, e13270. <https://doi.org/10.1111/ace1.13270>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., Peeper, D.S., 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kuilman, T., Peeper, D.S., 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* 9, 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>
- Kumar, P., Hassan, M., Tacke, F., Engelmann, C., 2024. Delineating the heterogeneity of senescence-induced functional alterations in hepatocytes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 81, 200. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05230-2>
- Kumari, R., Jat, P., 2021. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kuno, A., Hosoda, R., Tsukamoto, M., Sato, T., Sakuragi, H., Ajima, N., Saga, Y., Tada, K., Taniguchi, Y., Iwahara, N., Horio, Y., 2023. SIRT1 in the cardiomyocyte counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating histone H2AX. *Cardiovasc. Res.* 118, 3360–3373. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac026>
- Kwon, Y., Kim, J.W., Jeoung, J.A., Kim, M.-S., Kang, C., 2017. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Mol. Cells* 40, 607–612. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0151>
- Lammert, F., 2019. Weissbuch Gastroenterologie 2020/2021 Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Bauchspeicheldrüse – Gegenwart und Zukunft. De Gruyter, Berlin/Boston.
- Lee, M., Lee, J.-S., 2014. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep.* 47, 51–59. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.2.005>
- Lelarge, V., Capelle, R., Oger, F., Mathieu, T., Le Calvé, B., 2024. Senolytics: from pharmacological inhibitors to immunotherapies, a promising future for patients' treatment. *Npj Aging* 10, 12. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00138-4>
- Lérida-Viso, A., Estepa-Fernández, A., Morellá-Aucejo, Á., Lozano-Torres, B., Alfonso, M., Blandez, J.F., Bisbal, V., Sepúlveda, P., García-Fernández, A., Orzáez, M., Martínez-Máñez, R., 2022. Pharmacological senolysis reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity and improves cardiac function in mice. *Pharmacol. Res.* 183, 106356. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106356>
- Leung, P.S., 2010. Overview of the Pancreas, in: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–12. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9060-7_1
- Lilly, A.C., Astsaturov, I., Golemis, E.A., 2023. Intrapancreatic fat, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 80, 206. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04855-z>
- Lin, W., Yan, Y., Huang, Q., Zheng, D., 2024. MDMX in Cancer: A Partner of p53 and a p53-Independent Effector. *Biol. Targets Ther.* 18, 61–78. <https://doi.org/10.2147/BTT.S436629>
- Linder, S., Castaños-Velez, E., von Rosen, A., Biberfeld, P., 2001. Immunohistochemical expression of extracellular matrix proteins and adhesion molecules in pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 48, 1321–1327.
- Liu, T.-S., Chen, C., Zhou, B., Xia, B.-W., Chen, Z.-P., Yan, Y., 2019. Isobaric tags for relative and absolute quantitation-based quantitative proteomic analysis of X-linked inhibitor of apoptosis and H2AX in etoposide-induced renal cell carcinoma apoptosis. *Chin. Med. J. (Engl.)* 132, 2941–2949. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000553>
- Livingston, M.J., Shu, S., Fan, Y., Li, Z., Jiao, Q., Yin, X.-M., Venkatachalam, M.A., Dong, Z., 2023. Tubular cells produce FGF2 via autophagy after acute kidney injury leading to fibroblast activation and renal fibrosis. *Autophagy* 19, 256–277. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2072054>
-

- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., Lüttges, J., 2005. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* N. Y. N 7, 17–23. <https://doi.org/10.1593/neo.04445>
- Loison, I., Pioger, A., Paget, S., Metatla, I., OrgaRES Consortium, Mariette, C., Piessen, G., Corfiotti, F., Eveno, C., Pruvot, F.-R., Truant, S., El Amrani, M., Leteurtre, E., Renaud, F., Dufour, C., Gnemmi, V., Wicquart, L., Escande, F., Leclerc, J., Van Seuning, I., Vincent, A., Abbadie, C., Dehennaut, V., 2024. O-GlcNAcylation inhibition redirects the response of colon cancer cells to chemotherapy from senescence to apoptosis. *Cell Death Dis.* 15, 762. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07131-5>
- Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M.-C., Ruiz, A.F., Kalegari, P., Ferbeyre, G., 2019. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* 117, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>
- López-Domínguez, J.A., Rodríguez-López, S., Ahumada-Castro, U., Desprez, P.-Y., Konovalenko, M., Laberge, R.-M., Cárdenas, C., Villalba, J.M., Campisi, J., 2021. Cdkn1a transcript variant 2 is a marker of aging and cellular senescence. *Aging* 13, 13380–13392. <https://doi.org/10.18632/aging.203110>
- Louault, K., Li, R.-R., DeClerck, Y.A., 2020. Cancer-Associated Fibroblasts: Understanding Their Heterogeneity. *Cancers* 12, 3108. <https://doi.org/10.3390/cancers12113108>
- Mao, D., Hinds, P.W., 2010. p35 Is Required for CDK5 Activation in Cellular Senescence. *J. Biol. Chem.* 285, 14671–14680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066118>
- Martini, H., Passos, J.F., 2023. Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *FEBS J.* 290, 1186–1202. <https://doi.org/10.1111/febs.16361>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R.C., Jones, C., Coleman, H.G., McCain, R.S., 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J. Gastroenterol.* 24, 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Mohamad Anuar, N.N., Nor Hisam, N.S., Liew, S.L., Ugusman, A., 2020. Clinical Review: Navitoclax as a Pro-Apoptotic and Anti-Fibrotic Agent. *Front. Pharmacol.* 11, 564108. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.564108>
- Mohamad Kamal, N.S., Safuan, S., Shamsuddin, S., Foroozandeh, P., 2020. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur. J. Cell Biol.* 99, 151108. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>
- Mohammed, S., Van Buren, G., Fisher, W.E., 2014. Pancreatic cancer: advances in treatment. *World J. Gastroenterol.* 20, 9354–9360. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>
- Moncsek, A., Al-Suriah, M.S., Trussoni, C.E., O'Hara, S.P., Splinter, P.L., Zuber, C., Patsenker, E., Valli, P.V., Fingas, C.D., Weber, A., Zhu, Y., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., Gores, G.J., Müllhaupt, B., LaRusso, N.F., Mertens, J.C., 2018. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with B-cell lymphoma-extra large inhibitors ameliorates fibrosis in multidrug resistance 2 gene knockout (Mdr2^{-/-}) mice. *Hepatol. Baltim. Md* 67, 247–259. <https://doi.org/10.1002/hep.29464>
- Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., Kikkawa, U., Kamada, S., 2016. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci. Rep.* 6, 31758. <https://doi.org/10.1038/srep31758>
- Narita, Masashi, Núñez, S., Heard, E., Narita, Masako, 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, 703–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x)
- Nikhil, K., Shah, K., 2023. CDK5: an oncogene or an anti-oncogene: location location location. *Mol. Cancer* 22, 186. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01895-8>
- Ogrodnik, M., 2021. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell* 20, e13338. <https://doi.org/10.1111/ace1.13338>
- Okusaka, T., 2022. Treatment for postoperative recurrence of pancreatic cancer: a narrative review. *Chin. Clin. Oncol.* 11, 19. <https://doi.org/10.21037/cco-21-87>
-

- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., Vernot, J.-P., 2017. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal.* 15, 17. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0172-3>
- Paluvai, H., Di Giorgio, E., Brancolini, C., 2020. The Histone Code of Senescence. *Cells* 9, 466. <https://doi.org/10.3390/cells9020466>
- Pan, J., Li, D., Xu, Y., Zhang, J., Wang, Yueying, Chen, M., Lin, S., Huang, L., Chung, E.J., Citrin, D.E., Wang, Yingying, Hauer-Jensen, M., Zhou, D., Meng, A., 2017. Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 99, 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.02.216>
- Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S. (Eds.), 2023. *Physiologie*, 10., vollständig überarbeitete Auflage. ed. Thieme, Stuttgart.
- Park, W., Chawla, A., O'Reilly, E.M., 2021. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA* 326, 851–862. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>
- Park, W., Chen, J., Chou, J.F., Varghese, A.M., Yu, K.H., Wong, W., Capanu, M., Balachandran, V., McIntyre, C.A., El Dika, I., Khalil, D.N., Harding, J.J., Ghalehsari, N., McKinnell, Z., Chalasani, S.B., Makarov, V., Selenica, P., Pei, X., Lecomte, N., Kelsen, D.P., Abou-Alfa, G.K., Robson, M.E., Zhang, L., Berger, M.F., Schultz, N., Chan, T.A., Powell, S.N., Reis-Filho, J.S., Iacobuzio-Donahue, C.A., Riaz, N., O'Reilly, E.M., 2020. Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 26, 3239–3247. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0418>
- Partecke, L.I., Sandler, M., Kaeding, A., Weiss, F.U., Mayerle, J., Dummer, A., Nguyen, T.D., Albers, N., Speerforck, S., Lerch, M.M., Heidecke, C.D., von Bernstorff, W., Stier, A., 2011. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* 47, 98–107. <https://doi.org/10.1159/000329413>
- Philip, P.A., Azar, I., Xiu, J., Hall, M.J., Hendifar, A.E., Lou, E., Hwang, J.J., Gong, J., Feldman, R., Ellis, M., Stafford, P., Spetzler, D., Khushman, M.M., Sohal, D., Lockhart, A.C., Weinberg, B.A., El-Deiry, W.S., Marshall, J., Shields, A.F., Korn, W.M., 2022. Molecular Characterization of KRAS Wild-type Tumors in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 28, 2704–2714. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3581>
- Pommier, Y., Nussenzweig, A., Takeda, S., Austin, C., 2022. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 407–427. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00452-3>
- Qin, C., Yang, G., Yang, J., Ren, B., Wang, H., Chen, G., Zhao, F., You, L., Wang, W., Zhao, Y., 2020. Metabolism of pancreatic cancer: paving the way to better anticancer strategies. *Mol. Cancer* 19, 50. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01169-7>
- Qiu, Y., Bai, L., Zhao, H., Mei, X., 2024. Homoharringtonine enhances cytarabine-induced apoptosis in acute myeloid leukaemia by regulating the p38 MAPK/H2AX/Mcl-1 axis. *BMC Cancer* 24, 520. <https://doi.org/10.1186/s12885-024-12286-7>
- Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., 2009. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 699–708. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.177>
- Ren, B., Cui, M., Yang, G., Wang, H., Feng, M., You, L., Zhao, Y., 2018. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 17, 108. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0858-1>
- Reyhanoglu, G., Tadi, P., 2024. Etoposide, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Robert Koch-Institut, Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, 2023. *Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom) C25* [WWW Document]. URL

- https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c25_bauchspeicheldruese.pdf?__blob=publicationFile (accessed 10.15.24).
- Rocha, A., Dalgarno, A., Neretti, N., 2022. The functional impact of nuclear reorganization in cellular senescence. *Brief. Funct. Genomics* 21, 24–34. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elab012>
- Rovira, M., Sereda, R., Pladevall-Morera, D., Ramponi, V., Marin, I., Maus, M., Madrigal-Matute, J., Díaz, A., García, F., Muñoz, J., Cuervo, A.M., Serrano, M., 2022. The lysosomal proteome of senescent cells contributes to the senescence secretome. *Aging Cell* 21, e13707. <https://doi.org/10.1111/acer.13707>
- Roy, A., Sahoo, J., Kamalanathan, S., Naik, D., Mohan, P., Kalayarasan, R., 2021. Diabetes and pancreatic cancer: Exploring the two-way traffic. *World J. Gastroenterol.* 27, 4939–4962. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i30.4939>
- Schaaf, M.B.E., Keulers, T.G., Vooijs, M.A., Rouschop, K.M.A., 2016. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30, 3961–3978. <https://doi.org/10.1096/fj.201600698R>
- Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D.L., Brooks, R.W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y.S., Tchkonja, T., Robbins, P.D., Aubry, M.C., Passos, J.F., Kirkland, J.L., Tschumperlin, D.J., Kita, H., LeBrasseur, N.K., 2017. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* 8, 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>
- Severino, V., Alessio, N., Farina, A., Sandomenico, A., Cipollaro, M., Peluso, G., Galderisi, U., Chambery, A., 2013. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 4, e911. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.445>
- Shi, D., Gu, W., 2012. Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes Cancer* 3, 240–248. <https://doi.org/10.1177/1947601912455199>
- Shupp, A., Casimiro, M.C., Pestell, R.G., 2017. Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. *Oncotarget* 8, 17373–17382. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14538>
- Shvedova, M., Thanapaul, R.J.R.S., Ha, J., Dhillon, J., Shin, G.H., Crouch, J., Gower, A.C., Gritli, S., Roh, D.S., 2024. Topical ABT-263 treatment reduces aged skin senescence and improves subsequent wound healing. *Aging* 16. <https://doi.org/10.18632/aging.206165>
- Sohal, D.P.S., Mangu, P.B., Khorana, A.A., Shah, M.A., Philip, P.A., O'Reilly, E.M., Uronis, H.E., Ramanathan, R.K., Crane, C.H., Engebretson, A., Ruggiero, J.T., Copur, M.S., Lau, M., Urba, S., Laheru, D., 2016. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 2784–2796. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.1412>
- Springfeld, C., Ferrone, C.R., Katz, M.H.G., Philip, P.A., Hong, T.S., Hackert, T., Büchler, M.W., Neoptolemos, J., 2023. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 20, 318–337. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00746-1>
- Stoffel, E.M., Brand, R.E., Goggins, M., 2023. Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention. *Gastroenterology* 164, 752–765. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.02.012>
- Strobel, O., Büchler, M.W., 2020. [Surgery of pancreatic cancer: techniques to avoid local recurrence]. *Chir. Z. Alle Geb. Oper. Medizen* 91, 615–627. <https://doi.org/10.1007/s00104-020-01196-6>
- Sugiura, T., Uesaka, K., Mihara, K., Sasaki, K., Kanemoto, H., Mizuno, T., Okamura, Y., 2013. Margin status, recurrence pattern, and prognosis after resection of pancreatic cancer. *Surgery* 154, 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.04.015>

- Sunami, Y., Häußler, J., Kleeff, J., 2020. Cellular Heterogeneity of Pancreatic Stellate Cells, Mesenchymal Stem Cells, and Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer. *Cancers* 12, 3770. <https://doi.org/10.3390/cancers12123770>
- Takasugi, M., Yoshida, Y., Ohtani, N., 2022. Cellular senescence and the tumour microenvironment. *Mol. Oncol.* 16, 3333–3351. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13268>
- Takaya, K., Ishii, T., Asou, T., Kishi, K., 2023. Navitoclax (ABT-263) Rejuvenates Human Skin by Eliminating Senescent Dermal Fibroblasts in a Mouse/Human Chimeric Model. *Rejuvenation Res.* 26, 9–20. <https://doi.org/10.1089/rej.2022.0048>
- Takikawa, T., Hamada, S., Matsumoto, R., Tanaka, Y., Kataoka, F., Sasaki, A., Masamune, A., 2022. Senescent Human Pancreatic Stellate Cells Secrete CXCR2 Agonist CXCLs to Promote Proliferation and Migration of Human Pancreatic Cancer AsPC-1 and MI-APaCa-2 Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9275. <https://doi.org/10.3390/ijms23169275>
- Talukdar, S., Das, S.K., Emdad, L., Fisher, P.B., 2021. Autophagy and senescence: Insights from normal and cancer stem cells, in: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp. 147–208. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.01.005>
- Tan, J.X., Finkel, T., 2023. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep.* 24, e57265. <https://doi.org/10.15252/embr.202357265>
- Tang, H., Dong, X., Hassan, M., Abbruzzese, J.L., Li, D., 2011. Body mass index and obesity- and diabetes-associated genotypes and risk for pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 20, 779–792. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0845>
- Tas, F., Sen, F., Odabas, H., Kilic, L., Keskin, S., Yildiz, I., 2013. Performance status of patients is the major prognostic factor at all stages of pancreatic cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 18, 839–846. <https://doi.org/10.1007/s10147-012-0474-9>
- Teng, Y.-N., Chang, H.-C., Chao, Y.-Y., Cheng, H.-L., Lien, W.-C., Wang, C.-Y., 2021. Etoposide Triggers Cellular Senescence by Inducing Multiple Centrosomes and Primary Cilia in Adrenocortical Tumor Cells. *Cells* 10, 1466. <https://doi.org/10.3390/cells10061466>
- Valieva, Y., Ivanova, E., Fayzullin, A., Kurkov, A., Igrunkova, A., 2022. Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. *Diagnostics* 12, 2309. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12102309>
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., Goggins, M., 2011. Pancreatic cancer. *Lancet Lond. Engl.* 378, 607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Vousden, K.H., Prives, C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C.A., Friess, H., Büchler, M.W., 2004. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Surg.* 91, 586–594. <https://doi.org/10.1002/bjs.4484>
- Wang, B., Han, J., Elisseeff, J.H., Demaria, M., 2024. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 25, 958–978. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>
- Wang, E.S., 2023. MDM2 and BCL-2: to p53 or not to p53? *Blood* 141, 1237–1238. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018739>
- Wang, L., Lankhorst, L., Bernards, R., 2022. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 22, 340–355. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9>
- Wang, Luning, Zhang, X., Sheng, J., Chen, L., Zhi, L., Zheng, Q., Qi, Y., Wang, Linlin, Zhang, J., Zhao, J., Wang, Y., Liu, S.-X., Sun, M.-Z., Zhang, W., 2023. RBM4 regulates cellular senescence via miR1244/SERPINE1 axis. *Cell Death Dis.* 14, 27. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05563-z>
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X.-Q., Wang, Z.-F., Wu, X.-L., Zhou, C.-H., Yan, J.-Y., Hu, B.-Y., Kong, B., Fu, D.-L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L.-X., Dong, Q.-Z., 2021. The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 249. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4>
-

- Wang, Y.-T., Gou, Y.-W., Jin, W.-W., Xiao, M., Fang, H.-Y., 2016. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer* 16, 212. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2241-1>
- Wiley, C.D., Campisi, J., 2021. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat. Metab.* 3, 1290–1301. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00483-8>
- Wolfgang, C.L., Herman, J.M., Laheru, D.A., Klein, A.P., Erdek, M.A., Fishman, E.K., Hruban, R.H., 2013. Recent progress in pancreatic cancer. *CA. Cancer J. Clin.* 63, 318–348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>
- Wood, L.D., Canto, M.I., Jaffee, E.M., Simeone, D.M., 2022. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* 163, 386–402.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
- World Health Organisation, 2024. Obesity and overweight [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 10.27.24).
- Yachida, S., Lacobuzio-Donahue, C.A., 2013. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene* 32, 5253–5260. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.29>
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A.C., Draetta, G.F., Maitra, A., DePinho, R.A., 2016. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 30, 355–385. <https://doi.org/10.1101/gad.275776.115>
- Zhai, P., Sadoshima, J., 2024. Cardiomyocyte senescence and the potential therapeutic role of senolytics in the heart. *J. Cardiovasc. Aging* 4, 18. <https://doi.org/10.20517/jca.2024.06>
- Zhang, D., Zhang, J.-W., Xu, H., Chen, X., Gao, Y., Jiang, H.-G., Wang, Y., Wu, H., Yang, L., Wang, W.-B., Dai, J., Xia, L., Peng, J., Zhou, F.-X., 2024. Therapy-induced senescent tumor cell-derived extracellular vesicles promote colorectal cancer progression through SERPINE1-mediated NF- κ B p65 nuclear translocation. *Mol. Cancer* 23, 70. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01985-1>
- Zhang, L., Pitcher, L.E., Prahalad, V., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., 2023. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J.* 290, 1362–1383. <https://doi.org/10.1111/febs.16350>
- Zhang, M., Serna-Salas, S., Damba, T., Borghesan, M., Demaria, M., Moshage, H., 2021. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech. Ageing Dev.* 199, 111572. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111572>
- Zhang, R., Chen, W., Adams, P.D., 2007. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2343–2358. <https://doi.org/10.1128/MCB.02019-06>
- Zhou, X., Hu, K., Bailey, P., Springfield, C., Roth, S., Kurilov, R., Brors, B., Gress, T., Buchholz, M., An, J., Wei, K., Peccerella, T., Büchler, M.W., Hackert, T., Neoptolemos, J.P., 2021. Clinical Impact of Molecular Subtyping of Pancreatic Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 743908. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.743908>
- Zhu, H., Blake, S., Kusuma, F.K., Pearson, R.B., Kang, J., Chan, K.T., 2020. Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mech. Ageing Dev.* 187, 111229. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111229>
- Zhu, Y., Doornebal, E.J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., 2017. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging* 9, 955–963. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., Wren, J.D., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Kirkland, J.L., 2016. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428–435. <https://doi.org/10.1111/acel.12445>

Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., O'Hara, S.P., LaRusso, N.F., Miller, J.D., Roos, C.M., Verzosa, G.C., LeBrasseur, N.K., Wren, J.D., Farr, J.N., Khosla, S., Stout, M.B., McGowan, S.J., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Gurkar, A.U., Zhao, J., Colangelo, D., Dorronsoro, A., Ling, Y.Y., Barghouthy, A.S., Navarro, D.C., Sano, T., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J., Kirkland, J.L., 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658. <https://doi.org/10.1111/ace.12344>

IX. ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β -Gal	β -Galaktosidase
γ H2AX	Gamma-H2AX, phosphorylierte Form des Histons H2AX
Abb.	Abbildung
ALK	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	Aqua destillata
ATM	Serin-Proteinkinase Ataxia Telangiectasia Mutated
BCL	B-Zell-Lymphom
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
CAF	Krebsassoziierte Fibroblasten, engl <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
CCL	Zytokin der CC-Chemokine Familie, engl. <i>CC-chemokine ligand</i>
CD4/CD8	<i>Cluster of Differentiation 4/8</i>
CDKN	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronische Pankreatitis
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CT	Computertomographie

Ct-Wert	engl. <i>cycle threshold</i> -Wert
CTLA 4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
CW	Erythrozytenantigen Cw
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA-Schadensantwort, engl. <i>DNA Damage Response</i>
DEPC	Diethylcarbonat
DMF	N-N-dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERBB	Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
Eto	Etoposid
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Chemotherapeutikumskombination aus Leucovirin, 5- Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor, engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde, Stunden
H2AX	Histon H2AX

H ₂ O	Wasser
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSP90	Hitzeschockprotein 90, engl. <i>heat-shock-proteine</i>
IGFBP	engl. <i>insulin-like growth factor-binding protein</i>
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
Kombi	Kombination
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
l	Liter
LC3B	Mikrotubuli-assoziierte Proteine Leichtkette 3B
MDB	<i>Membrane-Desalting-Buffer</i>
MDSC	Myeloide Suppressorzelle, engl. Myeloid-derived suppressor cell
MET	<i>mesenchymal epithelial transition factor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute, Minuten
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Nav	Navitoclax
nf	nukleasefrei
nm	Nanometer
NRG	Neuroregulin
NTRK	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor</i>

OD	optische Dichte
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PALP2	Partner And Localizer of <i>BRCA2</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-L1	engl. <i>Programmed cell death ligand-1</i>
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphoinosit-3-Kinase
PSZ	pankreatische Sternzellen
PVDF	Polyvenylidenfluorid
qPCR	Echtzeit-PCR
RAF	<i>rat fibrosarcoma</i>
RET	Protoonkogen
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
ROS	<i>c-ros oncogene</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Foci
SCAP	<i>Senescent Cell Anti-Apoptotic Pathways</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
sek	Sekunde, Sekunden
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SERPIN	Serin-Protease-Inhibitor
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen, engl. <i>Tumor-Associated Macrophages</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	engl. <i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tgf- β 1	<i>transforming growth factor-beta</i>
TMB	Tetramethylethylendiamin
TME	Tumormikroumgebung, engl. <i>Tumor Micro Environment</i>
TP53	<i>tumor protein 53</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polysorbat 20
u. a.	unter anderem
UV	Ultravioletter Frequenzbereich
V	Volt
VEGF	Faktor für die Angiogenese, engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
μ l	Mikroliter
μ M	Mikrometer

9.2 HERSTELLERVERZEICHNIS

TABELLE 19: HERSTELLERVERZEICHNIS

Hersteller	Firmensitz
Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Agilent Technologies, Inc	Santa Clara, Kalifornien, USA
Analytik Jena GmbH & Co. KG	Jena, Thüringen, Deutschland
Andreas Hettich GmbH	Tuttlingen, Baden-Württemberg, Deutschland
Anthos Labtec instruments GmbH	Salzburg, Salzburg, Österreich
Applied Biosystems	Waltham, Massachusetts, USA
Bio & Sell GmbH	Feucht, Bayern, Deutschland
Bio-Rad Laboratories Inc.	Hercules, Kalifornien, USA
Bio-Techne GmbH	Wiesbaden, Hessen, Deutschland
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Niedersachsen, Deutschland
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Baden-Württemberg, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA
Corporation for Digital Scholarship	Vienna, Virginia, USA
Dako GmbH	Jena, Thüringen, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Hamburg, Deutschland
Eurogentec	Searing, Wallonien, Belgien
Ferak	Berlin, Berlin, Deutschland
Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Niedersachsen, Deutschland
GraphPad Software Inc.	Kalifornien, USA
Greiner Bio One International GmbH	Kremsmünster, Oberösterreich, Österreich
Paul Hartmann AG	Heidenheim, Baden-Württemberg, Deutschland

Heidolph Instruments	Schwabach, Bayern, Deutschland
Hycultec GmbH	Beutelsbach, Bayern, Deutschland
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen im Breisgau, Baden-Württemberg, Deutschland
Implen Inc.	Westlake Village, Kalifornien, USA
Intas Science Imaging Instruments GmbH	Göttingen, Niedersachsen, Deutschland
J. T. Baker	Center Valley, Pennsylvania, USA
Julabo GmbH	Seelbach, Baden-Württemberg, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen, Baden-Württemberg, Deutschland
Köttermann GmbH	Uetze, Niedersachsen, Deutschland
La Roche AG	Basel, Schweiz
LI-COR Biosciences	Lincoln, Nebraska, USA
Liebherr	Bulle, Freiburg, Deutschland
MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG	Düren, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
MEDITE GmbH	Burgdorf, Niedersachsen, Deutschland
Merck KgaA	Darmstadt, Hessen, Deutschland
Mettler-Toledo Inc.	Columbus, Ohio, USA
Microsoft	Redmond, Washington, USA
New England Biolabs	Frankfurt am Main, Hessen, Deutschland
Pan-Biotech	Aidenbach, Bayern, Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Baden-Württemberg, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
RCI Lab Scan	Bangkok, Bangkok, Thailand
Robert Bosch GmbH	Gerlingen, Baden-Württemberg, Deutschland
Rockland	Limerick, Pennsylvania, USA

Sanyo Denki GmbH	Eschborn, Hessen, Deutschland
Science Suite Inc.	Toronto, Ontario, Kanada
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, Illinois, USA
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, Baden-Württemberg, Deutschland
Thermo Fischer Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Walter-CMP GmbH & Co. KG	Kiel, Schleswig-Holstein, Deutschland

9.4 VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen:

Revskij, Denis, Woitas, Aline, Kölle, Bianca, **Umstätter, Camilla**, Zechner, Dietmar, Khan, Faiz, Fuellen, Georg, Jaster, Robert. (2024). Effects of triggers of senescence and senolysis in murine pancreatic cancer cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 23. 10.1016/j.hbpd.2024.06.001.

Revskij, Denis, **Umstätter, Camilla**, Kölle, Bianca, Jaster, Robert. (2023). Etoposide and navitoclax as triggers of senescence and senolysis: in vitro and in vivo studies in murine pancreatic cancer models. *Pancreatology*. 23. e124. 10.1016/j.pan.2023.06.722.

Revskij, Denis, Runst, Jakob, **Umstätter, Camilla**, Ehlers, Luise, Rohde, Sarah, Zechner, Dietmar, Bastian, Manuela, Mueller-Hilke, Brigitte, Fuellen, Georg, Henze, Larissa, Murua Escobar, Hugo, Junghanss, Christian, Kowald, Axel, Walter, Uwe, Köhling, Rüdiger, Wolkenhauer, Olaf, Jaster, Robert. (2022). Uncoupling protein 2 deficiency of non-cancerous tissues inhibits the progression of pancreatic cancer in mice. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 22. 10.1016/j.hbpd.2022.12.003.

9.6 EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG

Ich, Camilla Veronica Umstätter, versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock,

Camilla Veronica Umstätter