



Institut für Experimentelle Gentherapie
und Tumorforschung



Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer

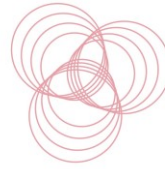
Untersuchung zum Einfluss der LMNA-Genmutation des
Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndroms auf die Seneszenz-
Induktion und Metastasierung von Krebs(stamm)zellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Philipp Morgenroth | Geb. am 13.07.1997 in Rathenow

Rostock | 2023



- 1. Gutachter:** Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer
Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung
Universitätsmedizin Rostock
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Michael Walter
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Universitätsmedizin Rostock
- 3. Gutachter:** PD Dr. med. Jonas Denecke
Pädiatrische Neurologie
Werner und Michael Otto Universitätskinderklinik Hamburg

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Pathologie und Molekularbiologie	1
1.1.3 Therapiemöglichkeiten	3
1.2 Die Allianz von Krebsstammzellen und Seneszenz.....	4
1.2.1 Krebsstammzellen	4
1.2.2 Die zelluläre Seneszenz.....	5
1.2.3 Seneszenz im Kontext der Tumorprogression	6
1.3 Das Kernmembranprotein Lamin A/C.....	7
1.3.1 Struktur und Funktion.....	7
1.3.2 Rolle von Lamin A/C in der Karzinogenese	8
1.3.3 Progerin – Eine mutierte Form des Proteins Lamin A/C.....	9
1.4 Zielstellung der Arbeit	11
2 Materialien und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Zelllinien.....	12
2.1.2 Bakterienstamm	12
2.1.3 Plasmide.....	12
2.1.4 Antikörper	13
2.1.5 Oligonukleotidsequenzen	13
2.1.6 Chemische Substanzen	14
2.1.6.1 Chemikalien.....	14
2.1.6.2 Lösungen, Puffer und Gele.....	15
2.1.7 Geräte	17
2.1.8 Kits	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellkulturen	19
2.2.1.1 Zellkultivierung	19
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	19

2.2.1.3 Zellernte	19
2.2.1.4 Fixieren der Zellen	19
2.2.2 Gentechnische Arbeitsschritte	20
2.2.2.1 Klonierung	20
2.2.2.1.1 Restriktionsverdau	20
2.2.2.1.2 DNA-Extraktion	20
2.2.2.1.3 Ligation	20
2.2.2.1.4 Transformation	20
2.2.2.1.5 Mini-Plasmidpräparation	21
2.2.2.1.6 Kontrollrestriktion	21
2.2.2.1.7 Maxi-Plasmidpräparation	21
2.2.2.2 Lentivirale Transduktion	21
2.2.2.3 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie	22
2.2.3 Protein-Arbeitstechniken	22
2.2.3.1 Proteinisolierung	22
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford	22
2.2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot	22
2.2.3.4 Immunodetektion	23
2.2.4 DNA- und RNA-Arbeitstechniken	23
2.2.4.1 RNA-Isolierung	23
2.2.4.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	23
2.2.4.3 Reverse Transkription	24
2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.4.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.5 Funktionelle Untersuchungen	25
2.2.5.1 β -Galactosidase Assay	25
2.2.5.2 Scratch Assay	25
2.2.5.4 Boyden-Chamber-Assay	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Wahl der Zelllinien	27
3.2 Charakterisierung der transduzierten Gesamtpopulation	28
3.2.1 Etablierung von Zelllinien mit stabiler Expression von Lamin A/C und Progerin	28
3.2.1.1 Klonierung der zellunspezifischen Plasmide	28
3.2.1.2 Nachweis der Transgenexpression	29
3.2.2 Untersuchung zur Induktion der zellulären Seneszenz	31
3.2.2.1 Bestimmung von Seneszenz-Markern auf Proteinebene	31

3.2.2.2	Aktivitätsmessung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase	32
3.2.2.3	Messung der Proliferationskapazität	33
3.2.2.4	Bestimmung der Seneszenz-Marker in Progerin-exprimierenden Fibroblasten	34
3.2.3	Untersuchung zum Einfluss auf die Stammzellkapazität	37
3.2.4	Untersuchung zum Einfluss auf die Metastasierungskapazität	40
3.2.4.1	Bestimmung von EMT-Markern auf Proteinebene.....	40
3.2.4.2	Messung des Migrationspotentials.....	41
3.2.4.3	Messung des Invasivitätspotentials	43
3.3	Charakterisierung der transduzierten Krebsstammzellpopulation	46
3.3.1	Etablierung von Krebsstammzellen mit stabiler Expression von Lamin A/C und Progerin... 46	46
3.3.1.1	Klonierung der krebstammzellspezifischen Plasmide	46
3.3.1.2	Zellsortierung zur Generierung homogener GFP-positiver Populationen	48
3.3.1.3	Nachweis der Transgenexpression in Krebsstammzellen	49
3.3.2	Untersuchung zur Induktion der zellulären Seneszenz in Krebsstammzellen	50
3.3.2.1	Bestimmung von Seneszenz-Markern in Krebsstammzellen auf Proteinebene	50
3.3.2.2	Aktivitätsmessung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase in Krebsstammzellen	51
3.3.2.3	Messung der Proliferationskapazität der Krebsstammzellen	51
3.3.3	Untersuchung zum Einfluss auf die Stammzellkapazität der Krebsstammzellen.....	52
3.3.4	Untersuchung zum Einfluss auf die Metastasierungskapazität der Krebsstammzellen	53
3.3.4.1	Bestimmung von EMT-Markern der Krebsstammzellen auf Proteinebene	53
3.3.4.2	Messung des Migrationspotentials der Krebsstammzellen	55
3.3.4.3	Messung des Invasivitätspotentials der Krebsstammzellen	56
4	Diskussion	57
4.1	Das Paradox der zellulären Seneszenz	58
4.2	Die Stammzellefähigkeit als entscheidender Treiber der malignen Progression.....	61
4.3	Die Epithelial-mesenchymale Transition im Harnblasenkarzinom	64
4.4	Beurteilung der verwendeten Methoden und Limitationen der Arbeit	68
5	Ausblick	70
6	Zusammenfassung	72
7	Thesen	73
8	Literaturverzeichnis	74
9	Anhang	86
10	Danksagung	93
11	Eidesstattliche Erklärung	94
12	Lebenslauf	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase (modifiziert nach Moch et. al, 2016)
.....2

Tabelle 1.2: Expression von Lamin A/C im Vergleich zum Ursprungsgewebe (modifiziert nach Irianto
et. al, 2016)9

Tabelle 2.1: Zelllinien12

Tabelle 2.2: Plasmide12

Tabelle 2.3: Antikörper13

Tabelle 2.4: Oligonukleotidsequenzen13

Tabelle 2.5: Chemikalien14

Tabelle 2.6: Lösungen, Puffer und Gele15

Tabelle 2.7: Geräte17

Tabelle 2.8: Kits18

Tabelle 2.9: Ansatz der Reversen Transkription24

Tabelle 2.10: Programm der qPCR25

Tabelle 4.1: Übersicht zum Effekt der Progerin-Expression auf die untersuchten Zelltypen67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die zwei Hypothesen der Tumorinitiierung (modifiziert nach Reya et. al, 2001)	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des seneszenzvermittelten Zellzyklusarrestes (modifiziert nach McHugh & Gil, 2018)	5
Abbildung 1.3: Die Allianz zwischen Stammzellen und Seneszenz (modifiziert nach Lecot et. al, 2016)	6
Abbildung 1.4: Netzwerk von Lamin A/C (Szklarczyk et al., 2019)	8
Abbildung 3.1: Screening der Expression von Stammzellmarkern	27
Abbildung 3.2: Restriktionsverdau der zellunspezifischen Plasmide	28
Abbildung 3.3: Analytischer Verdau der zellunspezifischen Plasmide	29
Abbildung 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der GFP-Expression	29
Abbildung 3.5: Nachweis der Expression der Transgene mittels Western Blot	30
Abbildung 3.6: Bestimmung von Markern zellulärer Seneszenz	31
Abbildung 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit	32
Abbildung 3.8: XTT-Assays zur Messung der Proliferationskapazität	33
Abbildung 3.9: Nachweis der Progerin-Expression in VH6	34
Abbildung 3.10: Expression der Seneszenz-Marker in VH6	35
Abbildung 3.11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie VH6 nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit	36
Abbildung 3.12: XTT-Assays zur Messung der Proliferationskapazität von Fibroblasten	36
Abbildung 3.13: Bestimmung der Expression von Stammzellmarkern auf RNA- und Proteinebene	38
Abbildung 3.14: Darstellung der Proteinexpression von Markern der EMT	40
Abbildung 3.15: Messung des Migrationspotentials mittels Scratch Assay	42
Abbildung 3.16: Messung des Invasivitätspotentials mittels Boyden-Chamber Assay	44
Abbildung 3.17: Analytischer Verdau des Plasmids pcDNA3.1-Sore6	46

Abbildung 3.18: Analytischer Verdau des Plasmids pLenti-Sore6	47
Abbildung 3.19: Analytischer Verdau der krebstammzellspezifischen Plasmide	47
Abbildung 3.20: Exemplarische Ergebnisse der Durchflusszytometrie	48
Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der GFP-Expression in Krebstammzellen	49
Abbildung 3.22: Nachweis der Expression der Transgene in Krebstammzellen mittels Western Blot	49
Abbildung 3.23: Bestimmung von Markern zellulärer Seneszenz in Krebstammzellen	50
Abbildung 3.24: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Krebstammzellen nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit	51
Abbildung 3.25: XTT-Assay zur Messung der Proliferationskapazität der Krebstammzellen	51
Abbildung 3.26: Bestimmung der Expression von Stammzellmarkern in Krebstammzellen auf RNA- und Proteinebene	52
Abbildung 3.27: Darstellung der Proteinexpression von Markern der EMT in Krebstammzellen	54
Abbildung 3.28: Messung des Migrationspotentials der Krebstammzellen mittels Scratch Assay	55
Abbildung 3.29: Messung des Invasivitätspotentials der Krebstammzellen mittels Boyden-Chamber Assay	56
Abbildung 9.1: Plasmidkarte und Sequenzierung des mCMVp-GFP-LMNA-Vektors	86
Abbildung 9.2: Plasmidkarte und Sequenzierung des mCMVp-GFP-Progerin Vektors	87
Abbildung 9.3: Plasmidkarte und Sequenzierung des pcDNA3.1-Sore6 Vektors	88
Abbildung 9.4: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6 Vektors	89
Abbildung 9.5: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6-GFP Vektors	90
Abbildung 9.6: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6-Lamin A/C Vektors	91
Abbildung 9.7: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6-Progerin Vektors	92

Abkürzungsverzeichnis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich, divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten explizit für alle Geschlechter. Weiterhin wurden neben den gültigen Abkürzungen des deutschsprachigen Raumes und Einheiten des SI-Systems folgende Abkürzungen verwendet:

Abk.	Abkürzung
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxyNukleosidTriPhosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Engl.	Englisch
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGFR-3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HGPS	<i>Hutchinson-Gilford progeria syndrome</i>
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MIBC	<i>Muscle-invasive bladder cancer</i>
MEM NEAA	MEM <i>non-essential amino acids</i>
MVAC-Schema	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin-Schema
NMIBC	<i>Non-muscle-invasive bladder cancer</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
Tis	In-situ-Tumor
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
TP53	Tumorprotein p53
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom stellt in Deutschland die vierzehnthäufigste Krebserkrankung der Frau und die vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes dar. Im Jahr 2016 erkrankten 4 250 Frauen und 12 220 Männer an einem Harnblasenkarzinom. Zusätzlich wurden 13 510 Patienten mit einem nicht-invasiven papillären Karzinom (Ta) oder in-situ-Tumor (Tis) der Harnblase erfasst. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms steigt mit zunehmendem Alter an: 2016 betrug das mittlere Erkrankungsalter 75 Jahre (Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), 2020).

Weltweit ist das Harnblasenkarzinom die zehnthäufigste Krebserkrankung. Im Jahr 2018 wurden rund 549 000 Neuerkrankungen und 200 000 Todesfälle registriert. Die Häufigkeit des Harnblasenkarzinoms variiert signifikant zwischen Regionen und Ländern. Süd- und Westeuropa weisen die höchste altersstandardisierte Inzidenz auf. Dagegen liegt diese in Ländern West- und Ostafrikas um ein Vielfaches geringer (Bray et al., 2018).

Eine Erklärung für die regionalen und geschlechtsspezifischen Unterschiede kann die Exposition gegenüber den Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms liefern. Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms wird das Zigarettenrauchen angesehen. 50 % aller Harnblasenkarzinome sind in den USA auf das Rauchen zurückzuführen (Freedman et al., 2011). Die Exposition gegenüber chemischen Karzinogenen, wie Arsenverbindungen und aromatischen Aminen, ist ein weiterer bedeutender Risikofaktor. Dies gilt insbesondere für Berufstätige mit regelmäßigem Kontakt zu Farben, Lacken, Gummi und Textilien (Cogliano et al., 2011). Chronische Entzündungen, verursacht durch Harnblasensteine (Yu et al., 2018) oder den Befall der Harnblase mit Schistosomen (Ferguson, 1911), können die Karzinogenese ebenfalls begünstigen. Auch im Rahmen von medizinischen Eingriffen, wie dem Bestrahlen des kleinen Beckens (Boice Jr. et al., 1985) oder der Gabe von Cyclophosphamid (Fairchild et al., 1979), kann das Risiko für ein Harnblasenkarzinom steigen.

1.1.2 Pathologie und Molekularbiologie

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert die Tumoren der Harnblase histologisch in mehrere Subtypen. Die Minderheit aller Harnblasenkarzinome sind Plattenepithel- und Adenokarzinome. Dagegen bildet die Gruppe der Urothelkarzinome histologisch die große Mehrheit der Harnblasenkarzinome. Für das Staging des Urothelkarzinoms wird die TNM-Klassifikation der WHO von 2016 verwendet (Tabelle 1.1; Moch et al., 2016).

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase (modifiziert nach Moch et. al, 2016)

TNM-Klassifikation – Urothelkarzinom der Harnblase			
T – Primärtumor	Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom	
	Tis	Carcinoma in situ	
	T1	Infiltration subepitheliales Bindegewebe	
	T2	Infiltration Muskularis propria	
	A	Oberflächlich	
	B	Tief	
MIBC	T3	Infiltration perivesikales Gewebe	
	A	Mikroskopisch	
	B	Makroskopisch	
	T4	Infiltration Nachbarorgane	
	A	Prostata, Samenbläschen, Uterus, Vagina	
	B	Abdominal- oder Beckenwand	
N – Regionäre Lymphknoten	N1	Solitäre Lymphknotenmetastasen (hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakal)	
	N2	Multiple Lymphknotenmetastasen (hypogastrisch, obturatorisch, extern iliakal, präsakal)	
	N3	Lymphknotenmetastasen (entlang der Aa. iliacae communes)	
M – Fernmetastasen	M1	Fernmetastasen	
	A	Nichtregionäre Lymphknoten	
	B	Andere Fernmetastasen	

Die Unterscheidung in nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom (NMIBC) und muskelinvasives Harnblasenkarzinom (MIBC) erhält aufgrund der Therapierelevanz eine besondere Beachtung. 75 % aller Patienten zeigen bei Erstdiagnose ein NMIBC, während 25 % der Patienten bereits ein MIBC aufweisen (Hall et al., 2007). Als muskelinvasiv werden alle Harnblasenkarzinome ab dem Stadium T2 bezeichnet. Sie weisen regelhaft einen hohen Malignitätsgrad auf. Die Gruppe der nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome setzt sich aus den urothelialen Läsionen, wie papillären Karzinomen und in-situ-Tumoren, und dem Stadium T1 zusammen (Moch et al., 2016). Die in-situ-Tumore werden gemäß der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10) nicht zu den malignen Tumoren gezählt. Dennoch besitzen sie eine hohe klinische Relevanz, weil ein hohes Risiko für Progression und vor allem für Rezidive besteht (ZfKD & GEKID, 2020).

Die histologischen Subtypen unterscheiden sich auch auf molekularbiologischer Ebene. Papilläre Karzinome erscheinen genetisch stabil und weisen einen diploiden Karyotyp auf. Vermehrt lassen sich *Gain of function* Mutationen des Protoonkogens *HRAS*, des Fibroblast Growth Factor Receptors 3 (FGFR-3) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) beobachten (Knowles & Hurst, 2015). Dagegen zeigt der instabile haploide Karyotyp der invasiven Karzinome vielfach Alterationen wie Chromotrypsis (Morrison et al., 2014). Es liegen häufig *Loss of function* Mutationen der Tumorsuppressorgene *TP53*

und *RB1* vor. Trotz dieser Unterschiede zeigen die beiden Subtypen auch Gemeinsamkeiten wie eine Deletion auf dem langen Arm des Chromosoms 9. Dies könnte erklären, warum auch nicht-invasive Läsionen in invasive Formen übergehen können (Knowles & Hurst, 2015).

1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Unbehandelt muss mit einer frühzeitigen Metastasierung und hohen Mortalität des Harnblasenkarzinoms gerechnet werden (Martini et al., 2020). Die Prognose ist bei rechtzeitiger Diagnostik und Therapie hingegen besser. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im T1-Stadium bei 88 %, im T3-Stadium noch bei 46 %. Bei Infiltration der Nachbarorgane im Stadium T4 sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf 15 % (Berdik, 2017).

Die Therapie richtet sich nach der S3-Leitlinie zum Harnblasenkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2020). Bei dem klinischen Verdacht eines Harnblasenkarzinoms soll zur histologischen Sicherung eine transurethrale Resektion der Harnblase (TUR-B) durchgeführt werden (Richterstetter et al., 2012). Wird histologisch keine Muskelinvasion nachgewiesen, sollte mit Ausnahme von pTa *low-grade* innerhalb von sechs Wochen eine Nachresektion erfolgen (Schips et al., 2002). Weiterhin kann die Therapie um eine intravesikale Chemotherapie mit Mitomycin, Immunmodulation durch Installation des *Bacillus Calmette-Guérin* und zystoskopische Verlaufskontrollen ergänzt werden (Babjuk et al., 2013).

Die Behandlung der Wahl bei dem Nachweis eines nicht-metastasierten invasiven Harnblasenkarzinoms ist die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie. Bei Männern erfolgt zusätzlich eine Prostatektomie, während bei Frauen der Uterus, die Adnexe und Anteile der vorderen Vaginalwand entfernt werden (Stein & Skinner, 2004). Zusätzlich werden drei bis vier Zyklen einer neoadjuvanten cisplatinhaltigen Kombinationschemotherapie durchgeführt. Bei organüberschreitenden Karzinomen oder einem positiven Lymphknotenstatus soll eine adjuvante cisplatinbasierte Chemotherapie erfolgen (Mahlknecht et al., 2014). Eine palliative Chemotherapie wird bei einem fernmetastasierten Tumor durchgeführt. Dazu werden Gemcitabin und Cisplatin oder das MVAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) verwendet (Sternberg et al., 1989). Als zielgerichtete Therapie sind im palliativen Setting mittlerweile auch Checkpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab zugelassen (Balar et al., 2017).

1.2 Die Allianz von Krebsstammzellen und Seneszenz

1.2.1 Krebsstammzellen

Ursprünglich wurde versucht, die Entwicklung maligner Tumoren mit der klonalen Selektionshypothese zu erklären. Das Modell nimmt an, dass alle Tumorzellen das gleiche tumorinitiierende Potential und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (Nowell, 1976). Die Mehrheit der Krebstherapien zielt daher darauf ab, die gesamte Tumorphosphon abzutöten (Rahman et al., 2011).

Dieses Modell wird durch die Krebsstammzellhypothese in Frage gestellt. Nach dieser gibt es eine Subpopulation, die Krebsstammzellen, die das Wachstum des Tumors und die Bildung von Metastasen verantwortet (Woodward & Hill, 2016). So sind nur wenige Zellen der akuten myeloischen Leukämie nach Transplantation dazu befähigt, erneut eine Leukämie auszulösen. Die Mehrzahl der Tumorzellen proliferiert zwar stark, weist jedoch nur ein geringes Potential zur Selbsterneuerung auf (Lapidot et al., 1994). Der Tumor besteht demnach aus einer heterogenen Population, die durch die asymmetrische Zellteilung der hierarchischen Spitze aufrechterhalten wird (Abbildung 1.1; Reya et al., 2001). In soliden Tumoren, wie erstmalig im Mamma- (Al-Hajj et al., 2003), aber auch im Harnblasenkarzinom (Ohishi et al., 2015), konnten Krebsstammzellen ebenfalls identifiziert werden.

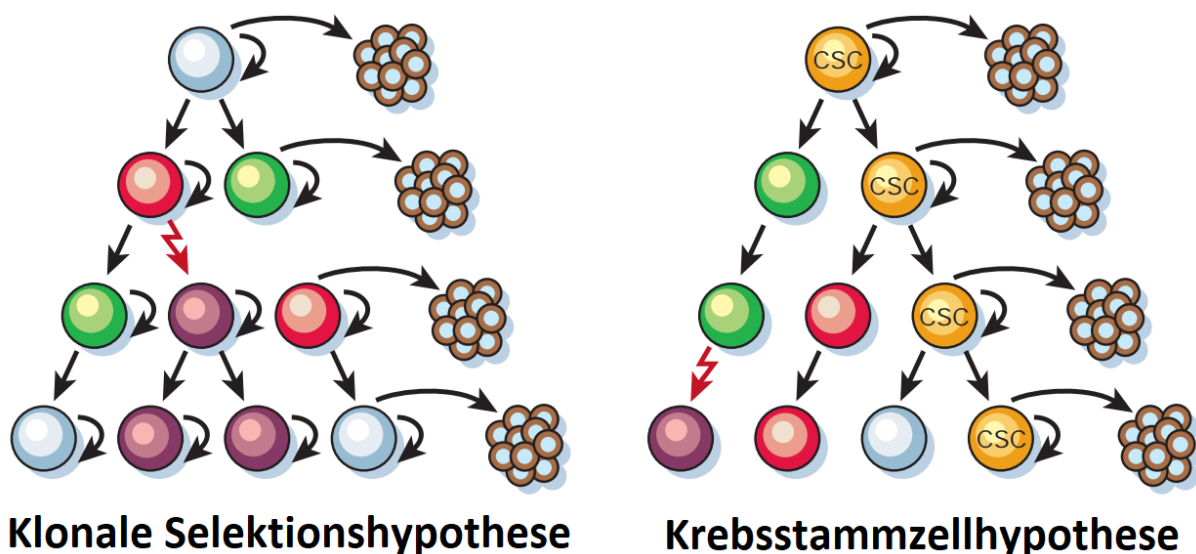


Abbildung 1.1: Die zwei Hypothesen der Tumorinitiierung (modifiziert nach Reya et. al, 2001)

Nach der klonalen Selektionshypothese entsteht die Heterogenität des Tumors aufgrund der verschiedenen Phänotypen der Krebszellen. Jede der Zellen kann proliferieren und das Tumorstwachstum fördern. Dagegen nimmt die Krebsstammzellhypothese an, dass die Mehrheit der Zellen nur begrenztes Proliferationspotential besitzt. Allein die asymmetrische Zellteilung der Krebsstammzellen (engl. *cancer stem cell*, CSC, dargestellt in Gelb) begünstigt die Heterogenität und das Wachstum des Tumors.

Neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorstprogression weisen die Krebsstammzellen weitere therapierelevante Charakteristika auf. Ähnlich zu adulten Stammzellen besitzen Krebsstammzellen ABC-Transporter, welche zytotoxische Substanzen aus dem Zellinneren

transportieren können (Begicevic & Falasca, 2017). Die Chemoresistenz wird außerdem über eine verstärkte Expression von Enzymen, welche Medikamente metabolisieren können, vermittelt. So erfolgt der Abbau von Cyclophosphamid mithilfe von Aldehyddehydrogenasen (Douville et al., 2009). Die Überexpression von Bcl-2 (Domen et al., 1998) und effektivere Mechanismen zur Reparatur der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA; Eyer & Rich, 2008) schützen die Krebsstammzellen im Vergleich zu gewöhnlichen Tumorzellen vor Apoptose. Dies könnte erklären, warum viele Krebstherapien zwar die Tumormasse reduzieren, die Krebsstammzellen jedoch überleben und Rezidive verursachen (Campbell & Polyak, 2007).

Vor diesem Hintergrund erschien das Abtöten von Krebsstammzellen als eine vielversprechende Möglichkeit in der Krebstherapie. In diesem Zusammenhang wurde jedoch dargestellt, dass auch differenzierte Tumorzellen den Pool an Krebsstammzellen erneuern können. Analog zur Plastizität von adulten Stammzellen kann durch die Reexpression der Yamanaka-Faktoren c-Myc, KLF4, Oct-4 und Sox-2 jede Tumorzelle entdifferenzieren (Yue et al., 2017). Die Stammzellfähigkeit ist daher kein Merkmal einer starren Subpopulation, sondern hält ein fließendes Gleichgewicht zwischen uni- und pluripotenten Tumorzellen aufrecht. Diese Dynamik ist für die fehlende Wirkung des Abtötens von Krebsstammzellen verantwortlich (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014).

1.2.2 Die zelluläre Seneszenz

Die entgegengesetzte Kraft zur Stammzellfähigkeit ist das Altern von Zellen, ein natürlicher Prozess der verminderten Selbsterneuerung und dem zunehmenden funktionellen Rückgang des Gewebes (McHugh & Gil, 2018). Die Zellalterung kann durch mehrere Stressreize ausgelöst werden. Dazu zählen DNA- und Telomerschäden, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion oder der Einsatz von Zytostatika und γ -Strahlung (Calcinotto et al., 2019). Dies induziert die p53/p21^{CIP1}- und p16^{INK4a}/Rb-Tumorsuppressorwege (siehe Abbildung 1.2). Dadurch werden die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) gehemmt und das Retinoblastoma-Protein (Rb) verbleibt im unphosphorylierten, aktiven Zustand. Rb kontrolliert den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus und reguliert die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (Chicas et al., 2010). In der Folge verharren die geschädigten Zellen in einem irreversiblen Zellzyklusarrest (Herranz & Gil, 2018).

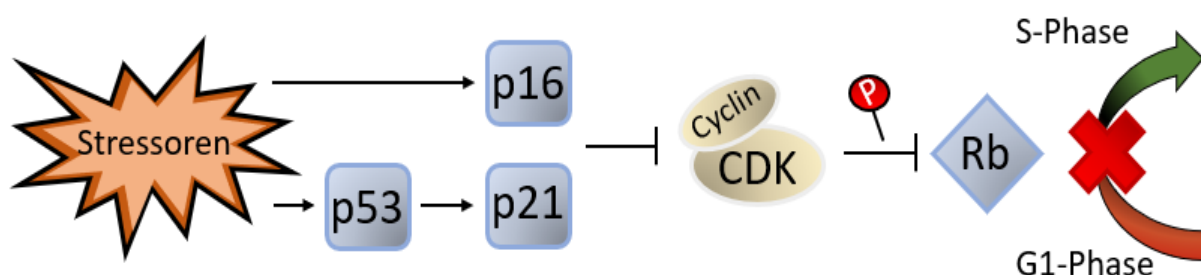


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des seneszenzvermittelten Zellzyklusarrestes (modifiziert nach McHugh & Gil, 2018)

Zwar gilt der Proliferationsstopp als zentrales Kennzeichen der zellulären Seneszenz, dennoch bleiben die seneszenten Zellen metabolisch aktiv. Der erhöhte Gehalt an Lysosomen induziert einen Anstieg der Autophagie (Kurz et al., 2000). Auch die Glykolyse und der mitochondriale Metabolismus sind gesteigert. Dadurch wird vermutlich der Energiebedarf zur Expression eines proinflammatorischen Sekretoms gedeckt (Dörr et al., 2013). Diese Eigenschaft ist als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (SASP) bekannt und dient der Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen. Das daraus entstehende inflammatorische Milieu rekrutiert Zellen des Immunsystems. So sollen geschädigte Zellen eliminiert und die Gewebereparatur erleichtert werden (Coppé et al., 2008). Das Sekretom kann weiterhin die Proliferation von benachbarten Zellen begrenzen (Herranz & Gil, 2018). Derartige Programme der Seneszenz haben sich wahrscheinlich entwickelt, um die Replikation präneoplastischer Zellen zu limitieren (Collado & Serrano, 2010).

1.2.3 Seneszenz im Kontext der Tumorprogression

Trotz der protektiven Funktion ist das Altern der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Tumors (Childs et al., 2017): Die Inzidenz von Krebserkrankungen steigt ab dem Alter von 50 Jahren signifikant an (Rodier & Campisi, 2011). Abbildung 1.3 stellt dar, dass die zelluläre Seneszenz, ursprünglich als Barriere der Karzinogenese angesehen, paradoxerweise auch das Tumorwachstum fördern kann (Lecot et al., 2016).

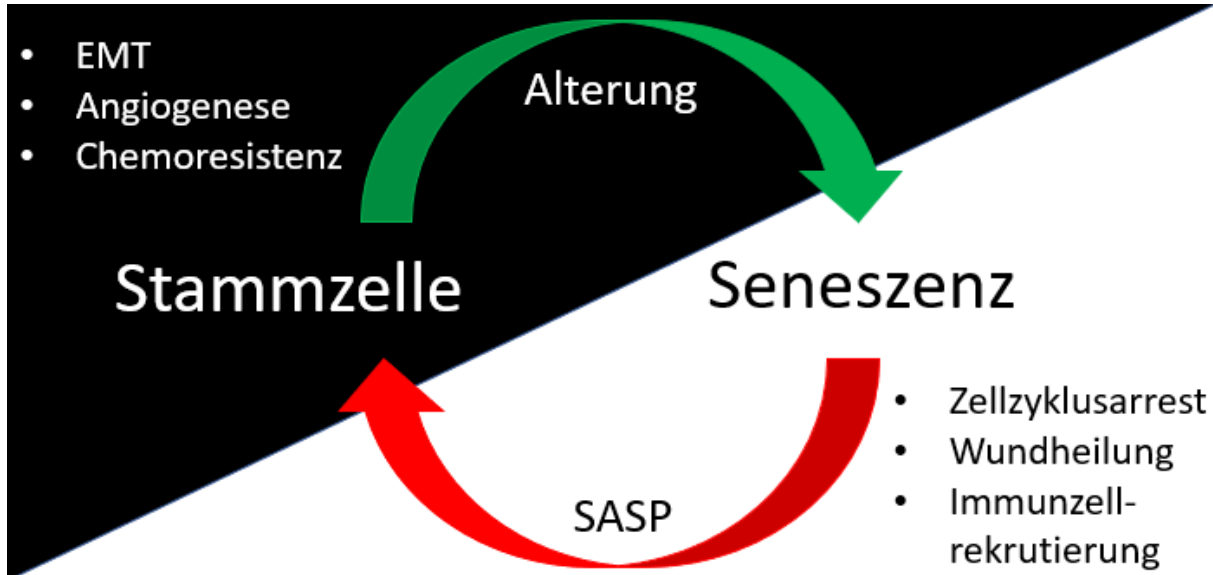


Abbildung 1.3: Die Allianz zwischen Stammzellen und Seneszenz (modifiziert nach Lecot et. al, 2016)

Die zelluläre Seneszenz und die damit verbundenen Programme gelten als physiologische Barriere der Karzinogenese. Mittels des SASP kann jedoch die Entdifferenzierung von Nachbarzellen vermittelt werden. Durch diesen Kreislauf wird in der Tumorphilipulation ein Gleichgewicht zwischen seneszenten Zellen und aggressiven Stammzellen aufrechterhalten.

Obwohl die zelluläre Seneszenz der physiologische Antagonist der Stammzellfähigkeit ist, kann sie die Selbsterneuerung des Tumors fördern. Mittels des SASP induziert die Akkumulation gealterter Zellen

die Verjüngung benachbarter Zellen. Dadurch kann ein Gleichgewicht zwischen seneszenten Zellen und Stammzellen aufrechterhalten werden (Ritschka et al., 2017). Folglich kann auch die Chemotherapie-induzierte Seneszenz die Expression von Stammzellmarkern erhöhen. Diese Plastizität, als *senescence-associated stemness* bezeichnet, verleiht der Population ein größeres Tumorigenitätspotential und kann vermehrt in Rezidiven nachgewiesen werden (Milanovic et al., 2018).

Der SASP seneszenten Zellen begünstigt die Vaskularisation des Tumorgewebes, indem die Angiogenese induziert wird (Coppé et al., 2006). Weiterhin kann durch die Sekretion von Proteasen der Abbau der extrazellulären Matrix vermittelt werden. Dies destabilisiert die Gewebearchitektur und erleichtert die Invasion von Tumorzellen (Coppé et al., 2008).

In Nachbarzellen können seneszente Zellen die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induzieren (Lahm et al., 2012). Die EMT ist ein physiologischer Prozess der Embryonalentwicklung (Gros & Tabin, 2014) und Wundheilung (Banerjee et al., 2015). Es ermöglicht epithelialen Zellen, sich aus dem soliden Zellverband zu lösen und durch die extrazelluläre Matrix zu migrieren (Hay, 2005). Durch die Repression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin werden die Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakte aufgehoben (Puisieux et al., 2014). Dagegen werden der funktionelle Gegenspieler N-Cadherin und mesenchymale Marker, wie Fibronectin und Vimentin, während der EMT überexprimiert. Diese Proteine vermitteln eine Reorganisation des Zytoskeletts und die Wandlung in einen mesenchymalen Phänotyp mit gestreckten, fibroblastischen Zellen (Zeisberg & Neilson, 2009). Im Rahmen der malignen Progression fördert die EMT die Invasivität von Tumorzellen und trägt damit entscheidend zur Bildung von Metastasen bei (Diepenbruck & Christofori, 2016).

1.3 Das Kernmembranprotein Lamin A/C

1.3.1 Struktur und Funktion

Die sieben Isoformen der nukleären Lamine werden zu den Typ-V-Intermediärfilamenten gezählt und in die A- und B-Typ-Lamine unterteilt. Gemeinsam gelten sie als Hauptbestandteil der Kernlamina (Ho & Lammerding, 2012).

Für die A-Typ-Lamine codiert das Gen *LMNA*. Durch alternatives Spleißen entstehen die Isoformen Lamin A und C. Die Lamine bestehen aus drei Hauptdomänen, dem kurzen N-terminalen Kopf, der zentralen Stabdomäne und dem C-terminalen Schwanz (McKeon et al., 1986). Die Domänen unterliegen posttranslationalen Modifikationen, wie der C-terminalen Farnesylierung und der Spaltung durch die Zinkmetalloproteinase 24, zur Bildung der reifen Form von Lamin A (Davies et al., 2011). Durch die *Coiled-Coil*-Bildung der Stabdomänen entstehen Lamin-Dimere. Mehrere dieser Dimere setzen sich zu Polymeren zusammen, die in ihrer Gesamtheit die Filamente bilden (Parry & Steinert, 1999).

Im Zusammenhang mit der Stammzellfähigkeit lässt sich festhalten, dass Lamin A/C, im Gegensatz zu den B-Typ-Laminen, in der frühen embryonalen Entwicklung nicht exprimiert wird. Stattdessen exprimieren fast alle differenzierten Zellen die A-Typ-Lamine (Röber et al., 1989).

Das Lamin A/C hat für den Kern mehr als nur strukturelle und stabilisierende Bedeutung. A-Typ-Lamine vermitteln die physikalische Kopplung zwischen Kern und Zytoskelett und tragen damit zur intrazellulären Kraftübertragung, Migration und Polarisation bei (Méjat & Misteli, 2010). Weiterhin sind die Intermediärfilamente an der Organisation und dem Einbau der Kernporenkomplexe in die Kernmembran beteiligt (Smythe et al., 2002). Durch die Interaktion mit zahlreichen Proteinen (siehe Abbildung 1.4) reguliert Lamin A/C die Zellproliferation, DNA-Reparatur und Apoptose. Dazu zählt unter anderem die Modulation der E2F-abhängigen Transkription und des MAPK-Signalweges (Rodríguez et al., 2010). Über Histone und die laminassoziierten Proteine, wie LAP2, kann die Struktur und Organisation des Chromatins reguliert werden (Maraldi et al., 2011).

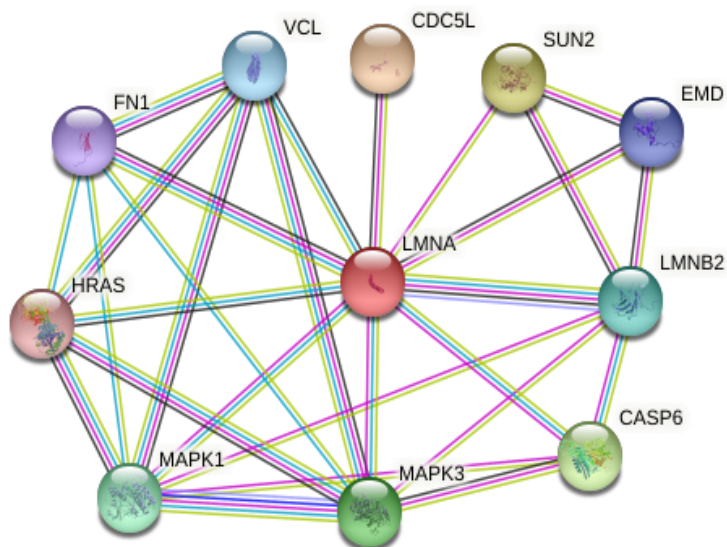


Abbildung 1.4: Netzwerk von Lamin A/C
(Szklarczyk et al., 2019)

Dargestellt ist die Interaktion von Lamin A/C mit verschiedenen Schlüsselproteinen der Zelle. Unter anderem ist Lamin A/C mit HRAS, MAPK1 und MAPK3 (Proteine des MAPK-Signalweges) vernetzt. Gemeinsam mit SUN2 ist Lamin A/C an der Kopplung zwischen Zellkern und Zytoskelett beteiligt. Auch mit dem Zellzyklusregulator CDC5L interagiert Lamin A/C.

1.3.2 Rolle von Lamin A/C in der Karzinogenese

Ein Merkmal von Krebserkrankungen ist die nukleäre Atypie. Dies lässt die wichtigsten Strukturproteine des Zellkerns, die Lamine, in das Zentrum von verschiedenen Untersuchungen in Zusammenhang mit der Karzinogenese rücken. Tabelle 1.2 stellt dar, dass Lamin A/C im Gewebe maligner Tumore mehrheitlich vermindert exprimiert wird (Irianto et al., 2016).

Eine niedrige Expression von Lamin A/C ist bei Patienten mit Brustkrebs mit einem schlechteren klinischen Outcome verbunden (Alhudiri et al., 2019). Im Kolonkarzinom korreliert der niedrige Spiegel mit einem erhöhten Risiko für Rezidive (Belt et al., 2011). *In vitro* fördert der Knockdown von Lamin A/C durch eine effizientere Zellmigration das Tumorstadium (Harada et al., 2014). Der Grund dafür könnte sein, dass der Verlust von Lamin A/C eine Wandlung der Krebszelle in einen mesenchymalen Zustand, ähnlich dem der Krebsstammzellen, auslöst (Irianto et al., 2016).

Im Gegensatz dazu zeigen mehrere Studien, dass eine erhöhte Expression von Lamin A/C dem Zellkern eine höhere Steifigkeit und Integrität verleiht (Swift et al., 2013; Tamiello et al., 2013). Dies könnte das Genom vor Mutationen schützen und das Migrationspotential einschränken (Irianto et al., 2016).

Dennoch bleibt fraglich, warum das Gewebe mancher Tumorentitäten einen erhöhten Spiegel der A-Typ-Lamine aufweist (siehe Tabelle 1.2). Weiterhin wirkt sich die gewebspezifische Ablation von Lamin A/C in Tiermodellen

nicht auf das Gesamtwachstum und die Morphologie des Gewebes aus (A. S. Wang et al., 2015).

Tabelle 1.2: Expression von Lamin A/C im Vergleich zum Ursprungsgewebe (modifiziert nach Irianto et al., 2016)

Tumorentität	Expression von Lamin A/C
Bronchialkarzinom	↓
Kolonkarzinom	↓
Leukämie	↓
Magenkarzinom	↓
Mammakarzinom	↓
Prostatakarzinom	↓
Basaliom	↓↑
Ovarialkarzinom	↓↑
Kolorektales Karzinom	↑
Spinaliom	↑
Abk.: erniedrigt (↓), erhöht (↑), bidirektional (↓↑)	

1.3.3 Progerin – Eine mutierte Form des Proteins Lamin A/C

Mutationen des *LMNA*-Gens lösen bisher neun bekannte Erkrankungen, zusammengefasst als Laminopathien, aus. Unter anderem zählt hierzu das Hutchinson-Gilford-Syndrom (engl. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS; Kang et al., 2018). Als Treiber des Syndroms wurde das Protein Progerin identifiziert. Das HGPS ist eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenzrate von einem Fall bei acht Millionen Geburten. Schätzungsweise leben weltweit etwa 200 bis 250 Kinder mit HGPS (Coppedè, 2013).

Bei der Geburt erscheinen die erkrankten Kinder gesund, entwickeln innerhalb der ersten Lebensjahre jedoch charakteristische Merkmale einer beschleunigten Alterung. Erstes Symptom ist häufig eine starke Wachstumsverzögerung. Durchschnittlich erreichen die Kinder bei einer Größe von 110 cm ein Endgewicht von 15 kg (Hennekam, 2006). Die pathologische körperliche Entwicklung geht mit Skelettdysmorphien, wie einer clavikulären Hypoplasie, Coxa valga und generalisierten Osteopenie, einher (Cleveland et al., 2012). Zu den typischen Gesichtsanomalien gehören ein kleiner, zurückliegender Unterkiefer, ein verminderter Augenabstand und eine schmale, schnabelartige Nase. Besonders auffällig ist das Missverhältnis zwischen Gesichts- und Kopfgröße (Ullrich et al., 2012). Haut und Haare zeigen vorzeitige Alterungserscheinungen, wie eine progressive Alopezie. Im Verlauf schreitet der Verlust von subkutanem Fett voran, weswegen die Haut trocken und atrophisch wird (Hennekam, 2006). Durchschnittlich sterben die Patienten im Alter von 13 Jahren. 75 % der Todesfälle sind in Folge atherosklerotischer Läsionen auf Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt oder Schlaganfall zurückzuführen (Gerhard-Herman et al., 2012).

Die Pathogenese des HGPS beruht mehrheitlich auf einer Punktmutation im Exon 11 des *LMNA*-Gens (c.1824C> T, p.G608G). Dadurch werden neue Spleißstellen eingeführt, in deren Folge 150 Nukleotide entfernt werden und das resultierende Translationsprodukt eine interne Deletion von 50 Aminosäuren enthält. Die Deletion eliminiert die Stelle für die Prozessierung durch die Zinkmetalloproteinase 24, weswegen der farnesylierte und carboxymethylierte Schwanz vom unreifen Prelamin erhalten bleibt. Dies stört die Zusammenlagerung der Proteine zu Dimeren, was die Kernhülle verformt und destabilisiert (Eriksson et al., 2003). Neben dieser häufigsten Punktmutation existieren weitere Mutationen des *LMNA*-Gens und der Zinkmetalloproteinase 24, die das HGPS verursachen können (Coppedè, 2013).

In Zellen gesunder Individuen wird Progerin auch exprimiert und induziert altersbedingte Anomalien (Rodriguez et al., 2009). Dies legt nahe, dass Progerin Alterungswege beschleunigt, statt eigene Kaskaden zu induzieren. So korreliert eine hohe Expression von Progerin in Tierversuchen mit einem herunterregulierten Wnt- und Notch-Signalweg, der Erschöpfung adulter Stammzellen und einer verminderten Regenerationsfähigkeit (Rosengardten et al., 2011).

Trotz der DNA-Schäden ist die Inzidenz von Krebserkrankungen bei Patienten mit HGPS nicht erhöht. Dies steht im Kontrast zum Werner-Syndrom, einer Progerie-Form des Erwachsenen, bei der das Risiko für maligne Tumoren erhöht ist (Hennekam, 2006). Fernandez und Kollegen (2014) demonstrierten, dass Fibroblasten von HGPS-Patienten resistent gegenüber einer neoplastischen Transformation sind. Als Effektor von Progerin konnte das Bromodomänenprotein 4 identifiziert werden. Es verhindert durch Chromatinremodellierung die Tumorigenese (Fernandez et al., 2014). Übereinstimmend verringert die Überexpression von Progerin *in vitro* das Migrations- und Invasivitätspotential von Zelllinien des Bronchialkarzinoms (Hu et al., 2020). Auch die Akkumulation von Prelamin vermindert in Tierversuchen die Krebsinvasion (de la Rosa et al., 2013). Im Gegensatz dazu exprimieren das Mamma- und Kolonkarzinom im Vergleich zum Ursprungsgewebe vermehrt Progerin (Tang et al., 2010). Eine Überexpression von Progerin in Zelllinien des Prostatakarzinoms fördert zudem das Tumorstadium. Dies wirft die Frage auf, ob die Tumorstadiumprogression durch die geschädigte DNA-Reparatur in Progerin-exprimierenden Zellen begünstigt wird (Tang et al., 2010).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Das finale Stadium einer Krebserkrankung wird durch eine dynamische Subpopulation, den Krebsstammzellen, verursacht. Diese haben die Fähigkeit, die Tumorphilipulation zu verjüngen und deren metastatische Kapazität zu fördern (Reya et al., 2001). Selbst wenn vorhandene Krebsstammzellen durch eine spezifische Therapie abgetötet werden, entdifferenzieren die Nachbarzellen und erhalten die Proliferation des Tumors aufrecht (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014).

Der Ansatz im Rahmen dieser Arbeit besteht daher in der Beschleunigung ihrer Alterung, die eine natürliche Barriere gegen die Karzinogenese darstellt (McHugh & Gil, 2018). Hierzu wird Progerin, die mutierte Form von Lamin A/C, in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms transduziert.

Unter Kontrolle eines Promoters, der für die Yamanaka-Faktoren Oct-4 und Sox-2 responsiv ist, soll Progerin nur in Krebsstammzellen exprimiert werden. Die Seneszenz soll in benachbarten differenzierten Tumorzellen den Erwerb pluripotenter Eigenschaften erzeugen. Die damit verbundene Reaktivierung der Yamanaka-Faktoren induziert wiederum die Expression von Progerin. Jede differenzierte Zelle, die Signale von seneszenten Krebsstammzellen empfängt, kann so gezwungen werden, in die Seneszenz einzutreten. Durch diesen Kreislauf soll die Allianz in der Stammzell- und Seneszenzdynamik unterbrochen werden. Die Population gealterter Zellen mit verringerter Regenerationskapazität könnte sich vergrößern und das Reservoir der Krebsstammzellen sukzessive erschöpfen. Nachfolgend soll untersucht werden, wie die Induktion der Seneszenz die Aggressivität und Metastasierungskapazität der Zellen des Harnblasenkarzinoms beeinflusst.

Um den Effekt auf die Krebsstammzellen vergleichen zu können, werden alle Experimente zunächst mit einem zellunspecificen Vektor, der die Expression von Progerin in der gesamten Tumorphilipulation vermittelt, durchgeführt. Zudem werden die Zellen mit der physiologischen Form Lamin A/C transduziert, um dessen Wirksamkeit mit der des mutierten Proteins Progerin vergleichen zu können.

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Hypothesen:

- In Zellen des Harnblasenkarzinoms induziert die Überexpression von Progerin zelluläre Seneszenz.
- Die Überexpression von Progerin erschöpft das Stammzellreservoir in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms.
- Progerin-exprimierende Zellen des Harnblasenkarzinoms besitzen eine verringerte Metastasierungskapazität.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Medium
RT-4	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie	RPMI
T24	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie	DMEM ohne Pyruvat
UM-UC-3	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie	DMEM ohne Pyruvat
dFB	Humane dermale Fibroblasten-Zelllinie	DMEM ohne Pyruvat
VH6	Humane Vorhautfibroblasten-Zelllinie	DMEM ohne Pyruvat

2.1.2 Bakterienstamm

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* JM109 Zellen von Promega (Mannheim) verwendet.

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2.2: Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller (Firmensitz)
mCMVp-dsCopGFP-PURO	Plasmid zur GFP-Expression	Wakefield Lab (Michigan)
SORE6-mCMVp-dsCopGFP-PURO	Plasmid zur GFP-Expression unter der Kontrolle eines SOX2/OCT4 Response-Elements	Wakefield Lab (Michigan)
pLenti-MCS	Expressionsplasmid mit einer <i>Multiple Cloning Site</i>	IEGT (Rostock)
pcDNA3.1	Expressionsplasmid mit CMV-Promoter	Invitrogen (Karlsruhe)
pBABE-puro-GFP-Progerin	Plasmid zur Expression von GFP und Progerin	Addgene (Watertown)
pBABE-puro-GFP-LMNA	Plasmid zur Expression von GFP und Lamin A/C	Addgene (Watertown)
CopGFP-T2A-Progerin	synthetisiertes Codon-optimiertes Progerin-Fragment	Thermo Fischer Scientific (Schwerte)
CopGFP-T2A-LMNA	synthetisiertes Codon-optimiertes LMNA-Fragment	Thermo Fischer Scientific (Schwerte)

2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper

Primärantikörper			
Art	Antikörper gegen	Sekundärantikörper	Hersteller (Firmensitz)
Allgemein	Progerin	Maus	Abcam (Cambridge)
	Lamin A/C	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas)
	β-Aktin	Maus	Sigma-Aldrich (München)
Seneszenz	p53	Maus	Merck Millipore (Burlington)
	p21	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas)
	Bcl-2	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas)
	Bax	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas)
Stammzellmarker	Oct-4	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt)
	Sox-2	Kaninchen	Merck Millipore (Burlington)
	Nanog	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt)
	c-Myc	Maus	Santa Cruz (Dallas)
	CD133	Maus	Merck Millipore (Burlington)
EMT-Marker	E-Cadherin	Maus	BD Biosciences (San Jose)
	N-Cadherin	Maus	BD Biosciences (San Jose)
	Vimentin	Maus	Santa Cruz (Dallas)
	Slug	Kaninchen	Cell Signaling (Frankfurt)
	Snail1	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas)
Sekundärantikörper			
Beschreibung		Hersteller (Firmensitz)	
anti-Maus IgG-HRP		Cell Signaling (Frankfurt)	
anti-Kaninchen IgG-HRP		Cell Signaling (Frankfurt)	

2.1.5 Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 2.4: Oligonukleotidsequenzen

Gen	Forward-Sequenz 5' - 3'	Reverse-Sequenz 5' - 3'
Oct-4	TCGCAAGCCCTCATTTCCACC	CCACAGAACTCATACGGCGG
Sox-2	CAGGAGTTGTCAAGGCAGAGA	CGCCGCCGATGATTGTTATT
Nanog	CTGCAGAGAAGAGTGTCGCA	AAAGGCTGGGGTAGGTAGGT
c-Myc	CAGCGACTCTGAGGAGGAAC	GCTGGTGCATTTTCGGTTGT
CD133	TGCCTTGAGTGAATGACCCC	TGAAAAGGAGTTCGCCGACA
GAPDH	CACCACCCTGTTGCTGTA	CACAGTCCATGCCATCAC

2.1.6 Chemische Substanzen

2.1.6.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Enzyme und Puffer zur Klonierung wurden von New England Biolabs (Frankfurt) erworben.

Tabelle 2.5: Chemikalien

Art	Chemikalie	Hersteller (Firmensitz)
Zellkultur	DMEM, <i>High Glucose without Sodium Pyruvat</i>	Sigma-Aldrich (München)
	RPMI 1640	Sigma-Aldrich (München)
	<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Sigma-Aldrich (München)
	Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (München)
	Amphotericin B 250 µg/ml	Sigma-Aldrich (München)
	MEM <i>non-essential amino acids</i> 100 x (MEM NEAA)	Sigma-Aldrich (München)
	<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich (München)
	Trypsin - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (München)
	<i>Fluoroshield histology mounting medium with DAPI</i>	Sigma-Aldrich (München)
	Puromycin 500 mg	PAA (Cölbe)
	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) BioChemica	AppliChem (Darmstadt)
	Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
	Matrigel Matrix	Corning (Corning)
	Proliferationshemmer Aphidicolin	Sigma-Aldrich (München)
	Cell Staining Buffer	BioLegend (San Diego)
Protein- Arbeitstechniken	Bradford (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad (München)
	1M Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
	<i>Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	<i>Page-Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	Isopropanol	Walter-CMP (Kiel)
DNA- und RNA- Arbeitstechniken	Ethanol 96 %	Walter-CMP (Kiel)
	β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
	<i>RT-PCR Grade Water</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	<i>iTaq Universal SYBR Green Supermix</i>	Bio-Rad (München)
	GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
	DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

2.1.6.2 Lösungen, Puffer und Gele

Tabelle 2.6: Lösungen, Puffer und Gele

Art	Beschreibung	Inhaltsstoffe	Hersteller (Firmensitz)
Klonierung	SOC-Medium	2 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose	Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe)
	LB-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 170 mM NaCl ad 1 000 ml Wasser	Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe)
	LB-Agar	15 g Agar 1 000 ml LB-Medium	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Protein-Arbeitstechniken	NP-40 Puffer	5 ml TRIS-HCl 3 ml NaCl 1 ml NP-40 0,5 g Natriumdesoxycholat ad 100 ml Wasser	Serva (Heidelberg) Carl Roth (Karlsruhe) Thermo Fisher Scientific (Schwerte) Carl Roth (Karlsruhe)
	Proteinase-/Phosphataseinhibitor	1 Tabl. Proteaseinhibitor 5 Tabl. PhosStop Roche 5 ml Wasser	Roche (Mannheim) Roche (Mannheim)
	Sammelgelpuffer (0,5 M)	60,55 g Tris ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg)
	Sammelgel	50 µl SDS 10 % 0,5 ml Acrylamid 40 % 5,5 µl TEMED 8,5 µl APS 30 % 1,25 ml Sammelgelpuffer 3,2 ml Wasser	Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Bio-Rad (München) Sigma-Aldrich (München)

	Trenngelpuffer (1,5 M)	181,65 g Tris ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg)
	Trenngel	100 µl SDS 10 % 2,5 ml Acrylamid 40 % 6 µl TEMED 17 µl APS 30 % 2,5 ml Trenngelpuffer 4,9 ml Wasser	Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe) Bio-Rad (München) Sigma-Aldrich (München)
	10 x SDS-Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Pellets ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg) Carl Roth (Karlsruhe) Carl Roth (Karlsruhe)
	Blotpuffer	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg) Carl Roth (Karlsruhe) Avantor (Gliwice)
	10 x <i>Tris-buffered saline</i> (TBS)	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg) Bio-Rad (München)
	1 x <i>Tris-buffered saline with Tween</i> (TBST)	1 x TBS Tween 20	Bio-Rad (München)
	5-prozentige Milchlösung	5 g Milchpulver 100 ml Wasser	Carl Roth (Karlsruhe)
DNA- und RNA- Arbeitstechniken	50 x TAE-Puffer	242,2 g Tris 100 ml EDTA (0,5 M) 57,1 ml Essigsäure ad 1 000 ml Wasser	Serva (Heidelberg) Carl Roth (Karlsruhe) Avantor (Gliwice)
	Agarosegel	1 g Agarose 0,2 µg/ml Ethidiumbromid 100 ml 1 x TAE-Puffer	Peqlab (Erlangen) Merck (Darmstadt)

2.1.7 Geräte

Tabelle 2.7: Geräte

Art	Gerätebezeichnung	Beschreibung	Hersteller (Firmensitz)
Zellkultur	CO ₂ -Inkubator (Serie CB150)	CO ₂ -Inkubator	Binder (Tuttlingen)
	S@feFlow 1.2	Zellkulturwerkbank	Nunc (Wiesbaden)
	Multifuge 3 L-R	Zentrifuge	Heraeus (Hanau)
	Centrifuge 5415 R	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
	Vortex GENIE 2	Schüttler	Scientific Industries (New York)
	KERN 572	Präzisionswaage	Kern & Sohn (Balingen)
	Axio Vert.A1	Mikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
	AxioCam ICc 1	Kamera	Carl Zeiss (Oberkochen)
	<i>Spark Microplate Reader</i>	Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan (Männedorf)
	<i>BD FACSAria™ III Cell Sorter</i>	Zellsortiersystem	BD Biosciences (San Jose)
Klonierung	Kelvitron	Bakterieninkubator	Heraeus (Hanau)
	GFL 3033	Schüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
	<i>Thermomixer comfort</i>	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
	Gel Doc EZ System	UV-Dokumentationsgerät	Bio-Rad (München)
	<i>Super-Bright Transilluminator</i>	UV-Transilluminator	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Protein-Arbeitstechniken	Rotator RS-RD 5	Drehrad	Phoenix Instrument (Garbsen)
	RCT basic	Magnetrührer	IKA (Staufen)
	BioPhotometer	Fotometer	Eppendorf (Hamburg)
	<i>Celloshaker</i>	Schüttler	Renner (Dannstadt)
	Mini-PROTEAN II Cell	Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
	Mini-PROTEAN Tetra System	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
	Standard Power Pack P25	Spannungsquelle	Biometra (Göttingen)
	<i>ChemiDoc Touch System</i>	Western Blot <i>Imager</i>	Bio-Rad (München)
DNA- und RNA- Arbeitstechniken	NanoDrop ND-1000	Spektralphotometer	Peqlab (Erlangen)
	UVT-B-AR	PCR-Werkbank	BioSan (Riga)
	<i>T100 Thermal Cycler</i>	Thermozykler	Bio-Rad (München)
	<i>C1000 Touch Thermal Cycler</i>	Thermozykler	Bio-Rad (München)
	<i>Sub-Cell GT Cell</i>	Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)

2.1.8 Kits**Tabelle 2.8: Kits**

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
<i>ECL Plus Western Blotting Detection System</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
<i>Senescence β-Galactosidase Staining Kit</i>	Cell Signaling (Frankfurt)
<i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
<i>NucleoSpin[®]Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin[®]RNA</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoBond[®]</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>XTT Cell Proliferation Assay Kit</i>	Trevigen (Gaithersburg)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellkulturen

2.2.1.1 Zellkultivierung

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum angegebenen Nährmedium wurden 10 % FBS, 1 % MEM NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,5 % Amphotericin B hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich unter sterilen Werkbänken passagiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit PBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen vom Kulturschalenboden zu lösen, wurden die Zellen mit Trypsin versetzt und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnten die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen werden. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 1 200 rpm wurde der Überstand einschließlich des Trypsins abgenommen. Das gewonnene Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, sodass die Zellsuspension anteilig ausgesät werden konnte.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Durchführung funktioneller Untersuchungen mussten einheitliche Zellzahlen ausgesät werden. Die dafür notwendige Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde identisch zum Passagieren eine Zellsuspension gewonnen, von welcher 10 µl in die Zählkammer pipettiert wurden. Nachdem die Zellen in den Quadranten ausgezählt wurden, ließ sich anhand der

folgenden Formel die Zellzahl pro Milliliter ermitteln:
$$\frac{\text{Zellzahl in allen 4 Quadranten}}{4} \times 10\,000$$

2.2.1.3 Zellernte

Für die RNA- und Proteinisolierung mussten die Zellen geerntet werden. Nach Absaugen des Mediums und der Zugabe von PBS wurden die haftenden Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein Falcon aufgenommen und für 10 min bei 1 400rpm zentrifugiert. Folglich konnte der Überstand abgenommen und das Zellpellet weiterverwendet oder eingefroren werden.

2.2.1.4 Fixieren der Zellen

Um die Zellen zu fixieren, wurde ein Objektträger in eine Zellkulturschale gelegt und anschließend Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde der Objektträger mit Methanol beträufelt und für 10 min inkubiert. Nachdem das Methanol abgenommen wurde, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Auf den Objektträger wurde die Lösung *Fluoroshield histology mounting medium with DAPI* pipettiert. Nach Abdecken mit einem Deckglas konnten die fixierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

2.2.2 Gentechnische Arbeitsschritte

2.2.2.1 Klonierung

2.2.2.1.1 Restriktionsverdau

Im ersten Schritt der Klonierung wurden Restriktionsansätze vorbereitet. Zu 5 µg Plasmid-DNA wurden 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym und 5 µl Puffer gegeben. Der Verdau wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt und inkubiert für 3 h bei der enzymespezifischen Temperatur.

Sollte die anschließende Ligation mit *blunt ends* erfolgen, mussten die Ansätze mit dem Klenow-Fragment behandelt werden. Dieses Enzym ist ein Teil der DNA-Polymerase 1 aus *Escherichia coli* und besitzt lediglich die 5'→3' Polymerase-Aktivität und 3'→5' Exonuklease-Aktivität. Dadurch werden 5'-überstehende DNA-Sequenzen aufgefüllt und 3'-überstehende DNA-Sequenzen abgebaut. Der Verdau wurde mit 1,5 µl des Klenow-Fragmentes, 0,5 µl Puffer, 0,2 µl desoxyNukleosidTriPhosphat (dNTP) und 2,8 µl Wasser versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 25 °C wurde die Reaktion mithilfe von 1,2 µl EDTA (0,5 M) und einem 20-minütigen Hitzeschock bei 75 °C gestoppt.

Nachfolgend wurden der Ansatz mit 1 µl einer alkalischen Phosphatase behandelt. Das Enzym dephosphoryliert die 5'-Enden des Vektors und vermeidet dadurch eine Selbstligation des Vektors. Auch diese Reaktion wurde nach 1 h mit einem 5-minütigen Hitzeschock bei 65 °C beendet.

2.2.2.1.2 DNA-Extraktion

Die behandelte Plasmid-DNA wurde auf ein 1-prozentiges Agarosegel aufgetragen. Nach einer Gelelektrophorese konnten die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente mit einem Skalpell auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten werden. Die Fragmente wurden nach den Herstellerangaben des Kits *NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt.

2.2.2.1.3 Ligation

Für die Ligation wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA am NanoDrop bestimmt und anschließend die benötigte DNA-Menge mithilfe des *Ligation Calculators* (abgerufen auf: http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) berechnet. Bei der Arbeit mit *blunt ends* wurde das Verhältnis zwischen Vektor und Insert 1:6 und bei *sticky ends* 1:3 gewählt. Zu den errechneten DNA-Mengen wurden 1 µl T4-Ligase und 2 µl Ligasepuffer gegeben. Die Lösung wurde mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

2.2.2.1.4 Transformation

Nachdem der Ligationsansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert, wurde das generierte Plasmid in kompetente *Escherichia coli*-Zellen eingebracht. Für die Transformation wurden 5 µl der Ligation mit 50 µl der Bakterienlösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert.

Als Nährmedium der Bakterien wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Lösung mithilfe einer Impföse auf vorgewärmte Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.1.5 Mini-Plasmidpräparation

Am folgenden Tag konnten Bakterienkolonien gepickt werden, mit welchen 2 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft wurden. Das inokulierte Medium inkubierte über Nacht bei 37 °C und 150 rpm und wurde am nächsten Tag für 3 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 300 µl S1-Puffer resuspendiert. Weiterhin wurden 300 µl S2-Puffer zugegeben, die Lösung geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. An die Zugabe von 300 µl S3-Puffer zur Neutralisation schloss sich eine weitere Durchmischung der Lösung und eine 10-minütige Inkubation auf Eis an. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß aufgenommen. Diesem wurden 630 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 min wurde die sich absetzende Plasmid-DNA mit 70-prozentigem Alkohol gewaschen und im letzten Schritt in 30 µl Wasser aufgenommen.

2.2.2.1.6 Kontrollrestriktion

Zum Prüfen der Klonierung wurde eine Kontrollverdau angesetzt. 1 µl der gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit 0,5 µl Restriktionsenzym, 1 µl Puffer und 7,5 µl Wasser gemischt. Der Verdau inkubierte 3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur und wurde anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.4) unterzogen. Voraussichtlich positive Klone wurden durch die Firma SeqLab sequenziert. Hierfür wurden 1 200 ng Plasmid-DNA vorbereitet und mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt.

2.2.2.1.7 Maxi-Plasmidpräparation

Mittels der Maxi-Plasmidpräparation konnten große DNA-Mengen positiver Klone isoliert werden. Dafür wurde das *Nucleo Bond® Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet und das gewonnene Pellet in 500 µl Wasser aufgenommen.

2.2.2.2 Lentivirale Transduktion

Mithilfe einer Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen wurde ein viruspartikelhaltiger Überstand hergestellt. Von diesem Überstand wurden 5 ml in Zellkulturplatten vorgelegt. Zu jeder Zellkulturschale wurden 100 000 Zellen zugegeben und dieser Ansatz inkubierte für 96 h bei 37 °C. Bei dem ersten Passagieren der Zellen wurden dem frischen Medium 2 µg/ml Puromycin hinzugefügt. Dadurch konnten erfolgreich transduzierte Zellen selektiert werden und gewährleistet werden, dass nur Zellen, welche die DNA stabil integriert haben, kultiviert wurden.

2.2.2.3 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie

Zur Generierung homogener Populationen sollten die transduzierten Zelllinien mittels des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) durchflusszytometrisch sortiert werden. Dafür wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml *Cell Staining Buffer* aufgenommen. Mithilfe des *BD FACSAria™ III Cell sorter* wurden Zellen sortiert, die im Vergleich zur GFP-negativen Kontrolle ein deutlich größeres Fluoreszenzsignal aufwiesen. Die Zellen wurden einzeln auf 96-well-Zellkulturplatten kultiviert. So wurden homogene Populationen, die aus einer GFP-positiven Zelle gewachsen sind, etabliert.

2.2.3 Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Proteinisolierung

Das gewonnene Zellpellet wurde mit einem Ansatz aus 90 µl NP-40 Puffer und 10 µl Proteinase- und Phosphataseinhibitor gelöst. Die Proben invertierten für 30 min auf einem Rotator und wurden anschließend für 10 min bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, bestehend aus den isolierten Proteinen, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Nutzung bei - 20 °C gelagert.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford

Zur Verwendung einer definierten Proteinmenge wurde mittels Bradford-Test die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Das Bradford-Reagenz enthält den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250, welcher in seiner ungebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm aufweist. Nach einer Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Maximum auf 595 nm. Anhand der Zunahme der Extinktion kann die Proteinkonzentration der Lösung ermittelt werden.

Hierzu wurde 1 µl der Proteinlösung mit 99 µl PBS, 200 µl Bradford-Reagenz und 700 µl Wasser gemischt. Es wurde für jede Probe ein Doppelansatz und außerdem ein Leeransatz ohne Protein als Referenzwert vorbereitet. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Extinktion der Ansätze bei einer Wellenlänge von 595 nm mithilfe eines Fotometers gemessen. Anschließend wurden die gemessenen Werte der Doppelansätze gemittelt.

2.2.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Für die Durchführung des Western Blots wurden die Proteine mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dabei dient das porenhaltige Polyacrylamidgel als molekulares Sieb. Große Proteine wandern langsamer als kleine Proteine in dem angelegten elektrischen Feld. Zunächst wurden 30 µg Protein mit Wasser auf 21 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl DTT und 6 µl *Lane Marker Non-Reducing*

Sample Buffer gemischt. Während der Proteinansatz für 10 min bei 95 °C inkubiert, wurde eine Gelkammer aufgebaut und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die denaturierten Proteinproben konnten nun in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Außerdem wurde eine Geltasche mit 2 µl *Page-Ruler Prestained Protein Ladder* befüllt, um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können. Die Gelelektrophorese lief für 2 h bei 100 V.

Mittels des Western Blots wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurden das Gel, die Membran und Filterpapier für 10 min im Blotpuffer equilibriert. Anschließend wurden das Gel und die Membran zwischen dem Filterpapier und zwei Schwämmen senkrecht in der Blotting-Kammer eingespannt. Der Western Blot erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 100 V.

2.2.3.4 Immunodetektion

Um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in einer 5-prozentigen Milchpulverlösung unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Der Primärantikörper wurde 1:1000 in einer 5-prozentigen Milchlösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen, sodass die Reste des überschüssigen Antikörpers entfernt wurden. Die Membran wurde für 1 h mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der in der 5-prozentigen Milchlösung 1:2500 verdünnt wurde, behandelt. Auch hierbei schloss sich ein dreimaliges Waschen mit TBST an. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. 1 ml der ECL-Lösung wurde vorsichtig auf der Membran verteilt, sodass in Interaktion mit der Meerrettichperoxidase Chemolumineszenz erzeugt wurde. Dies konnte im *ChemiDoc Touch Imaging System* nachgewiesen und bildlich festgehalten werden. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

2.2.4 DNA- und RNA-Arbeitstechniken

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Nach der Zellernte wurde die RNA mithilfe des Kits *NucleoSpin[®]RNA* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerprotokoll isoliert. Für eine höhere RNA-Konzentration wurde die RNA in 30 statt der angegebenen 60 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.4.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zum Vereinheitlichen der nachfolgenden Experimente musste die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Hierzu wurde ein Spektralphotometer verwendet. Es misst die optische Dichte (OD) der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gegen den Referenzwert von Wasser. Eine Extinktion von 1 entspricht einer RNA-

Konzentration von 40 µg/ml und einer DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm Wellenlänge aufweisen, lässt sich aus dem Quotienten von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ auf die Reinheit der Probe schließen. Das optimale Verhältnis für RNA-Proben liegt bei 1,7 bis 2,0. DNA-Proben wurden bei Werten zwischen 1,6 und 2,0 als rein betrachtet.

2.2.4.3 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde mittels Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet und ein Ansatz nach Tabelle 2.9 vorbereitet. Anschließend wurden 1000 ng der RNA mit dem Reagenz gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 2.9: Ansatz der Reversen Transkription

Reagenz	Menge in µl
ReactionBuffer (5x)	4
dNTPs (10 mM)	2
OligodT ₁₈ Primer	1
M-MuLV Reverse Transkriptase	0,5
Nuklease-freies Wasser	2,5
Insgesamt	10

Der Ansatz inkubierte in einem Thermozykler für 1 h bei 37 °C. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben anschließend für 5 min auf 72 °C erhitzt.

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das dazugegebene Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Doppelsträngen der DNA und absorbiert UV-Licht. Zur Darstellung wurde ein UV-Dokumentationsgerät genutzt. Nachdem die DNA-Proben mit einem DNA-Gel-Ladefarbstoff gemischt wurden, wurden sie in die Taschen des Agarosegels pipettiert und eine Spannung von 120 V angelegt. Abhängig von ihrer Größe wanderten die negativ geladenen Fragmente unterschiedlich schnell in Richtung Anode. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde zusätzlich ein Längenmarker aufgetragen.

2.2.4.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zum Amplifizieren spezifischer Gensequenzen wurde die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) genutzt. Die Methode lässt sich grundsätzlich in drei Schritte gliedern – die Denaturierung zur Trennung des Doppelstrangs, die Primeranlagerung und die Elongation zum Auffüllen der fehlenden Nukleotide. Nach einmaligem Durchlaufen verdoppelt sich die DNA-Menge. 1 µl cDNA wurde mit je 0,6 µl Forward- und Reverse-Primer und 7,8 µl Wasser gemischt. Anschließend wurden 10 µl des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* hinzugegeben, welcher in die DNA interkaliert. Entsprechend der DNA-Menge nahm auch die Fluoreszenz zu, was mit dem *T100 Thermal Cycler* quantifiziert werden konnte. Als Haushaltsgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Um Pipettierfehler auszuschließen, wurden für jede Probe drei biologische

Replikate und technische Duplikate vorbereitet. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurde zusätzlich eine Wasserkontrolle genutzt. Tabelle 2.10 stellt schematisch die Reaktionen der qPCR im Thermozykler dar.

Tabelle 2.10: Programm der qPCR

Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1 x	95 °C	30 s	Denaturierung
40 x	95 °C	10 s	
	T _{Hybridisierung}	30 s	<i>Annealing</i>
	72 °C	30 s	Elongation
1 x	95 °C	1 min	Denaturierung
1 x	55 °C	1 min	<i>Melting Curve</i>
80 x	55 °C + (0,5 x Zyklus)	10 s	

2.2.5 Funktionelle Untersuchungen

2.2.5.1 β -Galactosidase Assay

Die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase ist eine lysosomale Hydrolase und gilt als Marker für zelluläre Seneszenz. In nicht-seneszenten Zellen ist die β -Galactosidase bei einem pH-Wert von 4 aktiv. Dagegen kann in seneszenten Zellen auch bei einem pH-Wert von 6 eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Modulation des pH-Wertes ermöglicht daher eine Aussage über die Aktivität der β -Galactosidase (Itahana et al., 2007). Dazu wurde das *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling, Frankfurt) verwendet. Die Proben wurden nach dem Protokoll des Herstellers aufbereitet. Je höher die Enzymaktivität in der jeweiligen Probe war, desto stärker färbten sich die Zellen blau. Der Farbumschlag konnte unter dem Lichtmikroskop dargestellt und verglichen werden.

2.2.5.2 Scratch Assay

Zur Messung des Migrationspotentials wurden die Zellen in einer 6-well-Kulturplatte mit Plastikeinsätzen ausgesät. Die Plastikeinsätze, unter denen keine Zellen anwachsen konnten, wurden am folgenden Tag entfernt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und zusätzlich 1 μ l Proliferationshemmer hinzugegeben. Nach einem definierten Zeitintervall konnte mikroskopisch festgehalten werden, wie schnell die Zellen migrierten, um die entstandenen Aussparungen zu schließen. Mittels des Programms *ImageJ* wurden die Größe der Aussparungen gemessen und verglichen.

2.2.5.3 XTT-Assay

Das *XTT Cell Proliferation Assay Kit* (Trevigen, Gaithersburg) wurde genutzt, um die Zellproliferation quantifizieren zu können. Es wurden je 10 000 Zellen für die drei Messpunkte 24 h, 48 h und 72 h ausgesät. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde eine Lösung aus 100 µl Medium, 50 µl XTT Reagenz und 1 µl XTT Aktivator hinzugegeben. 2 h später wurde die Absorption der Überstände bei 490 nm mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes gemessen. Daraus konnte abgeleitet werden, wie viel Tetrazoliumsalz von den Zellen umgesetzt wurde. Die Reduktion des Salzes war umso größer, je mehr stoffwechselaktive Zellen anwuchsen.

2.2.5.4 Boyden-Chamber-Assay

Um die Invasivität der Zelllinien beurteilen zu können, wurden Boyden-Chamber-Assays durchgeführt. Für den Aufbau des Assays wurde eine 6-well-Zellkulturplatte mit Einsätzen verwendet. Die Böden der Einsätze bestanden aus einer Polykarbonatmembran mit 8 µm Porengröße. Auf die Membran wurden 400 µl eines mit FBS-freiem Medium verdünnten Matrigels aufgetragen. Das Matrigel musste anschließend für 1 h bei 37 °C aushärten. Diese Kombination aus Membran und Matrigel stellte das experimentelle Pendant zur Basalmembran dar, die als Hindernis der Epithelial-mesenchymalen Transition gilt.

Während unter den Einsatz 30 % FBS-haltiges Medium gegeben wurde, wurde auf das Matrigel ein Ansatz aus 100 000 Zellen und 3 % FBS-haltigem Medium pipettiert. Der resultierende Konzentrationsgradient der FBS-haltigen Medien diente als chemotaktischer Reiz zur Migration der Zellen in das Kompartiment mit höherer Nährstoffkonzentration. Nur invasiven Zellen war es vorbehalten, das Matrigel zu verdauen und die porenhaltige Membran zu überwinden. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde die Membran mithilfe eines Wattetupfers vom Matrigel befreit. Anschließend wurde die Membran mit einer Lösung aus 1 ml PBS und 1 µl DAPI gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff markierte die DNA aller Zellen, die durch das Matrigel und die Membran migrierten. Am Fluoreszenzmikroskop wurden Fotos von repräsentativen Bildausschnitten gemacht und die Anzahl migrierter Zellen mit dem Programm *ImageJ* ermittelt. Daraus abgeleitet ließ sich die relative Invasivität der unterschiedlichen Zelllinien vergleichen.

3 Ergebnisse

3.1 Wahl der Zelllinien

Im Rahmen der Arbeit sollten Zelllinien des Harnblasenkarzinoms verwendet werden, die sich in ihrer Invasivität und Metastasierungsfähigkeit unterscheiden. So konnte nachfolgend dargestellt werden, inwiefern der Effekt der Progerin-Expression von der Invasivität der verwendeten Zelllinien abhängt. Daneben sollten die Zelllinien in der Expression der Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4 variieren, um untersuchen zu können, ob die unterschiedliche Stammzellkapazität der Zelllinien die Ergebnisse beeinflusst. Daher wurde in einem ersten Screening die mRNA-Expression von Sox-2 und Oct-4 der drei Zelllinien RT-4, T24 und UM-UC-3 verglichen.

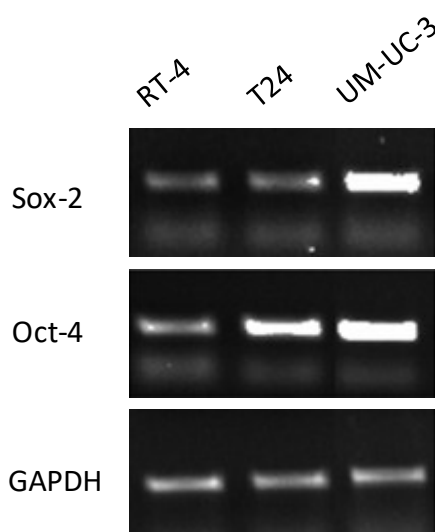


Abbildung 3.1: Screening der Expression von Stammzellmarkern

Die Gelelektrophorese zeigt die mRNA-Expression der Stammzellmarker Sox-2 und Oct-4 in drei verschiedenen Zelllinien des Harnblasenkarzinoms. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die Abbildung 3.1 stellt die Expression der beiden Yamanaka-Faktoren in den drei Harnblasenkarzinomzelllinien dar. Die Zelllinie RT-4 ist eine wenig aggressive Zelllinie mit einem epithelialen Erscheinungsbild und dichtem Zellverband (vgl. Abbildung 3.7). Die Transkript-Level von Sox-2 und Oct-4 waren im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien nur gering. Dagegen ist die Zelllinie T24 im Zellverband gelockerter und wies insbesondere für Oct-4 eine höhere mRNA-Expression auf. Das höchste mRNA-Level der Yamanaka-Faktoren wies die Zelllinie UM-UC-3 auf. Die Zellen erscheinen langgestreckt und spindelförmig. Dieser mesenchymale Phänotyp ist typisch für invasive Zelllinien, die die EMT vollzogen haben und durch ihre Loslösung vom Zellverband zur Migration und Metastasierung befähigt sind (Saitoh, 2018). Dies deutete darauf hin, dass eine hohe Expression der Yamanaka-Faktoren eng mit der Ausbildung des mesenchymalen Phänotyps und dem Metastasierungspotential der verwendeten Harnblasenkarzinomzelllinien korreliert.

Weiterhin ließ sich daraus ableiten, dass die drei Zelllinien die Vorgaben, sich in Aggressivität und Stammzellkapazität zu unterscheiden, erfüllten und sich damit für die nachfolgenden Versuche eigneten.

3.2 Charakterisierung der transduzierten Gesamtpopulation

Die Charakterisierung der Zelllinien, welche mit den zellunspezifischen Plasmiden transduziert werden sollten, gliederte sich in vier Arbeitsschritte. Im ersten Arbeitsschritt wurden Plasmide zur Expression von Lamin A/C und Progerin kloniert. Mit den hergestellten Plasmiden wurde überprüft, ob die Expression von Progerin oder Lamin A/C zelluläre Seneszenz induziert. Anschließend wurden der Einfluss auf das Stammzellreservoir und Veränderungen auf die Metastasierungskapazität untersucht.

3.2.1 Etablierung von Zelllinien mit stabiler Expression von Lamin A/C und Progerin

Zur lentiviralen Transduktion der Zelllinien wurden zunächst zellunspezifische Plasmide kloniert. Anschließend wurde die Expression der Transgene fluoreszenzmikroskopisch und mittels Western Blot nachgewiesen.

3.2.1.1 Klonierung der zellunspezifischen Plasmide

Als Ausgangsplasmid zur Herstellung der zellunspezifischen Plasmide wurde mCMVp-dsCopGFP-PURO verwendet. Dieses Plasmid wurde zudem in den folgenden Experimenten als Kontrollvektor genutzt. Zunächst wurde das Plasmid mithilfe des Restriktionsenzym *BsrGI* linearisiert. Die cDNA der Transgene GFP-LMNA und GFP-Progerin wurden mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *BmgBI* aus pBABE-Plasmiden herausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetragen und ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 3.2).

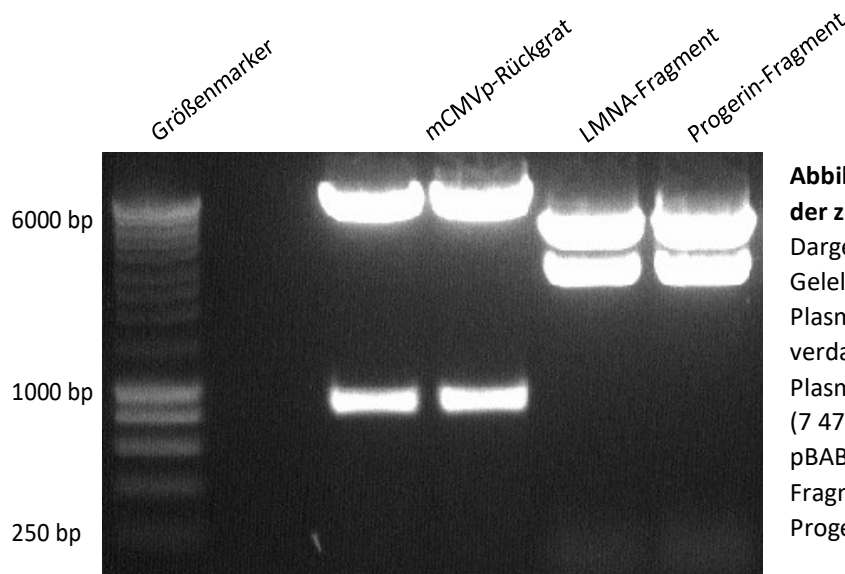
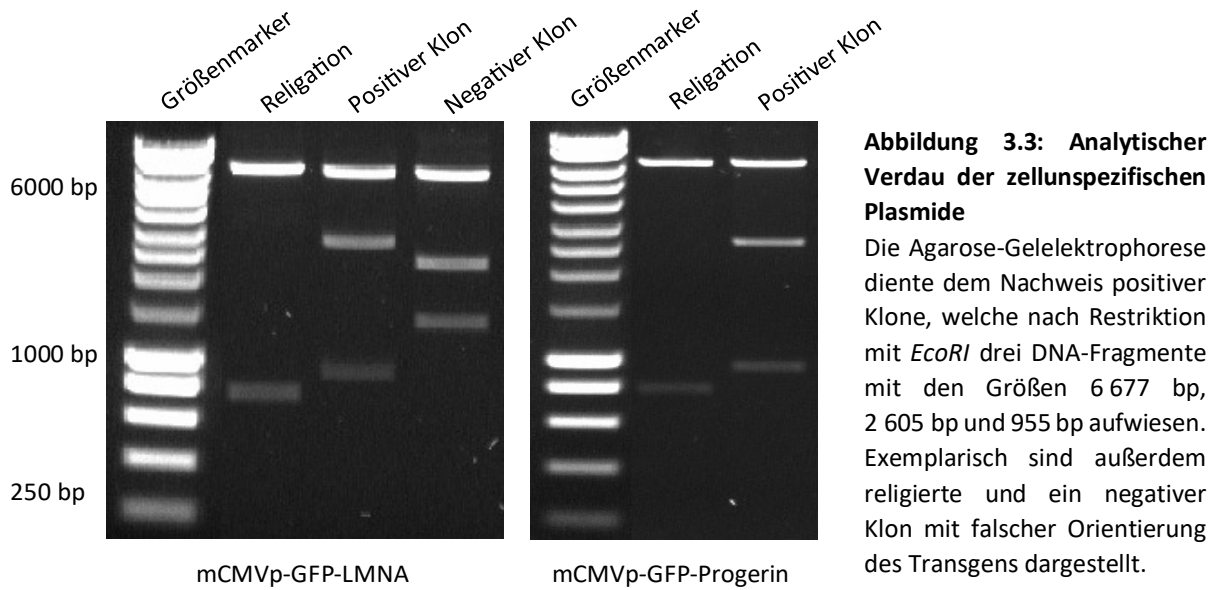


Abbildung 3.2: Restriktionsverdau der zellunspezifischen Plasmide

Dargestellt ist eine Agarose-Gelelektrophorese, nachdem die Plasmide mittels Restriktionsenzymen verdaut wurden. Vom mCMVp-Plasmid wurde das obere Fragment (7 476 bp) weiterverwendet. Aus den pBABE-Plasmiden wurden die unteren Fragmente (LMNA = 2 909 bp und Progerin = 2 757 bp) isoliert.

Die größenmäßig korrekten Fragmente wurden aufgereinigt und ligiert. Nach erfolgreicher Transformation wurde ein analytischer Kontrollverdau mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt (siehe Abbildung 3.3). Um Mutationen ausschließen zu können, wurden positive Klone im Anschluss sequenziert (siehe Anhang).



3.2.1.2 Nachweis der Transgenexpression

Die korrekt sequenzierten Plasmide wurden anschließend zur lentiviralen Transduktion in den Zelllinien RT-4, T24 und UM-UC-3 verwendet. Nach 96 h Inkubationszeit und einer Zellselektion mit Puromycin (vgl. 2.2.2.2) wurde die Expression von GFP in den Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch überprüft (siehe Abbildung 3.4).

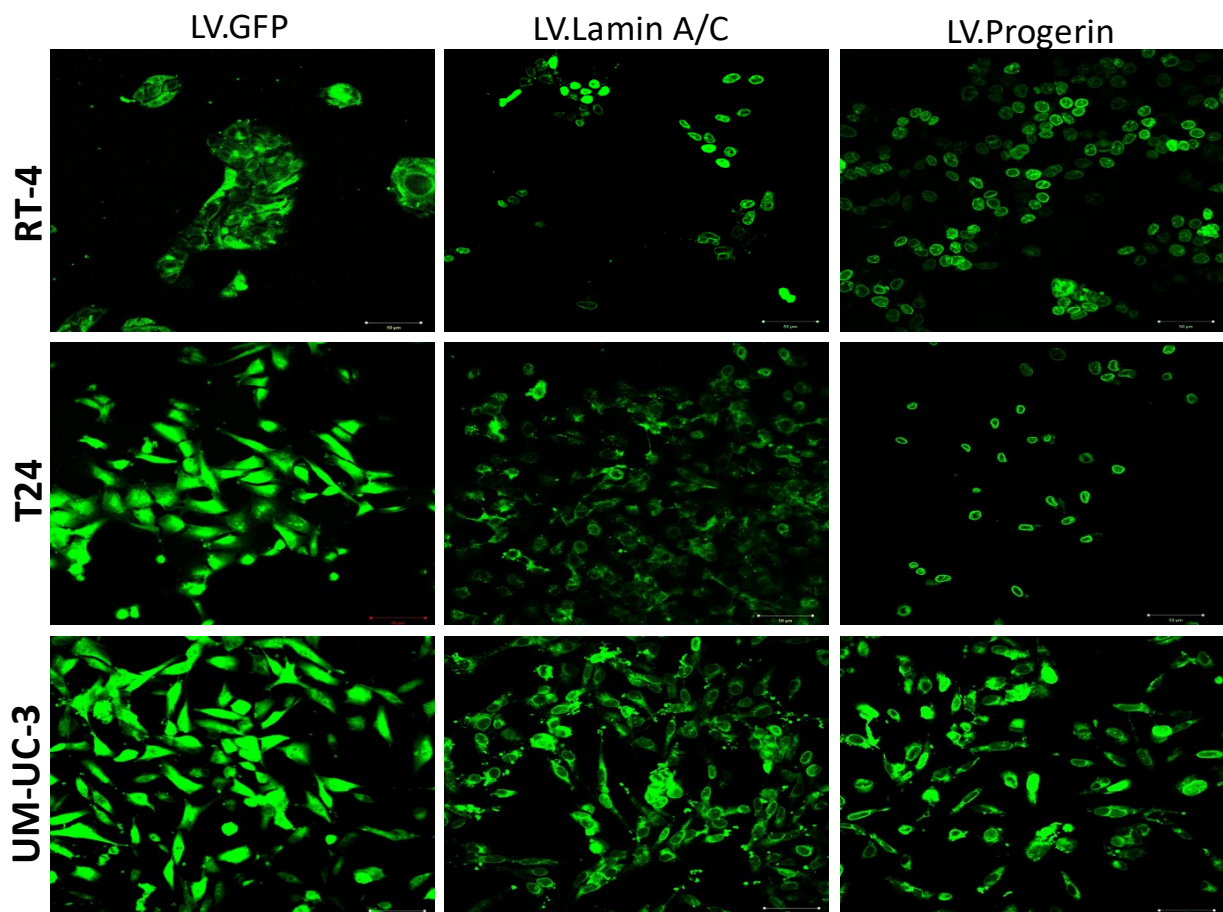


Abbildung 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der GFP-Expression

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass nahezu alle Zellen nach der lentiviralen Transduktion GFP exprimierten. Nach Behandlung mit dem Kontrollvektor LV.GFP erschien das gesamte Zytoplasma in allen drei Zelllinien grün. Dagegen stellte sich das fluoreszenzmikroskopische Signal in den mit LV.Lamin A/C und LV.Progerin transduzierten Zellen vor allem in den Zellkernen dar. Grund dafür ist, dass die GFP-Sequenz der verwendeten Plasmide direkt an die Sequenzen von Lamin A/C bzw. Progerin gekoppelt war (vgl. Abbildung 9.1 und 9.2). Daher wurde das Protein GFP ebenfalls in der Zellkernmembran eingebaut. Die Grünfluoreszenz diente damit indirekt auch als positiver Nachweis für die Expression von Lamin A/C und Progerin in den Zellen.

Zusätzlich wurde die Proteinexpression von Lamin A/C und Progerin mittels Western Blot bestätigt (siehe Abbildung 3.5).

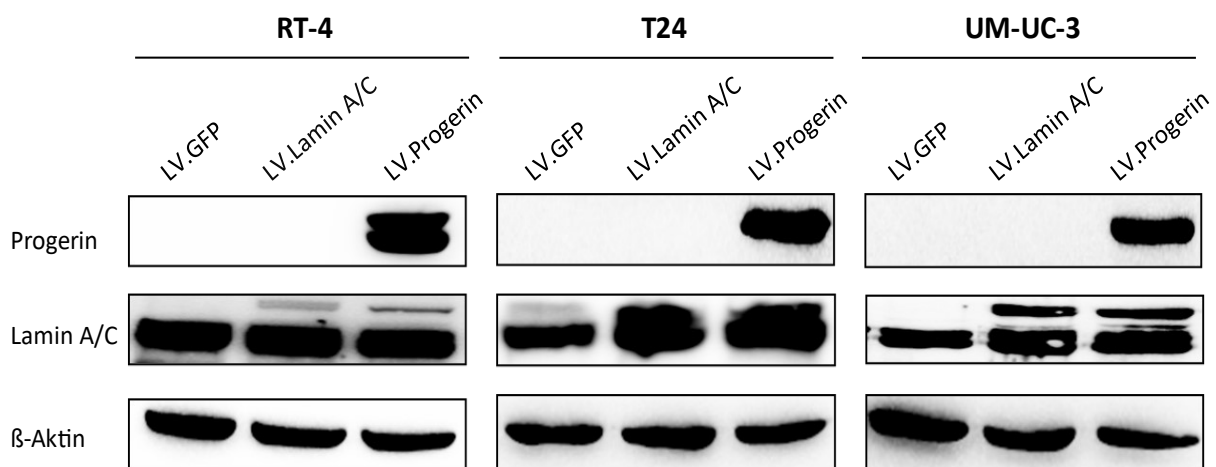


Abbildung 3.5: Nachweis der Expression der Transgene mittels Western Blot

Um die Expression von Lamin A/C und Progerin im Vergleich zur jeweiligen Kontrollzelllinie LV.GFP nachweisen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Auch die Western Blots zeigten, dass nach lentiviraler Transduktion in den drei Zelllinien Lamin A/C und Progerin exprimiert wurden. In allen drei mit LV.Progerin transduzierten Zelllinien ließ sich eine deutliche Progerin-Bande detektieren. Dagegen war in den Zelllysaten der Kontrollzelllinien LV.GFP und LV.Lamin A/C kein Progerin detektierbar.

Für Lamin A/C wurde eine Doppelbande nachgewiesen. Dabei stellte die obere Bande die Isoform Lamin A und die untere die Isoform Lamin C dar. Das Proteinlevel von Lamin C war in allen Zelllinien bereits hoch. Im Gegensatz dazu wurde in der Zelllinie T24-LV.GFP nur eine schwache Bande der Isoform Lamin A detektiert. In den Kontrollzelllinien RT-4-LV.GFP und UM-UC-3-LV.GFP wurde keine Expression von Lamin A nachgewiesen. Nach Überexpression von Lamin A/C und Progerin konnte die Isoform Lamin A dagegen in allen drei Zelllinien dargestellt werden.

3.2.2 Untersuchung zur Induktion der zellulären Seneszenz

Zur Bestimmung der zellulären Seneszenz wurden Western Blots durchgeführt, um auf Proteinebene klassische Seneszenz-Marker darstellen zu können. Weiterhin wurden β -Galactosidase Assays, die als zuverlässigste und Standardmethode zur Detektion zellulärer Seneszenz gelten (Itahana et al., 2007), durchgeführt. Mittels XTT-Assays wurde die Proliferationsfähigkeit der transduzierten Zelllinien ermittelt. Zusätzlich zu den Harnblasenkarzinomzelllinien wurde der mögliche Effekt der Progerin-Expression in karyotypisch normalen Vorhautfibroblasten untersucht.

3.2.2.1 Bestimmung von Seneszenz-Markern auf Proteinebene

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob die Expression von Progerin auf Proteinebene mit einem Anstieg der Seneszenz-Marker einhergeht. Dazu wurden die endogenen Tumorsuppressorproteine p53 und p21 sowie die Apoptoseregulatoren Bax und Bcl-2 mittels geeigneter Antikörper detektiert (siehe Abbildung 3.6).

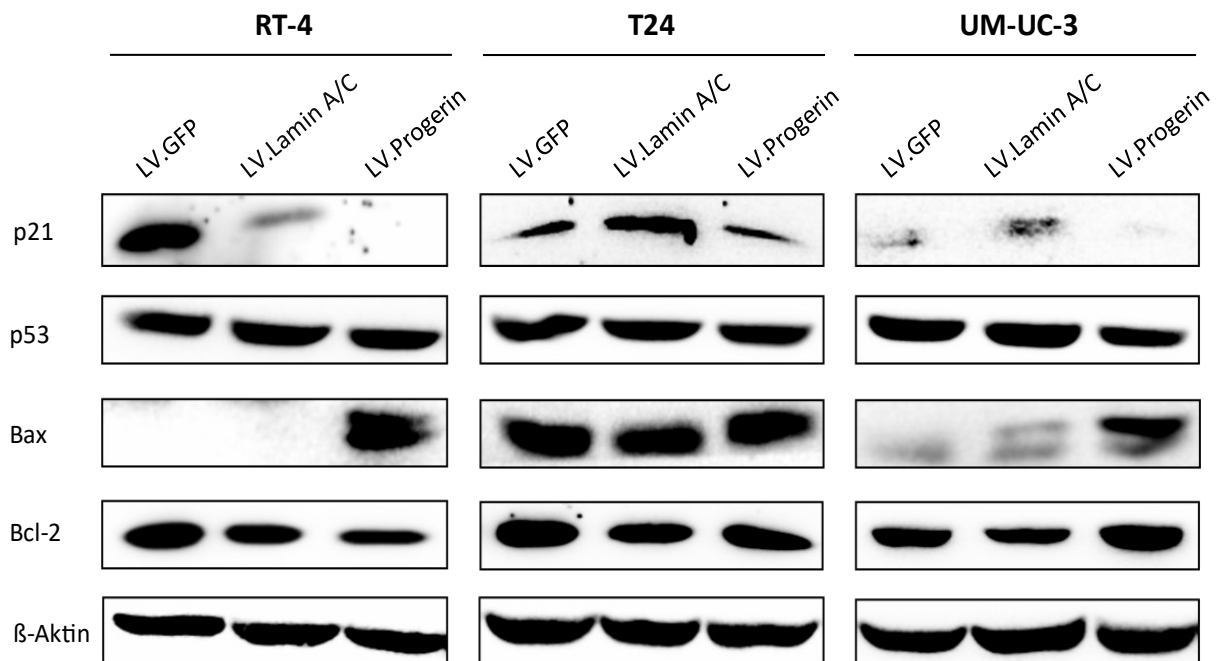


Abbildung 3.6: Bestimmung von Markern zellulärer Seneszenz

Western Blots wurden durchgeführt, um darstellen zu können, ob die Progerin-Expression mit der Expression von Seneszenz-Markern korreliert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Es zeigte sich keine klare Korrelation zwischen der Expression von Progerin und den untersuchten Seneszenz-Markern. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, war die Expression von p53 und Bcl-2 in allen Zelllinien unabhängig vom Transgen gleich hoch. Der Tumorsuppressor p21 wurde generell eher schwach detektiert und stellte sich auch in den Progerin-exprimierenden Zellen nicht stärker dar. Lediglich das pro-apoptotische Protein Bax wurde in den Progerin-exprimierenden RT-4 und UM-UC-3 stärker als in der Kontrolle nachgewiesen. Zusammenfassend wurde auf Proteinebene kein signifikanter Anstieg der Seneszenz-Marker nach Expression von Progerin beobachtet.

3.2.2.2 Aktivitätsmessung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase

Die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase ist ein zentraler Marker der zellulären Seneszenz. Nur in seneszenten Zellen kann bei einem pH-Wert von 6 eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Nach Modulation des pH-Wertes mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling, Frankfurt) färbten sich die Zellen umso stärker blau, je höher die Enzymaktivität war. Anschließend wurde lichtmikroskopisch verglichen, ob der Farbumschlag in Progerin-exprimierenden Zelllinien größer als in den GFP- und Lamin A/C-exprimierenden Zelllinien war. Daraus konnte indirekt geschlossen werden, ob Progerin in den verwendeten Zelllinien Seneszenz induziert. Als Positivkontrolle wurden in jeder Versuchsreihe unbehandelte dermale Fibroblasten mitgeführt (siehe Abbildung 3.7).

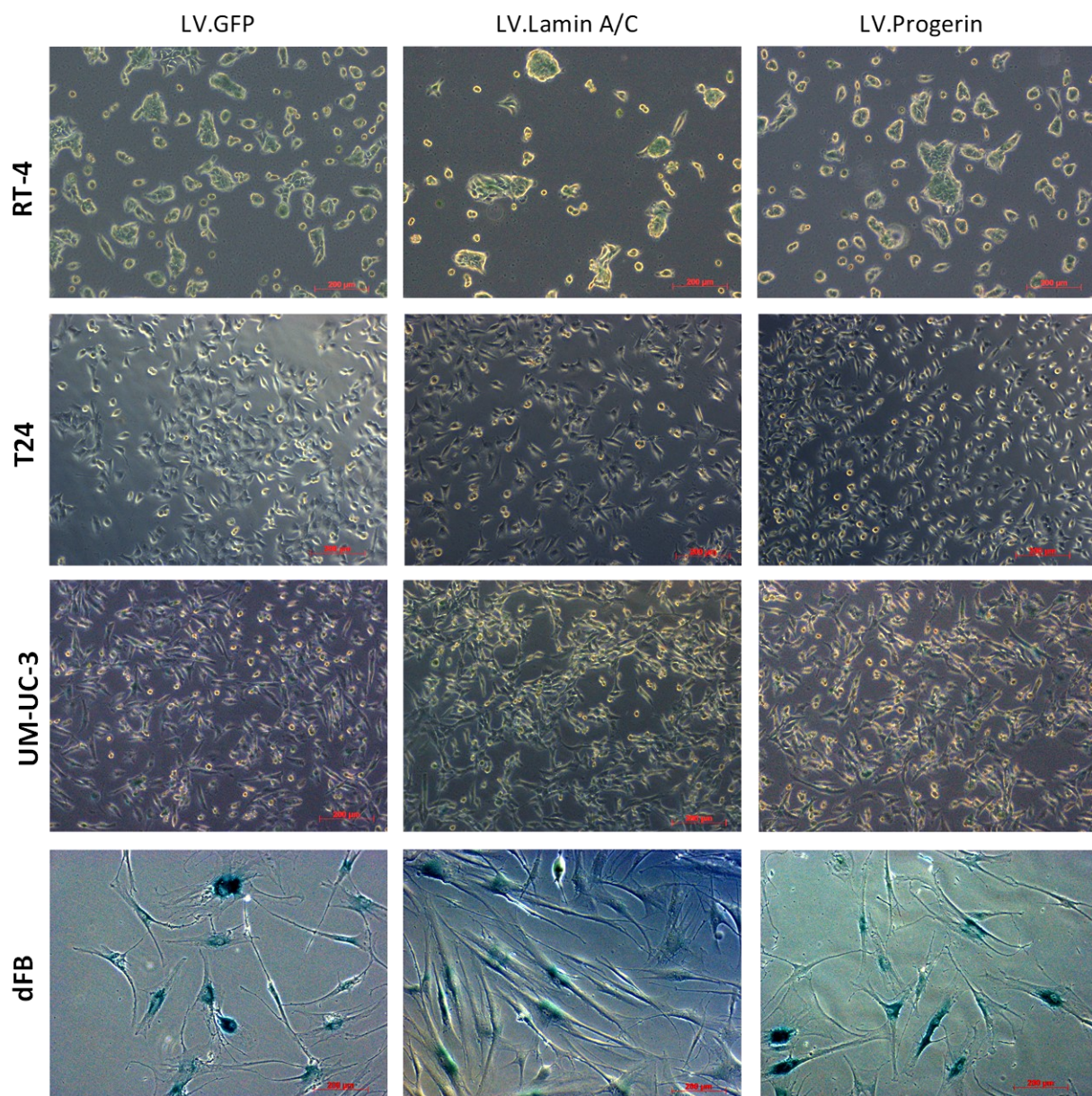


Abbildung 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit

Je höher die Enzymaktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase war, desto stärker blau stellten sich die Zellen dar. Dermale Fibroblasten in hoher Passagezahl dienten als Positivkontrolle.

Innerhalb einer Zelllinie ließen sich keine signifikanten Farbunterschiede zwischen den überexprimierten Transgenen feststellen. In allen Zelllinien wiesen die Progerin-exprimierenden Zellen eine ähnlich schwache Färbung wie die entsprechenden Zellen mit GFP- bzw. Lamin A/C-Überexpression auf. Weiterhin schien die Enzymaktivität der β -Galactosidase unabhängig von der Invasivität der Zelllinie zu sein. So wiesen die Proben der wenig invasiven Zelllinie RT-4 keine schwächere oder stärkere Färbung als die invasiveren Zelllinien T24 und UM-UC-3 auf.

Im Gegensatz dazu zeigten die dermalen Fibroblasten eine deutliche Blaufärbung, was darauf hinwies, dass die dermalen Fibroblasten in hoher Passagezahl eine erhöhte Enzymaktivität der β -Galactosidase besaßen. Dies bestätigte die korrekte Durchführung des Experiments.

3.2.2.3 Messung der Proliferationskapazität

Der Zellzyklusarrest ist charakteristisch für die zelluläre Seneszenz (Herranz & Gil, 2018). Daher wurden XTT-Assays durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Proliferationskapazität der Progerin-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien sinkt. Der Umsatz des Tetrazoliumsalzes diente als Maß für den Anteil stoffwechselaktiver Zellen (siehe Abbildung 3.8).

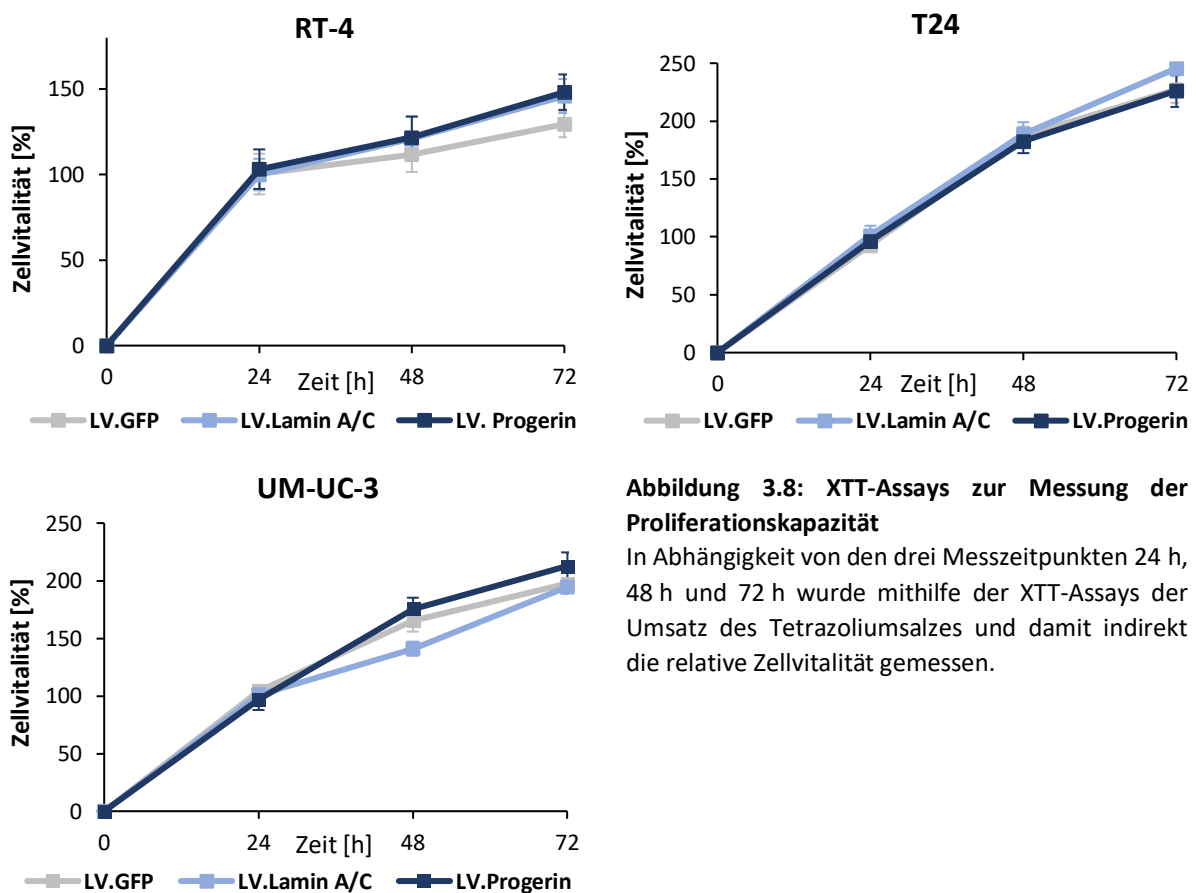


Abbildung 3.8: XTT-Assays zur Messung der Proliferationskapazität

In Abhängigkeit von den drei Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h wurde mithilfe der XTT-Assays der Umsatz des Tetrazoliumsalzes und damit indirekt die relative Zellvitalität gemessen.

Im Vergleich zu den GFP-exprimierenden Zelllinien konnte in keiner der Zelllinien mit Progerin-Expression eine signifikant verminderte proliferative Aktivität nachgewiesen werden ($p \geq 0,05$). Auch die Zelllinien mit einer Lamin A/C-Überexpression zeigten gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität ($p \geq 0,05$).

Repräsentativ betrug die relative Zellvitalität von T24 nach 24 h bei LV.GFP 93 %, bei LV.Lamin A/C 101 % und bei LV.Progerin 96 %. Nach 48 h stieg die Proliferationsrate bei LV.GFP auf 187 %, bei LV.Lamin A/C auf 189 % und bei LV.Progerin auf 183 %. Zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 72 h betrug die relative Vitalität bei LV.GFP 227 %, bei LV.Lamin A/C 246 % und bei LV.Progerin 226 %. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass weder Lamin A/C noch Progerin die Proliferation der Zelllinie T24 signifikant verändert hat ($p \geq 0,05$). Dies traf gleichermaßen für die Zelllinien RT-4 und UM-UC-3 zu. Vermeintlich größere Abweichungen, wie zum Beispiel nach 72 h für RT-4 LV.GFP (129 %) im Vergleich zu RT-4 LV.Lamin A/C (146 %) bzw. RT-4 LV.Progerin (148 %), waren in keiner der verwendeten Zelllinien signifikant ($p \geq 0,05$) und sind wahrscheinlich auf Pipettierfehler zurückzuführen. Zusammenfassend konnte daher mit den XTT-Assays gezeigt werden, dass die Progerin-Expression die Proliferation weder in der wenig invasiven Zelllinie RT-4 noch in den invasiveren Zelllinien T24 und UM-UC-3 verringerte und kein Zellzyklusarrest induziert wurde.

3.2.2.4 Bestimmung der Seneszenz-Marker in Progerin-exprimierenden Fibroblasten

Die drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente legten nahe, dass durch die Expression von Progerin in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms keine zelluläre Seneszenz induziert wurde. Um feststellen zu können, ob dieser Effekt krebszellabhängig ist und Progerin in anderen Zellen funktionell ist, d. h. *in vitro* dennoch die physiologische Alterung beschleunigen kann, wurden die Experimente mit karyotypisch normalen Vorhautfibroblasten wiederholt. Hierzu wurden VH6-Zellen mit dem Progerin-Expressionsplasmid transduziert (siehe Abbildung 3.9).

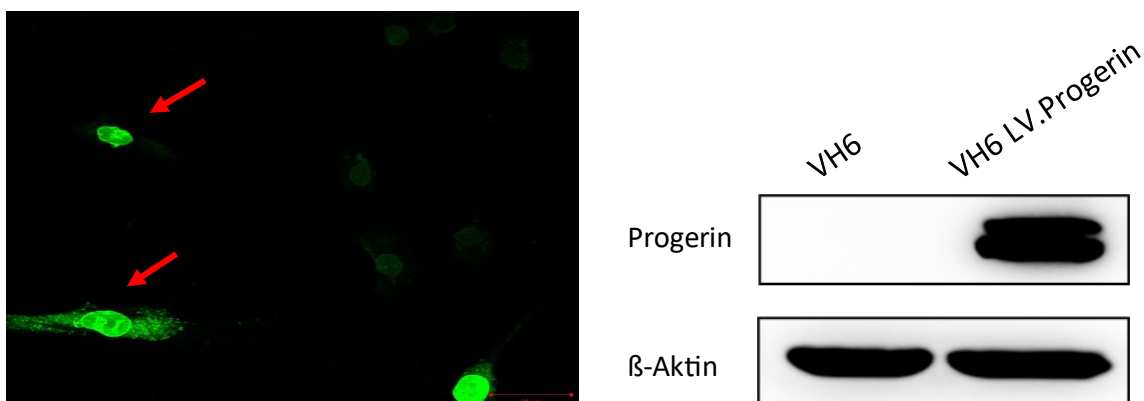


Abbildung 3.9: Nachweis der Progerin-Expression in VH6

Links ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zum Nachweis von GFP dargestellt. Rote Pfeile zeigen auf dysmorphe Zellkerne in Folge der Progerin-Expression. Rechts ist ein Western Blot zum Nachweis der Progerin-Expression abgebildet. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Expression von GFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Dabei markieren die roten Pfeile im Bild zwei dysmorphe Zellkerne, was den funktionellen Einfluss der Progerin-Expression auf die Zellkernmembran bestätigte. Auch der nachfolgend durchgeführte Western Blot demonstrierte den Transduktionserfolg. Während in der unbehandelten Kontrolle keine Progerin-Expression nachgewiesen werden konnte, war in VH6 LV.Progerin eine deutliche Progerinbande erkennbar. Anschließend wurden Western Blots durchgeführt, um die bekannten Marker für zelluläre Seneszenz auf Proteinebene bestimmen zu können. Die detektierten Proteinbanden sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

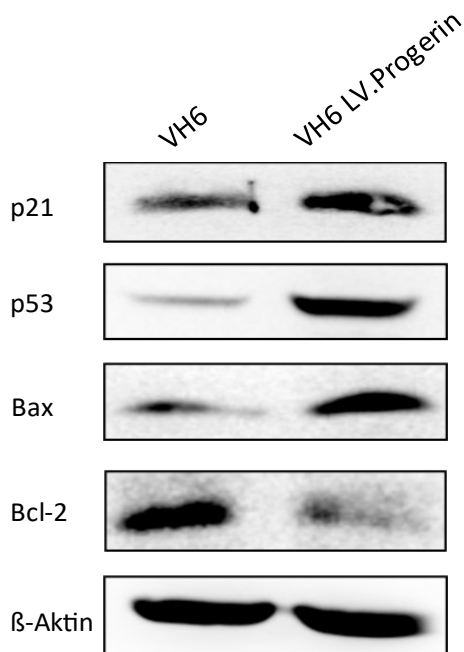


Abbildung 3.10: Expression der Seneszenz-Marker in VH6

Dargestellt sind die detektierten Proteinbanden der Seneszenz-Marker in VH6 LV.Progerin im Vergleich zur nativen Zelllinie. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Entgegen der Ergebnisse in den Harnblasenkarzinomzelllinien zeigte sich in den Progerin-exprimierenden Fibroblasten ein Anstieg der Seneszenz-Marker. Die Tumorsuppressoren p21 und p53 wurden in der parentalen Kontrolle nur schwach detektiert. Dagegen kam es zum deutlichen Anstieg beider Proteine in Progerin-exprimierenden Fibroblasten. Auch der proapoptotische Faktor Bax wurde in den Progerin-positiven Zellen signifikant stärker exprimiert. Während das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in den parentalen Fibroblasten deutlich nachweisbar war, wurde es nach Expression von Progerin nur schwach detektiert.

Um diese Tendenz bestätigen zu können, wurde nachfolgend die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase zwischen der unbehandelten Kontrolle und den Progerin-exprimierenden VH6 verglichen (siehe Abbildung 3.11).

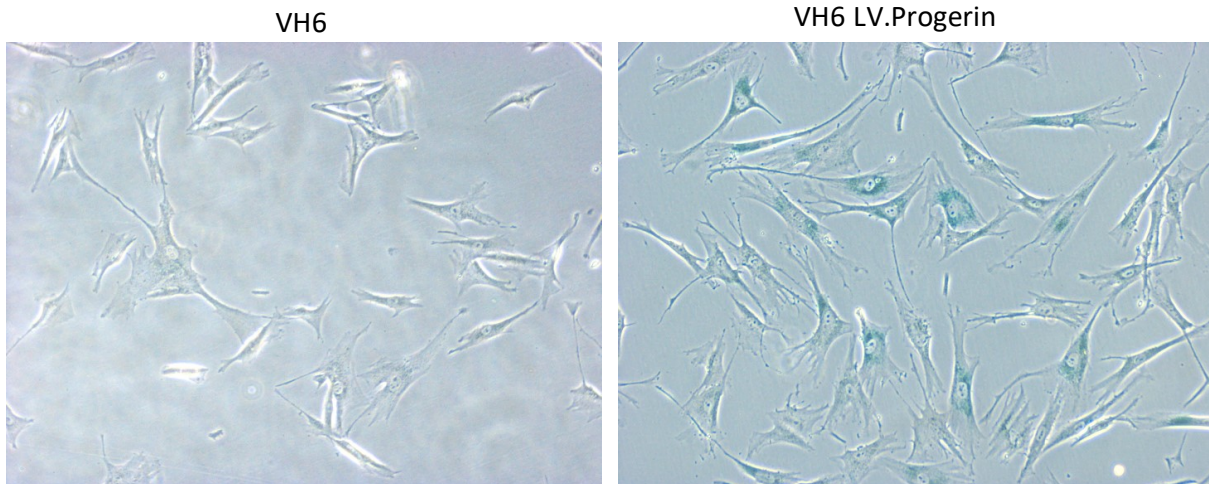


Abbildung 3.11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie VH6 nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit

Die Zellen stellten sich umso stärker blau dar, je höher die Enzymaktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase war.

In den unbehandelten Zellen ließ sich kein blauer Farbumschlag nachweisen. Dagegen stellte sich das Zytoplasma in LV.Progerin-transduzierten Zellen mehrheitlich blau dar. Das Experiment wies darauf hin, dass die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase in den Progerin-exprimierenden Fibroblasten erhöht war.

Abschließend wurde die proliferative Aktivität der Fibroblasten mittels XTT-Assay gemessen (siehe Abbildung 3.12).

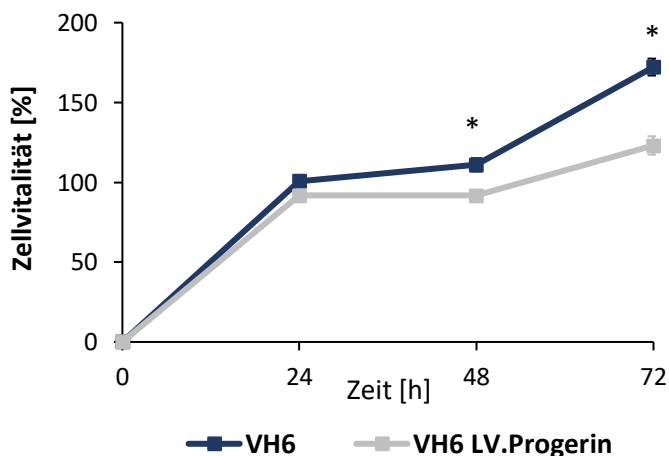


Abbildung 3.12: XTT-Assays zur Messung der Proliferationskapazität von Fibroblasten

In Abhängigkeit von den drei Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h wurde mithilfe der XTT-Assays der Umsatz des Tetrazoliumsalses und damit indirekt die relative Zellvitalität gemessen. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet.

Anders als in den Harnblasenkarzinomzellen führte die Progerin-Expression in den Fibroblasten zu einer verminderten Zellproliferation. Die Zellvitalität betrug nach 48 h in der nativen Zelllinie 111 %, während die Progerin-exprimierenden Fibroblasten nur eine Zellvitalität von 92 % aufwiesen. Nach 72 h ließ sich der signifikanteste Unterschied im Wachstum messen ($p \leq 0,05$). Die Zellvitalität reduzierte sich nach drei Tagen um fast 50 %. Dies deutete darauf hin, dass die Progerin-Expression in karyotypisch normalen Zellen einen Zellzyklusarrest induzieren konnte.

3.2.3 Untersuchung zum Einfluss auf die Stammzellkapazität

Die Überexpression von Progerin korrelierte in den Harnblasenkarzinomzelllinien nicht mit einem erhöhten Nachweis der verwendeten Seneszenz-Marker. Dagegen zeigten sich in den Progerin-exprimierenden Fibroblasten Zeichen zellulärer Seneszenz. Die zelluläre Seneszenz ist eng mit der Stammzellfähigkeit verbunden (Triana-Martínez et al., 2020) und kann mittels SASP ein Gleichgewicht zwischen gealterten Zellen und Stammzellen aufrechterhalten (Ritschka et al., 2017). Daher sollte untersucht werden, ob auch der Anteil Stammzellmarker-positiver Tumorzellen, d. h. das Stammzellreservoir der Harnblasenkarzinomzelllinien, durch die Progerin-Expression unbeeinflusst bleibt. Hierzu wurde die Expression der Yamanaka-Faktoren Sox-2, Oct-4 und c-Myc sowie der klassischen Stammzellmarker CD133 und Nanog auf RNA- und Proteinebene überprüft. Zur besseren Übersicht ist die gesamte Abbildung 3.13 auf der folgenden Seite dargestellt.

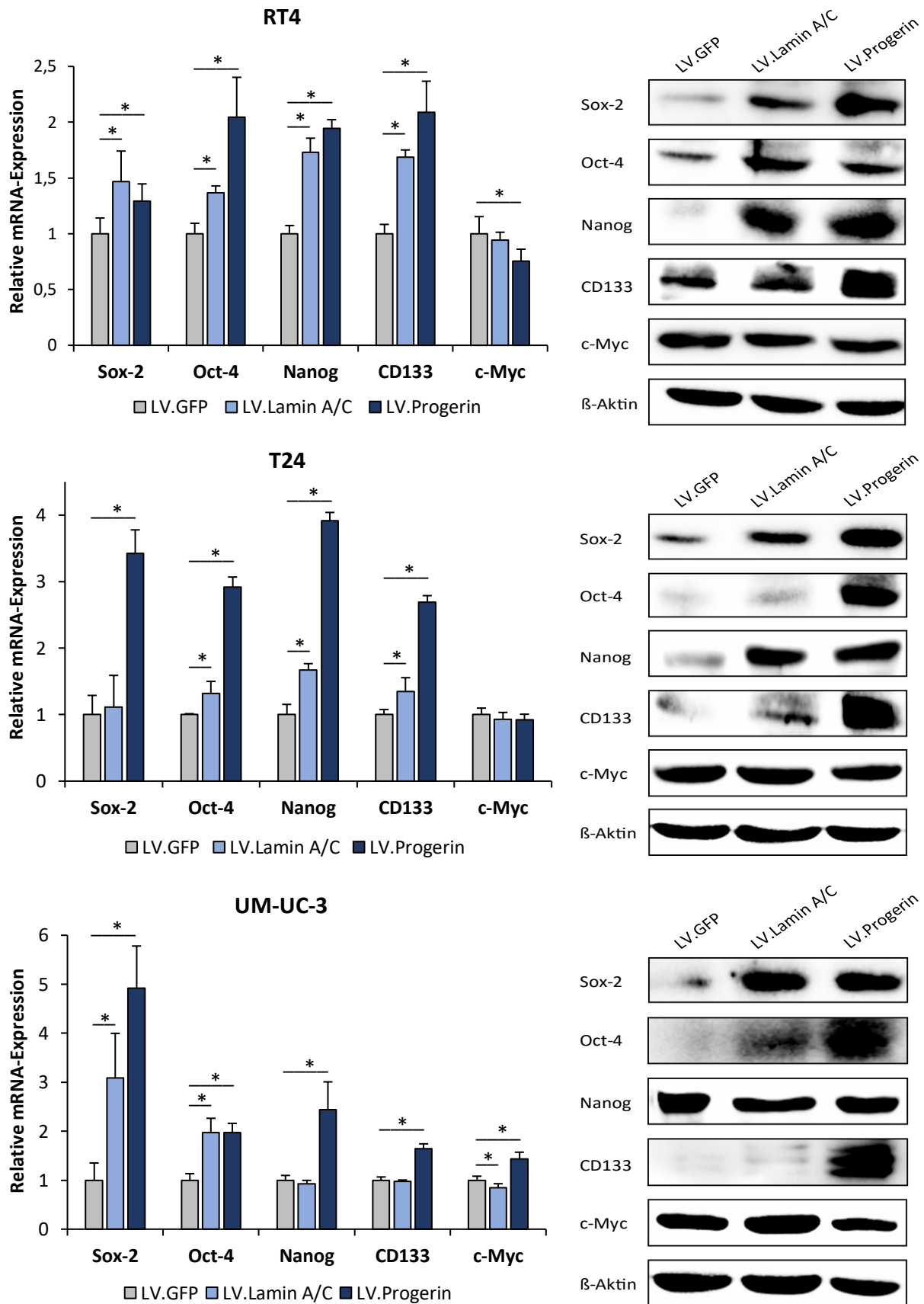


Abbildung 3.13: Bestimmung der Expression von Stammzellmarkern auf RNA- und Proteinebene

Links ist die relative mRNA-Expression der Stammzellmarker nach Durchführung von qPCRs grafisch dargestellt. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet. Rechts sind die dazugehörigen detektierten Proteinbanden nach Durchführung von Western Blots abgebildet. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Im Allgemeinen stellte sich in allen Zelllinien ein dreistufiger Trend der relativen mRNA-Expression dar. Exemplarisch betrug die relative mRNA-Expression der Stammzellmarker Sox-2, Oct-4, Nanog und CD133 von RT-4 LV.Lamin A/C im Vergleich zu RT-4 LV.GFP ungefähr 1,5. Dieser Unterschied war für alle vier Gene statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). In der Progerin-exprimierenden Zelllinie verdoppelte sich die mRNA-Expression der Marker Oct-4, Nanog und CD133 im Vergleich zur Kontrollzelllinie sogar. Diese Gefälle zeigten T24 und UM-UC-3 ebenfalls. In diesen Zelllinien war die relative mRNA-Expression von Sox-2, Oct-4, Nanog und CD133 in den Progerin-exprimierenden Zellen signifikant stärker als in der jeweiligen Kontrolle LV.GFP ($p \leq 0,05$).

Die Western Blots bestätigten diese Ergebnisse auf Proteinebene. So wurde Sox-2, das in den Kontrollzelllinien nur schwach detektierbar war, in den Lamin A/C- bzw. Progerin-exprimierenden Harnblasenkrebszellen unabhängig von ihrem Aggressivitätsgrad deutlich exprimiert. Gleichermäßen korrelierte die Expression von Progerin auch mit einer gesteigerten Expression von Oct-4, Nanog und CD133. Die Überexpression von Lamin A/C schien die Proteinexpression der Stammzellmarker teilweise zu beeinflussen. Während beispielsweise die Proteinbanden für CD133 keine deutlichen Veränderungen gegenüber LV.GFP zeigten, wurde Nanog in RT-4 und T24 LV.Lamin A/C gegenüber der Kontrolle signifikant stärker exprimiert.

Der Yamanaka-Faktor c-Myc stellte sich unabhängig von den anderen Stammzellmarkern dar. Es ließ sich nur für UM-UC-3 LV.Progerin eine geringe Steigerung der relativen mRNA-Expression erkennen. Dagegen zeigten sich innerhalb von T24 keine signifikanten Veränderungen und innerhalb von RT-4 nach Progerin-Expression eine Verminderung der mRNA-Expression von c-Myc. In den Western Blots konnten keine klaren Unterschiede in den Zelllinien detektiert werden. Das Proteinlevel von c-Myc schien von der Überexpression der drei Transgene unbeeinflusst zu bleiben.

Zusammenfassend war entgegen der Ausgangshypothese, dass Progerin das Stammzellreservoir erschöpft, weder in den qPCRs noch in den Western Blots eine allgemein erniedrigte Stammzellkapazität in Folge der Progerin-Expression nachweisbar. Vielmehr war die Expression der Stammzellmarker in den Progerin-exprimierenden Zelllinien sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erhöht. Auch die mit Lamin A/C überexprimierten Zelllinien zeigten partiell einen Anstieg der Stammzellmarker.

3.2.4 Untersuchung zum Einfluss auf die Metastasierungskapazität

Wie im Kapitel 1.2.1 beschrieben, gelten Krebsstammzellen als zentrale Ursache für Tumorprogression, Therapieresistenz und Rezidive. Daher lag es nahe, dass die gesteigerte Expression der Stammzellmarker in den Progerin-exprimierenden Zellen auch mit einer erhöhten Metastasierungskapazität einhergeht. Dies wurde auf Proteinebene mithilfe von Western Blots und auf funktioneller Ebene mittels Scratch und Boyden-Chamber Assays geprüft.

3.2.4.1 Bestimmung von EMT-Markern auf Proteinebene

Die Durchführung von Western Blots ermöglichte es, die Proteinexpression bekannter EMT-Marker, die die Invasivität der Tumorzellen und damit die Metastasierung fördern (Diepenbruck & Christofori, 2016), bestimmen zu können. Dabei wurden unter anderem die Adhäsionsproteine E- bzw. N-Cadherin untersucht. Während die Expression von E-Cadherin eine epitheliale Differenzierung vermittelt, ist die Expression von N-Cadherin eng mit der EMT verbunden. Des Weiteren wurden die Vimentin-Level bestimmt, da dieses Protein die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps unterstützt (Zeisberg & Neilson, 2009). Neben diesen klassischen EMT-Markern wurde zusätzlich das Proteinlevel von Slug und Snail1 untersucht. Diese Proteine sind Transkriptionsfaktoren bei der EMT und hemmen die Expression von E-Cadherin (Barrallo-Gimeno & Nieto, 2005). Die Abbildung 3.14 stellt die detektierten Proteinbanden dar.

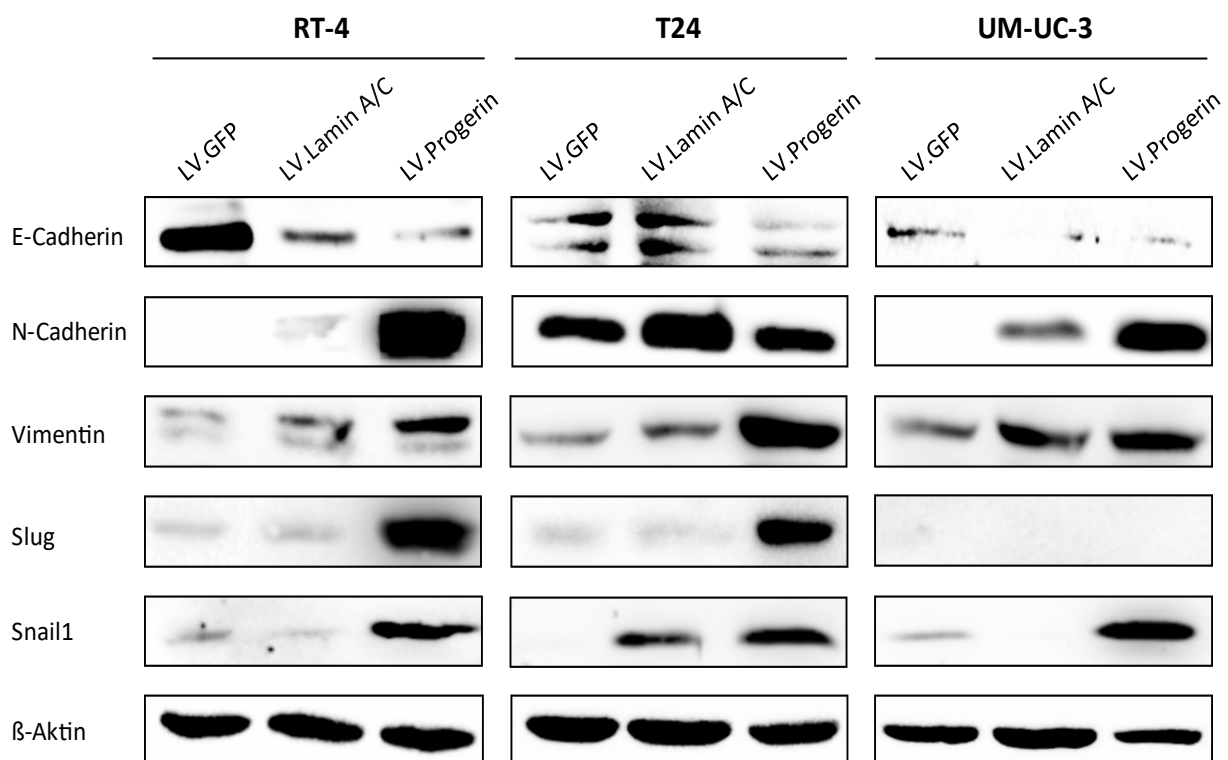


Abbildung 3.14: Darstellung der Proteinexpression von Markern der EMT

Mittels Western Blot konnte die Proteinexpression der EMT-Marker zwischen der Kontrolle LV.GFP und LV.Lamin A/C bzw. LV.Progerin verglichen werden. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Die durchgeführten Experimente gaben Hinweise darauf, dass die Expression von Lamin A/C und Progerin mit Markerveränderungen einherging, die für eine gesteigerte EMT sprechen. So wies die nur wenig invasive Zelllinie RT-4 LV.GFP eine hohe Expression von E-Cadherin auf. Sowohl in den Lamin A/C- als auch in den Progerin-exprimierenden Zellen nahm die Proteinbande von E-Cadherin dagegen stark ab. Auch innerhalb der Zelllinie T24 ließ sich durch die Progerin-Expression eine Abnahme der Expression von E-Cadherin nachweisen. In der aggressiven Zelllinie UM-UC-3 konnte E-Cadherin generell nur schwach detektiert werden.

Die EMT-Marker N-Cadherin und Vimentin verhielten sich in allen drei Zelllinien invers zur E-Cadherin-Expression. Ähnlich wie bei der Bestimmung der Stammzellmarker stellte sich mehrheitlich ein dreistufiger Trend dar. Während sich die Proteine in den Kontrollen LV.GFP kaum darstellen ließen, zeigten sich in LV.Lamin A/C intensivere Proteinbanden. Beide Proteine wurde unabhängig von der Zelllinie am stärksten in LV.Progerin-transduzierten Zellen exprimiert. Lediglich bei T24 waren die N-Cadherin-Banden nahezu gleich kräftig.

Auch die Transkriptionsfaktoren Slug und Snail1 konnten in den drei Kontrollzelllinien nur schwach detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in RT-4 LV.Progerin und T24 LV.Progerin eine deutliche Expression der beiden Regulatorproteine. In der Zelllinie UM-UC-3 korrelierte die Progerin-Expression ebenfalls mit einer verstärkten Expression von Snail1. Slug konnte in keinem der drei Klone von UM-UC-3 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde mit den Western Blots gezeigt, dass durch die Expression von Progerin und Lamin A/C die E-Cadherin-Expression vermindert wurde, was eine Unterdrückung der epithelialen Differenzierung nahelegt. Stattdessen wurde sowohl die Expression der mesenchymalen Proteine N-Cadherin und Vimentin als auch die Expression der EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Slug und Snail1 gefördert.

3.2.4.2 Messung des Migrationspotentials

Um die Ergebnisse der Western Blots funktionell bestätigen zu können, wurden weitere Untersuchungen zur Messung der Metastasierungskapazität ergänzt. Dazu wurde das Migrationspotential der transduzierten Zelllinien mithilfe von Scratch Assays bestimmt. Nach einem festgelegten Zeitintervall wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht und die Größe der verbleibenden Aussparungen gemessen (siehe Abbildung 3.15).

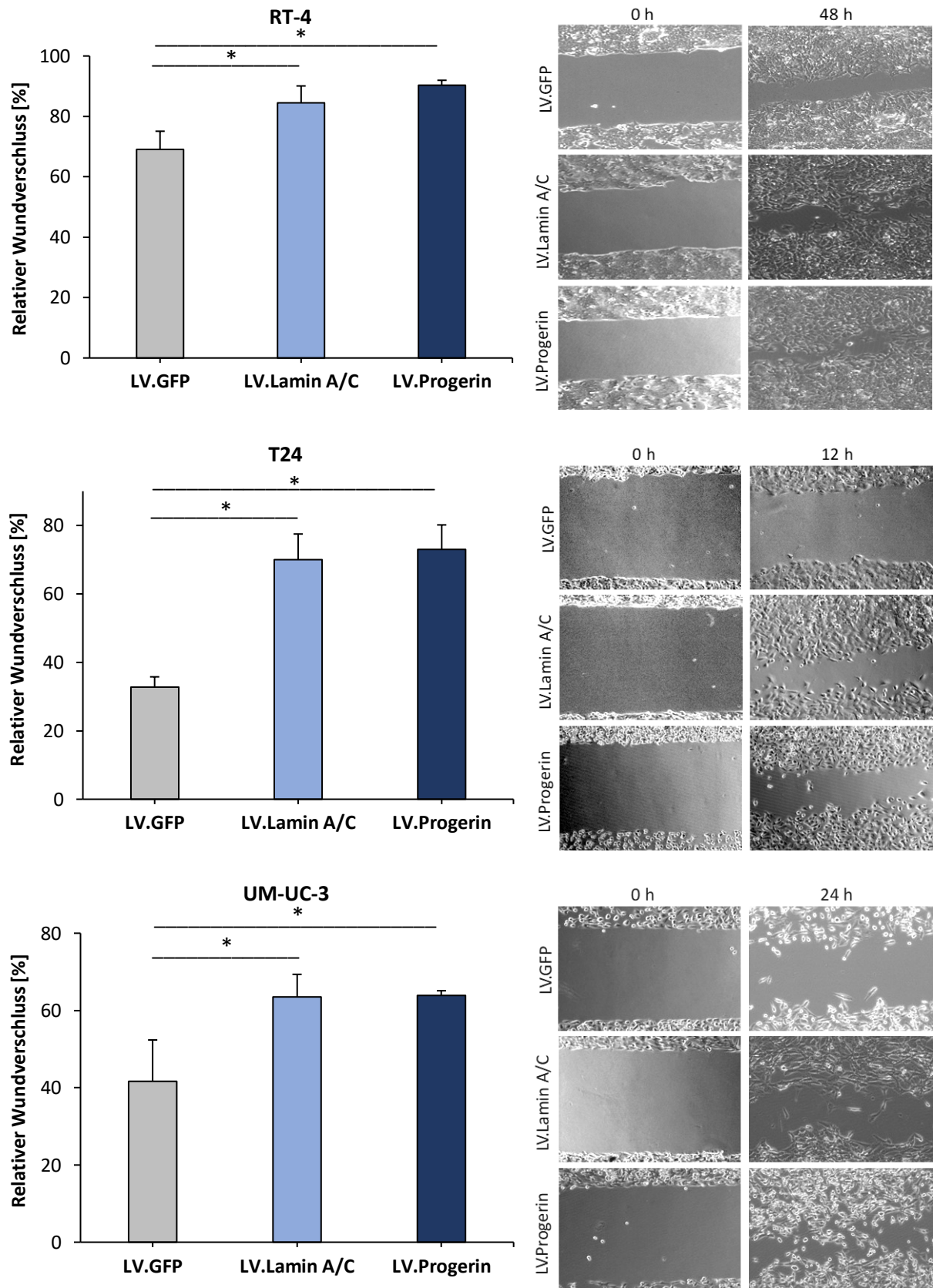


Abbildung 3.15: Messung des Migrationspotentials mittels Scratch Assay

Zur Beurteilung der Metastasierungskapazität wurde das Migrationspotential mithilfe von Scratch Assays gemessen. Rechts sind exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen des Versuches dargestellt. Links ist der prozentuale Wundverschluss der jeweiligen Zelllinie grafisch abgebildet. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet.

Der Zeitpunkt der zweiten lichtmikroskopischen Aufnahmen war abhängig von der jeweiligen Zelllinie. Die Zellen der wenig aggressiven Zelllinie RT-4 migrierten nur langsam, weswegen die Flächenmessung erst nach 48 h erfolgte. Die Zelllinie UM-UC-3 wurde nach 24 h untersucht. Die Zelllinie T24 migriert schnell, sodass der relative Wundverschluss bereits nach 12 h bestimmt wurde.

Trotz der zeitlichen Unterschiede zwischen den Zelllinien ließ sich in allen drei Zelllinien eine gleichartige Tendenz beobachten. So zum Beispiel wies bei T24 die Kontrollzelllinie LV.GFP mit einem relativen Wundverschluss von 33 % nach 12 h die niedrigste Migrationskapazität auf. Dagegen betrug der Wundverschluss der Zellen mit Überexpression von Lamin A/C und Progerin nach 12 h 70 bzw. 73 %. Im Vergleich zu LV.GFP waren beide Unterschiede statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Gleichmaßen migrierten auch die mit Lamin A/C und Progerin transduzierten Zellen der Zelllinien RT-4 und UM-UC-3 signifikant schneller als die Kontrolle ($p \leq 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zwischen LV.Lamin A/C und LV.Progerin konnte dagegen in keiner der drei Zelllinien festgestellt werden ($p \geq 0,05$). Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlussfolgern, dass die Expression von Lamin A/C bzw. Progerin die Migrationsfähigkeit von Zellen des Harnblasenkarzinoms erhöhte.

3.2.4.3 Messung des Invasivitätspotentials

Während mittels Scratch Assays das migratorische Potential der Zellen bestimmt werden konnte, wurden im nächsten Arbeitsschritt Boyden-Chamber Assays durchgeführt. In dieser Untersuchung mussten die Zellen neben einer Membran eine basalmembranartige Matrix überwinden. Da dazu insbesondere invasive Zellen befähigt sind (Chen et al., 2017), konnten mit diesem Versuch Aussagen über das invasive Wachstum der durch Lamin A/C bzw. Progerin modifizierten Zellen gewonnen werden. Die Ergebnisse sind auf der folgenden Seite dargestellt (siehe Abbildung 3.16).

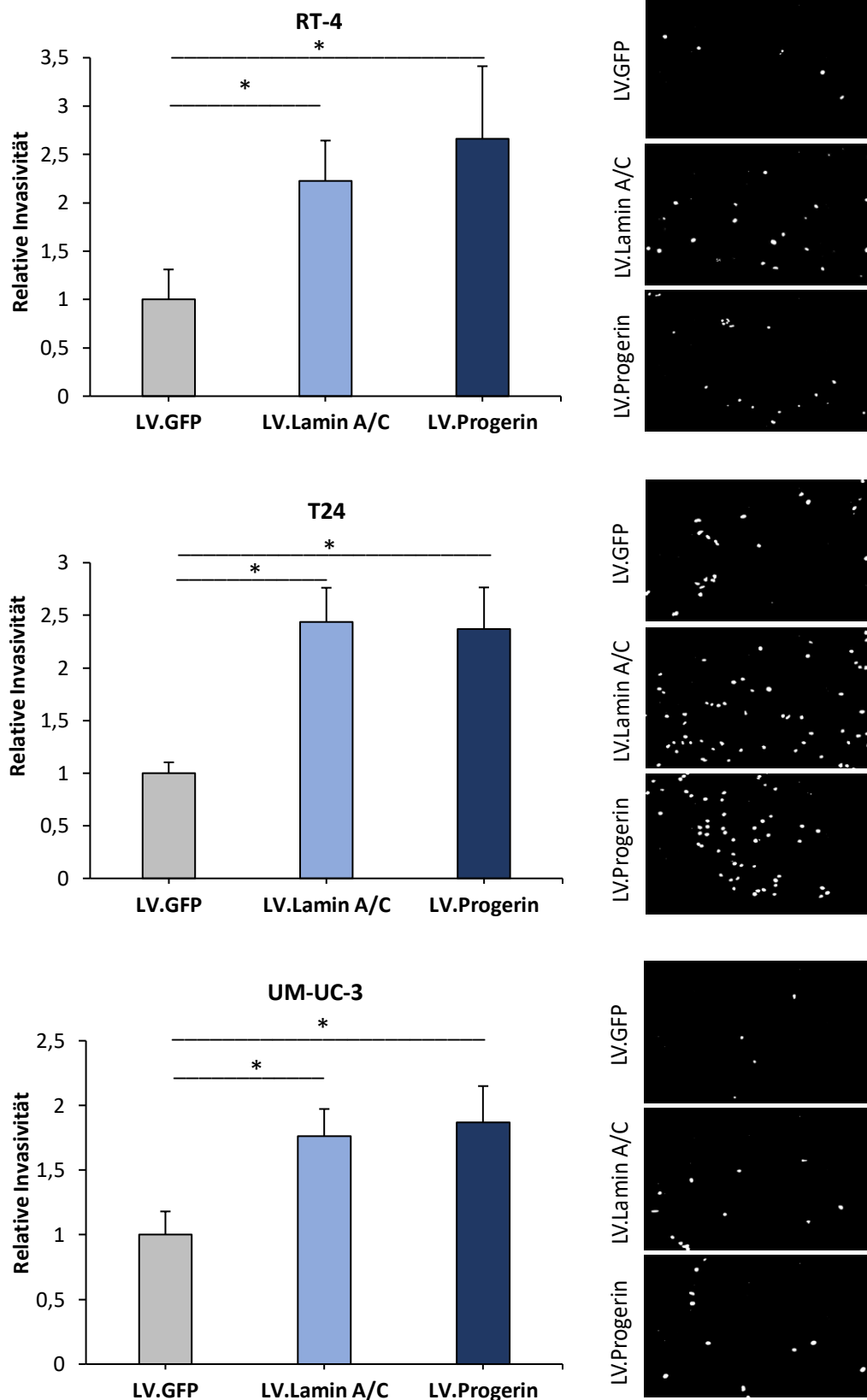


Abbildung 3.16: Messung des Invasivitätspotentials mittels Boyden-Chamber Assay

Das Invasivitätspotential wurde mithilfe von Boyden-Chamber Assays gemessen. Rechts sind exemplarische mikroskopische Aufnahmen von Zellen, welche das Matrigel durchwanderten, dargestellt. Daraus abgeleitet ist links die relative Invasivität der jeweiligen Zelllinie grafisch abgebildet. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet.

Die Tendenz in den Scratch Assays konnte in den durchgeführten Boyden-Chamber Assays bestätigt werden. Die Kontrolle LV.GFP wies in allen drei Zelllinien das geringste Invasivitätspotential auf und wurde daher auf den Referenzwert 1 normiert. Im Vergleich dazu betrug die relative Invasivität von RT-4 LV.Lamin A/C 2,2 und in den Progerin-exprimierenden Zellen 2,7. Diese Steigerung der Zellinvasivität gegenüber der Kontrollzelllinie war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Ähnliche Unterschiede wurden auch in den Zelllinien T24 und UM-UC-3 gemessen. So migrierten im Vergleich zur GFP-Kontrolle bei UM-UC-3 fast doppelt so viele Zellen durch die Membran und das Matrigel, wenn Lamin A/C bzw. Progerin überexprimiert wurde ($p \leq 0,05$). Zwischen der Überexpression von Lamin A/C und der Expression von Progerin zeigten sich in den drei Zelllinien dagegen keine signifikanten Unterschiede im Invasivitätspotential ($p \geq 0,05$).

Mithilfe dieser drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression von Lamin A/C bzw. Progerin in Harnblasenkarzinomzelllinien das Migrations- und Invasivitätspotential sowohl auf Proteinebene als auch in funktionellen Untersuchungen zunahm.

3.3 Charakterisierung der transduzierten Krebsstammzellpopulation

Im nachfolgenden Teil der Arbeit wurden speziell Krebsstammzellen und der Einfluss von Lamin A/C und Progerin auf diesen hochaggressiven Zelltyp untersucht. Dazu wurden Expressionsplasmide kloniert, die es ermöglichen, Lamin A/C und Progerin ausschließlich in Krebsstammzellen zu exprimieren. Auf diese Weise konnte der Transgeneffekt, der auf die gesamte Tumorphosphonpopulation beobachtet wurde, mit dem spezifischen Einfluss auf Krebsstammzellen verglichen werden.

3.3.1 Etablierung von Krebsstammzellen mit stabiler Expression von Lamin A/C und Progerin

Es wurden krebstammzellspezifische Plasmide zur Expression von Lamin A/C und Progerin hergestellt. Nach Transduktion dieser lentiviralen Plasmide wurden GFP-positive Zellen mittels Durchflusszytometrie selektiert. Die Transgenexpression wurde fluoreszenzmikroskopisch und mittels Immunoblot überprüft.

3.3.1.1 Klonierung der krebstammzellspezifischen Plasmide

Für die Induktion einer krebstammzellspezifischen Transgenexpression wurde das Plasmid SORE6-mCMVp-dsCopGFP-PURO vom Wakefield Lab (Tang et al., 2015) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid besitzt ein Sore6 Response Element. Dieses Element besteht aus einer sechsfachen Wiederholung der Sequenz 5'-TTTGCATTACAATG-3' und dient als Bindestelle für die Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4. Basierend auf diesem Response Element sollten Lamin A/C und Progerin nur in Zellen mit einer hohen Expression von Sox-2 und Oct-4 überexprimiert werden. Das Sore6-Element wurde aus dem Ursprungsplasmid herausgeschnitten und in das im Labor etablierte pLenti-MCS-Konstrukt integriert. Anschließend sollten die gewünschten Transgene GFP, Lamin A/C und Progerin in das Plasmid insertiert werden. Im ersten Schritt wurde das Sore6-Element mithilfe der Restriktionsenzyme *AvrII* und *BmtI* isoliert und in den Shuttle-Vektor pcDNA3.1 subkloniert. Diese Enzyme wurden zudem für den Kontrollverdau verwendet (siehe Abbildung 3.17).

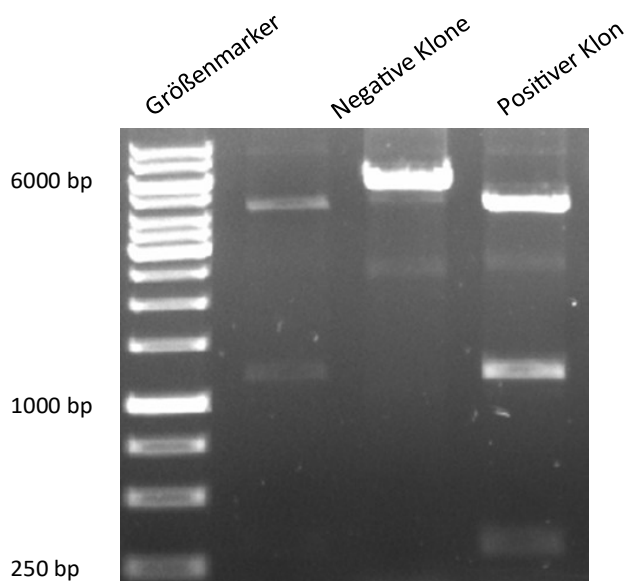


Abbildung 3.17: Analytischer Verdau des Plasmids pcDNA3.1-Sore6

Die Agarose-Gelelektrophorese diente dem Nachweis der erfolgreichen Klonierung des Sore6-Elements in den Shuttle-Vektor pcDNA3.1. Nach Restriktion mit *AvrII* und *BmtI* wurden in positiven Klonen drei Banden mit den Größen 4333 bp, 1196 bp und 303 bp detektiert. Exemplarisch sind zudem zwei negative Klone dargestellt.

Nach erfolgreicher Sequenzierung des erhaltenen Plasmids (siehe Anhang), wurde das 303 bp große Sore6-Element aus dem Gel eluiert und in pLenti-MCS integriert. Die Abbildung 3.18 stellt den analytischen Verdau nach der Restriktion mit den Enzymen *SpeI* und *SacII* dar.

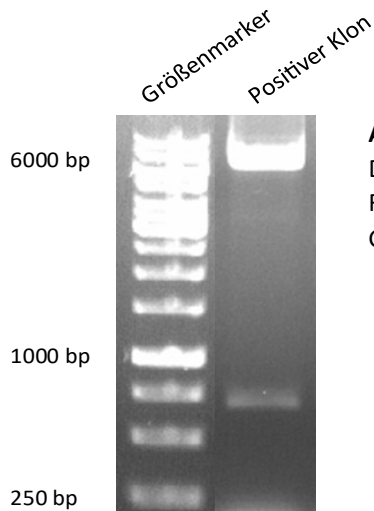


Abbildung 3.18: Analytischer Verdau des Plasmids pLenti-Sore6

Dargestellt ist der Kontrollverdau des Plasmids pLenti-Sore6. In Folge der Restriktion mit *SpeI* und *SacII* ließen sich zwei DNA-Fragmente mit den Größen 6 176 bp und 670 bp erkennen.

Die positiven Klone wurden erneut sequenziert und anschließend konnten die Transgene in das Plasmid pLenti-Sore6 kloniert werden. Hierzu wurden Codon-optimierte LMNA- und Progerin-Fragmente synthetisiert, die eine effiziente und stabile Expression in den Stammzellen gewährleisten. Mit den Enzymen *AscI*, *AflIII* und *AhdI* wurden die Transgene Lamin A/C und Progerin aus den Plasmiden herausgeschnitten. Für die cDNA des GFP-Gens wurde das Plasmid mCMVp-dsCopGFP-PURO verwendet. Das Rückgrat pLenti-Sore6 wurde mit *MluI* geöffnet. Nach der Ligation wurde für die Plasmide zur Expression von Lamin A/C und Progerin ein Kontrollverdau mit *MfeI* und *SpeI* angesetzt. Der analytische Verdau für pLenti-Sore6-GFP wurde mit *EcoRV* durchgeführt (siehe Abbildung 3.19).

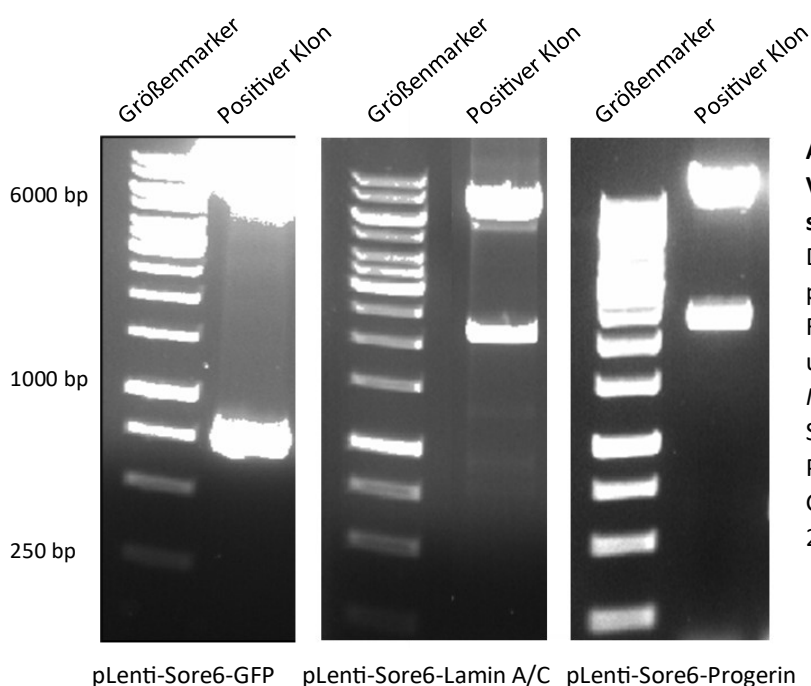


Abbildung 3.19: Analytischer Verdau der krebstammzell-spezifischen Plasmide

Der mit *EcoRV* behandelte Klon pLenti-Sore6-GFP weist zwei DNA-Fragmente mit den Größen 6 979 bp und 704 bp auf. Nach Restriktion mit *MfeI* und *SpeI* stellten sich für pLenti-Sore6-Lamin A/C und pLenti-Sore6-Progerin zwei Banden mit den Größen 7 293 bp bzw. 7 143 bp und 2 292 bp dar.

3.3.1.2 Zellsortierung zur Generierung homogener GFP-positiver Populationen

Nach der Sequenzierung wurden die klonierten Plasmide in die Zielzellen eingebracht. Problematisch war dabei, dass die Plasmide keine Antibiotikaresistenz zur Zellselektion aufwiesen. Da zudem nur ein geringer Anteil der Gesamtpopulation, insbesondere die Krebsstammzellen, die Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4 exprimiert, wurden auch die an das Sore6 Response Element gekoppelten Transgene nur in wenigen Zellen exprimiert. Um die folgenden Experimente in einer weitgehend homogenen Population durchführen zu können, erfolgte daher eine Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie.

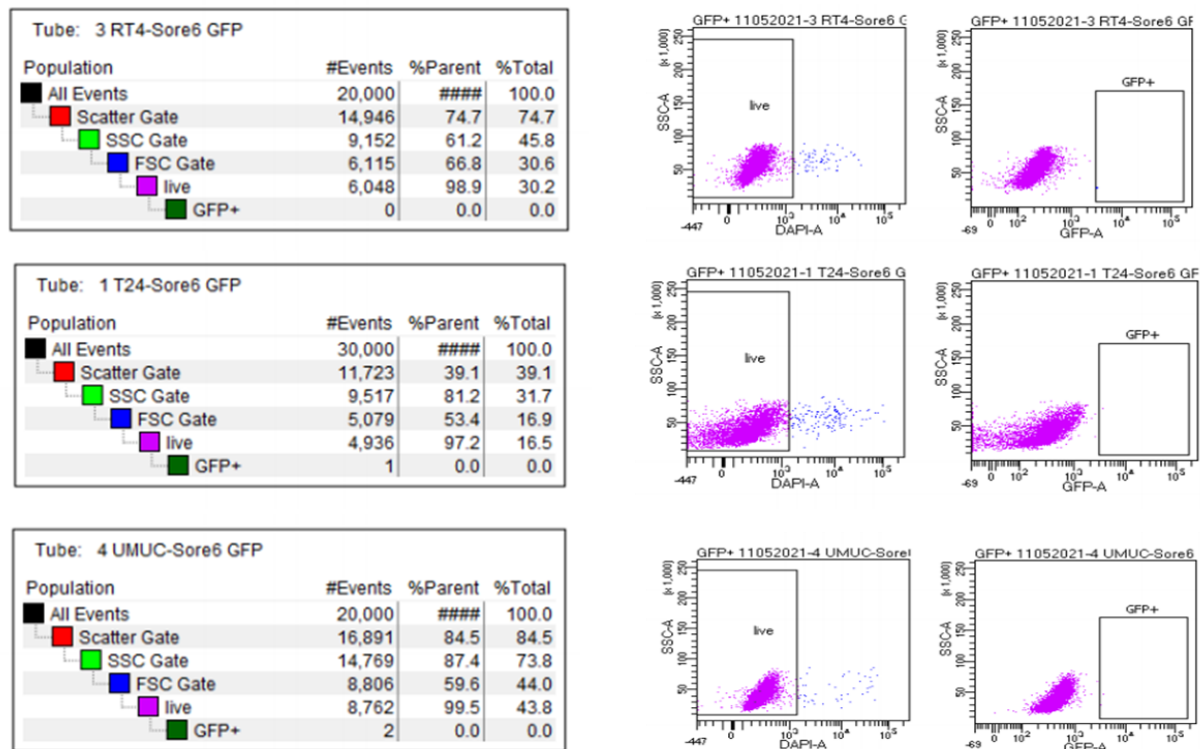


Abbildung 3.20: Exemplarische Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse zur Sortierung GFP-positiver Zellen. Links sind die absoluten Zahlen des Versuchs dargestellt. Rechts lässt sich bildlich erkennen, dass sich nur wenige Zellen im GFP-positiven Gate befanden.

In der Abbildung 3.20 ist die Zellsortierung am Beispiel von LV.Sore6-GFP dargestellt. Die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten die geringe GFP-Expression. Während der Zellsortierung konnte keine GFP-positive Zelle in der wenig aggressiven Zelllinie RT-4 detektiert werden. Innerhalb der Zelllinie T24 stellte sich von 30 000 Zellen eine Zelle GFP-positiv dar. Die aggressive Zelllinie UM-UC-3, die auch die höchste Expression der Stammzellmarker Sox-2 und Oct-4 besaß (vgl. Abbildung 3.1), wies zwei GFP-positive Zellen auf. Diese Ergebnisse stellten sich gleichermaßen bei der Transduktion mit LV.Sore6-Lamin A/C und LV.Sore6-Progerin dar. Da es nicht möglich war, genügend GFP-positive Zellen für RT-4 und T24 zu selektieren, wurde lediglich die Zelllinie UM-UC-3 kultiviert. Die nachfolgenden Experimente zur Untersuchung des Effekts der Progerin-Expression auf die Krebsstammzellen wurden daher nur mit UM-UC-3 durchgeführt.

3.3.1.3 Nachweis der Transgenexpression in Krebsstammzellen

Nach Isolierung Sore6-positiver Zellen, d. h. potentieller Krebsstammzellen, und der anschließenden Kultivierung wurde die Expression der Transgene überprüft. Dazu wurde der Anteil GFP-positiver Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (siehe Abbildung 3.21).

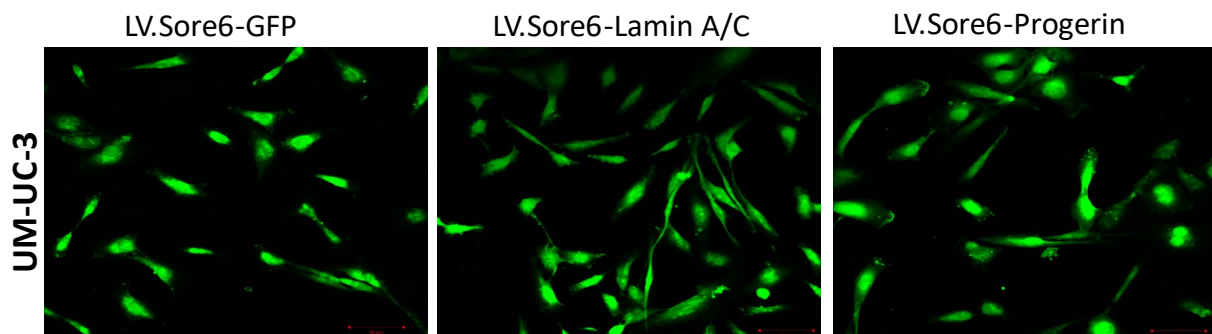


Abbildung 3.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der GFP-Expression in Krebsstammzellen

Die Expression von GFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskop in nahezu allen selektierten Sore6-positiven Zellen deutlich dargestellt werden. Im Gegensatz zum zellunspezifischen Konstrukt war die GFP-Sequenz in den krebstammzellspezifischen Plasmiden nicht an die Sequenzen von Lamin A/C bzw. Progerin gekoppelt (vgl. Abbildung 9.6 und 9.7). Daher stellte sich in den transduzierten Zellen das gesamte Zytoplasma grün dar. Zum Nachweis der Expression von Lamin A/C und Progerin wurden deshalb Western Blots durchgeführt.

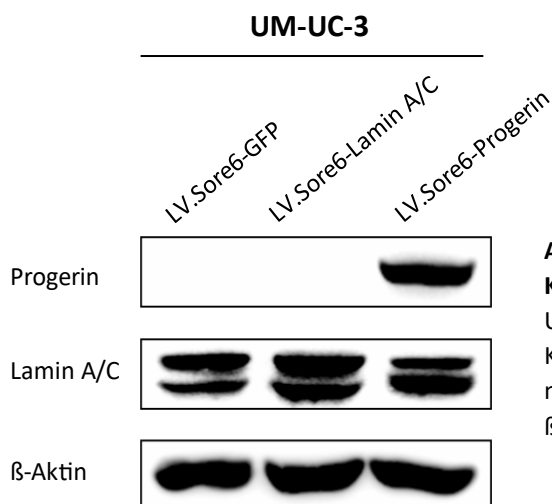


Abbildung 3.22: Nachweis der Expression der Transgene in Krebsstammzellen mittels Western Blot

Um die Expression von Lamin A/C und Progerin in den Krebsstammzellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie LV.GFP nachweisen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Abbildung 3.22 zeigt den erfolgreichen Nachweis von Lamin A/C und Progerin in den Zielzellen. Im Gegensatz zur GFP-Kontrolle und der Lamin A/C-exprimierenden Zelllinie konnte in UM-UC-3 LV.Sore6-Progerin eine Proteinbande für Progerin detektiert werden. Die Lamin A/C-Bande wies die bekannte Zweiteilung auf. Dabei erschien die Expression der beiden Isoformen am stärksten in UM-UC-3 LV.Sore6-Lamin A/C. Zwischen LV.Sore6-GFP und LV.Sore6-Progerin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Lamin A/C.

3.3.2 Untersuchung zur Induktion der zellulären Seneszenz in Krebsstammzellen

Identisch zum zellunspezifischen Konstrukt sollte geprüft werden, ob die Progerin-Expression in den Krebsstammzellen zelluläre Seneszenz induziert. Dafür wurden die bereits bekannten Seneszenz-Marker auf Proteinebene verglichen. Außerdem sollten die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase und die Proliferationskapazität bestimmt werden.

3.3.2.1 Bestimmung von Seneszenz-Markern in Krebsstammzellen auf Proteinebene

Im ersten Arbeitsschritt wurde die Expression der Tumorsuppressorproteine p21 und p53 sowie der Apoptoseregulatoren Bax und Bcl-2 untersucht. Die nachfolgende Abbildung 3.23 stellt die detektierten Proteinbanden dar.

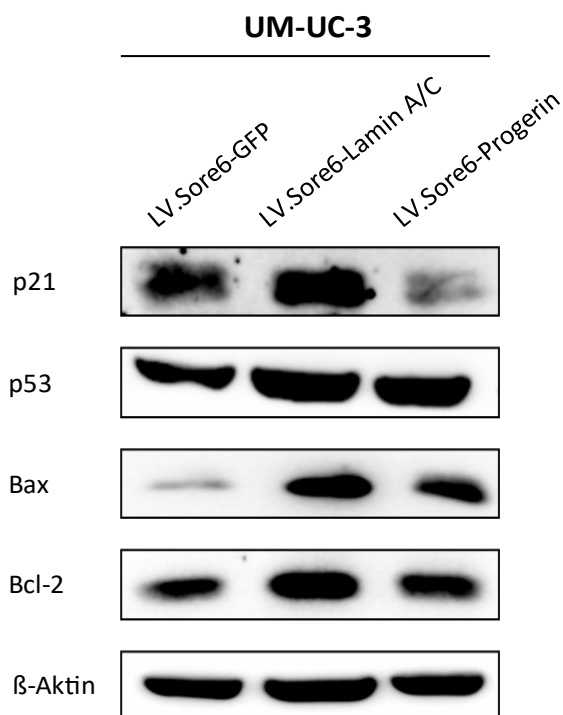


Abbildung 3.23: Bestimmung von Markern zellulärer Seneszenz in Krebsstammzellen

Mittels der Western Blots wurde geprüft, ob die krebstammzellspezifische Progerin-Expression mit der Expression von Seneszenz-Markern korreliert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Ähnlich wie zu den Ergebnissen bei Verwendung der zellunspezifischen Plasmide (vgl. Abbildung 3.6) ließ sich keine höhere Expression der Seneszenz-Marker in Folge der krebstammzellspezifischen Progerin-Expression erkennen. Die Proteinbanden von p53 und Bcl-2 stellten sich erneut unabhängig von den Transgenen gleich stark dar. Der Tumorsuppressor p21 war in den Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen schwächer als in der Kontrolle nachweisbar. Dagegen wurde der proapoptotische Faktor Bax in der Kontrolle LV.Sore6-GFP schwach detektiert und wurde in Folge der Lamin A/C- bzw. Progerin-Expression signifikant stärker exprimiert. Wie auch in der Gesamttumorpopulation hatten weder Lamin A/C noch Progerin einen nennenswerten Einfluss auf die Expression der untersuchten Seneszenz-Marker.

3.3.2.2 Aktivitätsmessung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase in Krebsstammzellen

Nachfolgend wurde die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase mithilfe des *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling, Frankfurt) gemessen (siehe Abbildung 3.24).

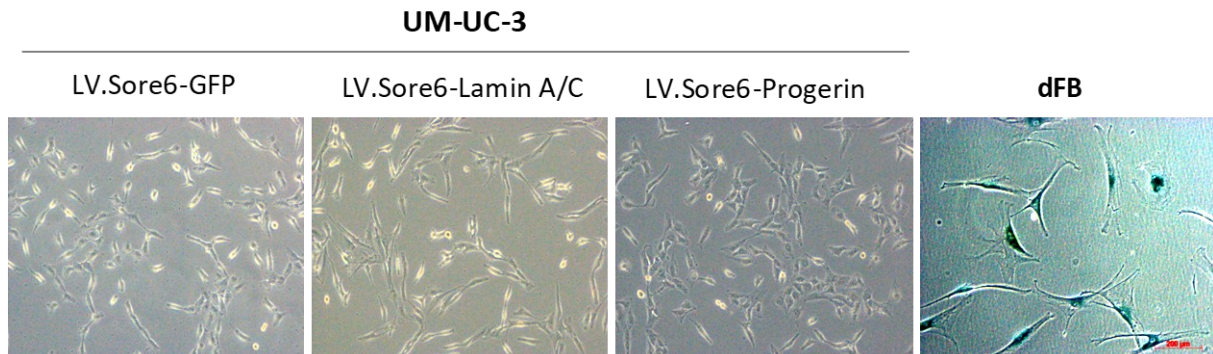


Abbildung 3.24: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Krebsstammzellen nach Behandlung mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit

Die Krebsstammzellen stellten sich umso stärker blau dar, je höher die Enzymaktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase war. Dermale Fibroblasten in hoher Passagezahl dienten als Positivkontrolle.

Lichtmikroskopisch konnten bei UM-UC-3 keine Unterschiede im Farbumschlag detektiert werden. Im Vergleich zur Kontrolle färbten sich die Lamin A/C- bzw. Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen nicht stärker blau. Daraus ließ sich schließen, dass die Expression von Progerin die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase in den Krebsstammzellen nicht beeinflusste. Als Positivkontrolle wurden erneut dermale Fibroblasten verwendet. Die deutliche Blaufärbung des Zytoplasmas bewies die hohe Aktivität des Enzyms in seneszenten Zellen.

3.3.2.3 Messung der Proliferationskapazität der Krebsstammzellen

Im letzten Arbeitsschritt zur Untersuchung der zellulären Seneszenz wurde die Proliferationskapazität der Krebsstammzellen mittels XTT-Assay bestimmt.

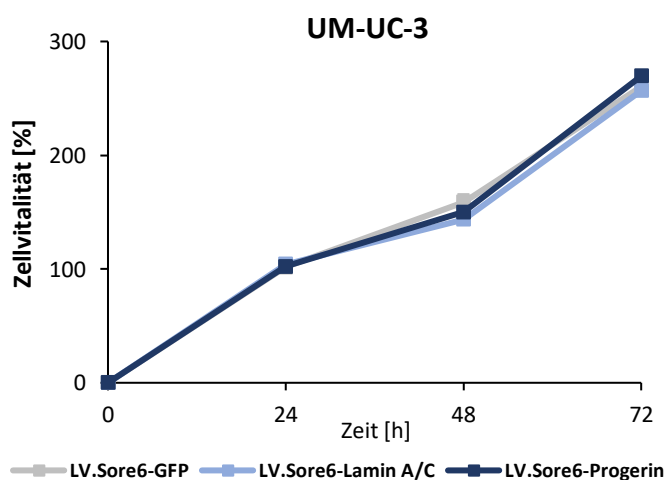


Abbildung 3.25: XTT-Assay zur Messung der Proliferationskapazität der Krebsstammzellen

In Abhängigkeit von den drei Messzeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h wurde mithilfe des XTT-Assays der Umsatz des Tetrazoliumsals und damit indirekt die relative Zellvitalität gemessen.

Die Abbildung 3.25 zeigt, dass die Progerin-Expression in den Krebsstammzellen die Proliferationskapazität nicht beeinflusste. Nach 24 h wurde in UM-UC-3 LV.Sore6-GFP eine relative Zellvitalität von 102 % gemessen. In UM-UC-3 LV.Sore6-Lamin A/C und LV.Sore6-Progerin betrug die Vitalität nach 24 h 104 bzw. 102 %. Auch nach 48 h wurden nur schwache Unterschiede detektiert. In der Kontrolle stieg die relative Zellvitalität auf 159 %. Die Lamin A/C- bzw. Progerin-exprimierenden Zellen wiesen nach 48 h eine Vitalität von 144 % bzw. 150 % auf. Am letzten Messzeitpunkt nach 72 h betrug die relative Vitalität bei LV.GFP 260 %, bei LV.Lamin A/C 257 % und bei LV.Progerin 270 %. Zu keinem der drei Messzeitpunkte waren die gemessenen Abweichungen statistisch signifikant ($p \geq 0,05$). Daraus ließ sich ableiten, dass auch die Proliferationskapazität der Krebsstammzellen von der Expression von Lamin A/C und Progerin unabhängig war.

3.3.3 Untersuchung zum Einfluss auf die Stammzellkapazität der Krebsstammzellen

Übereinstimmend zu dem zellunspezifischen Konstrukt, ließ sich im Rahmen der Experimente keine Seneszenz-Induktion als Folge der krebstammzellspezifischen Progerin-Expression beobachten. Wie zuvor in normalen Tumorzellen sollte anschließend untersucht werden, inwiefern die Stammzellkapazität durch die Expression von Lamin A/C und Progerin beeinflusst wird (siehe Abbildung 3.26).

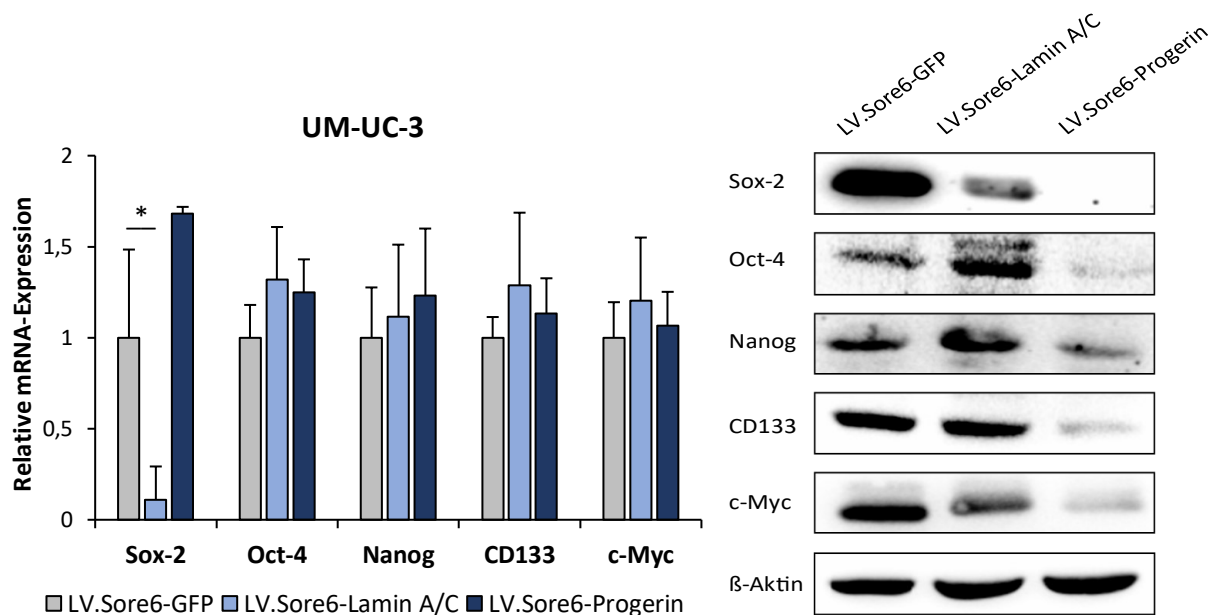


Abbildung 3.26: Bestimmung der Expression von Stammzellmarkern in Krebsstammzellen auf RNA- und Proteinebene

Links ist die relative mRNA-Expression der Stammzellmarker in den Krebsstammzellen nach Durchführung von qPCRs grafisch dargestellt. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet. Rechts sind die dazugehörigen detektierten Proteinbanden nach Durchführung von Western Blots abgebildet. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Die Expression der Stammzellmarker in den Krebsstammzellen stellte sich auf RNA- und Proteinebene unterschiedlich dar. Auf RNA-Ebene ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen nachweisen ($p \geq 0,05$). Auch die Expression von Lamin A/C beeinflusste die Expression der Stammzellmarker im Vergleich zu LV.Sore6-GFP mehrheitlich nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Lediglich die Transkriptlevel des Yamanaka-Faktors Sox-2 waren nach Lamin A/C-Expression in den Krebsstammzellen signifikant erniedrigt ($p \leq 0,05$).

Dagegen zeigte sich in den Western Blots eine verminderte Proteinexpression von Sox-2, Oct-4, Nanog, CD133 und c-Myc durch die krebstammzellspezifische Progerin-Expression. Während die parentalen Zellen hohe Level der Stammzellmarker aufwiesen, wurden in UM-UC-3 LV.Sore6-Progerin deutlich schwächere Banden detektiert. Dies galt gleichermaßen für alle untersuchten Faktoren. Im Vergleich dazu beeinflusste die Lamin A/C-Expression die Expression der Stammzellmarker mit Ausnahme von Sox-2 und c-Myc kaum.

3.3.4 Untersuchung zum Einfluss auf die Metastasierungskapazität der Krebsstammzellen

Im Gegensatz zum zellunspezifischen System wurde durch die Lamin A/C- und Progerin-Expression kein Anstieg der Stammzellkapazität nachgewiesen. Vielmehr wurde auf Proteinebene eine signifikante Abnahme der untersuchten Stammzellmarker in den Krebsstammzellen beobachtet. Daher sollte nachfolgend geprüft werden, ob dies gleichermaßen für die Metastasierungskapazität galt. Wie im zellunspezifischen Konstrukt wurden dazu Western Blots und funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

3.3.4.1 Bestimmung von EMT-Markern der Krebsstammzellen auf Proteinebene

Zur Bestimmung der Expression der EMT-Marker der Krebsstammzellen wurden die gleichen Antikörper wie im zellunspezifischen Konstrukt verwendet. Die detektierten Proteinbanden sind in der Abbildung 3.27 dargestellt.

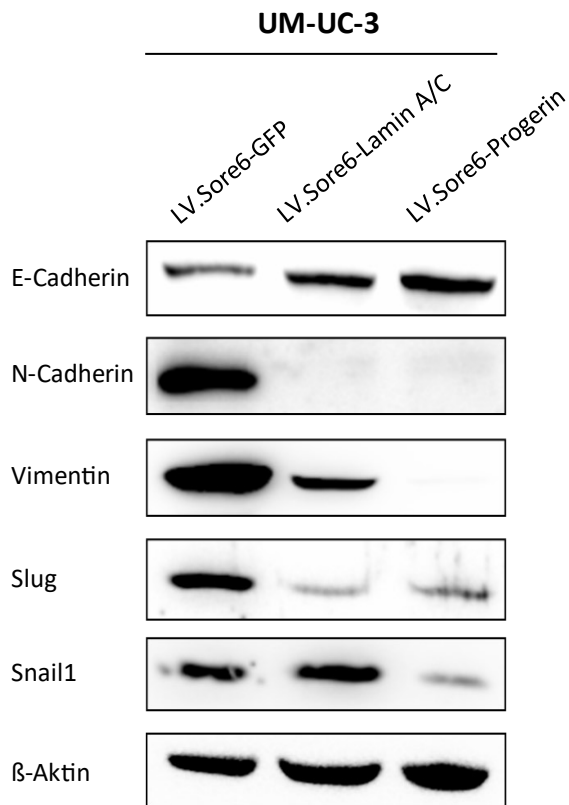


Abbildung 3.27: Darstellung der Proteinexpression von Markern der EMT in Krebsstammzellen

Mittels Western Blot konnte die Proteinexpression der EMT-Marker zwischen der Kontrolle LV.Sore6-GFP und LV.Sore6-Lamin A/C bzw. LV.Sore6-Progerin verglichen werden. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Konträr zu den Ergebnissen im zellunspezifischen Konstrukt (vgl. Abbildung 3.14) verringerte sich das Proteinlevel der EMT-Marker in den Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen.

In der Kontrolle UM-UC-3 LV.Sore6-GFP wurde die niedrigste E-Cadherin-Expression detektiert. Verglichen damit waren die Proteinbanden für LV.Sore6-Lamin A/C und LV.Sore6-Progerin signifikant stärker. Die EMT-Marker N-Cadherin und Vimentin verhielten sich umgekehrt. Nur in UM-UC-3 LV.Sore6-GFP wurde eine Proteinbande für N-Cadherin nachgewiesen. Auch die Expression von Vimentin sank in den Krebsstammzellen aufgrund der Lamin A/C- bzw. Progerin-Expression deutlich. Im Vergleich zur Kontrolle war die Proteinbande in LV.Sore6-Lamin A/C schwächer. In UM-UC-3 LV.Sore6-Progerin konnte keine Vimentin-Expression detektiert werden.

Die Progerin-Expression in den Krebsstammzellen beeinflusste zudem die Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren. Entsprechend der EMT-Marker zeigte sich in LV.Sore6-Progerin im Vergleich zu LV.Sore6-GFP eine erniedrigte Expression von Slug und Snail1. Auch in den Lamin A/C-exprimierenden Krebsstammzellen war die Expression von Slug gegenüber der Kontrolle deutlich verringert.

3.3.4.2 Messung des Migrationspotentials der Krebsstammzellen

Ähnlich wie im zellunspezifischen Konstrukt sollten die Ergebnisse der Proteinanalysen anschließend um funktionelle Untersuchungen ergänzt werden. Hierzu wurden erneut Scratch Assays zur Messung des Migrationspotentials der Krebsstammzellen durchgeführt (siehe Abbildung 3.28).

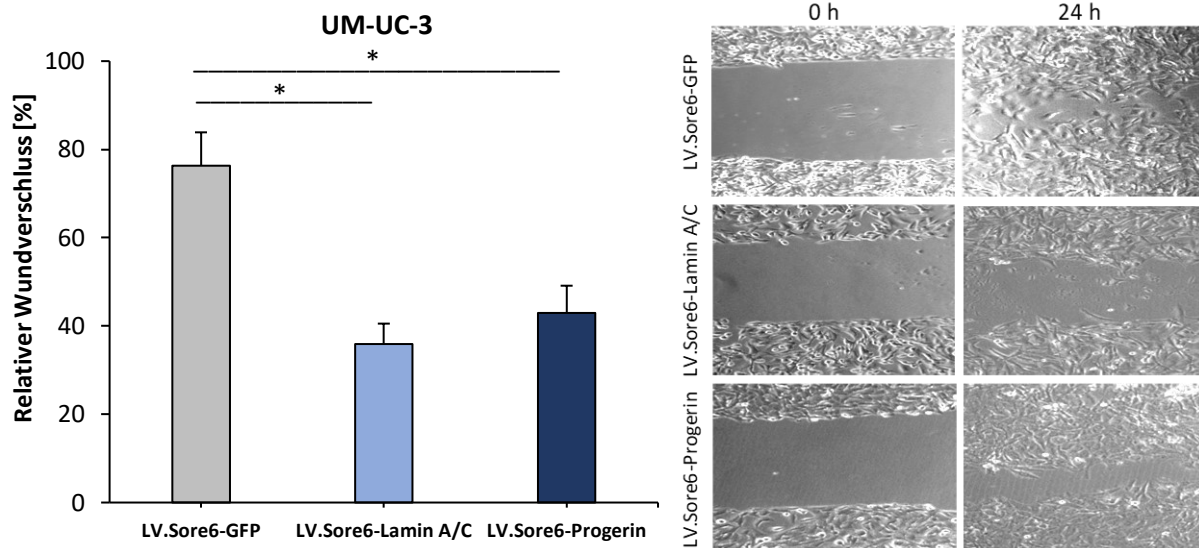


Abbildung 3.28: Messung des Migrationspotentials der Krebsstammzellen mittels Scratch Assay

Zur Beurteilung der Metastasierungskapazität der Krebsstammzellen wurde das Migrationspotential mithilfe von Scratch Assays gemessen. Rechts sind exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen des Versuches dargestellt. Links ist der prozentuale Wundverschluss der jeweiligen Zelllinie grafisch abgebildet. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet.

Die verminderte Expression der EMT-Marker in den Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen korrelierte im Vergleich zur Kontrolle mit einer geringeren Migration. Die Kontrollzellen UM-UC-3 LV.GFP migrierten am schnellsten und wiesen nach 24 h einen relativen Wundverschluss von 76 % auf. In den Lamin A/C- bzw. Progerin-exprimierenden Krebsstammzellen wurde ein geringeres Migrationspotential gemessen. Der relative Wundverschluss betrug für UMUC-3 LV.Sore6-Lamin A/C 36% und für UM-UC-3 LV.Sore6-Progerin 43 %. Verglichen mit der Kontrolle waren diese Unterschiede signifikant ($p \leq 0,05$). Dagegen waren die Abweichungen zwischen LV.Sore6-Lamin A/C und LV.Sore6-Progerin nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Scratch Assays, dass die Migrationsfähigkeit durch eine krebstammzellspezifische Überexpression der Lamine im Gegensatz zum zellunspezifischen Konstrukt gehemmt wurde.

3.3.4.3 Messung des Invasivitätspotentials der Krebsstammzellen

Abschließend wurde mittels Boyden-Chamber Assay überprüft, ob durch die Expression von Lamin A/C bzw. Progerin neben der Migration auch die Invasivität der Krebsstammzellen sank (siehe Abbildung 3.29).

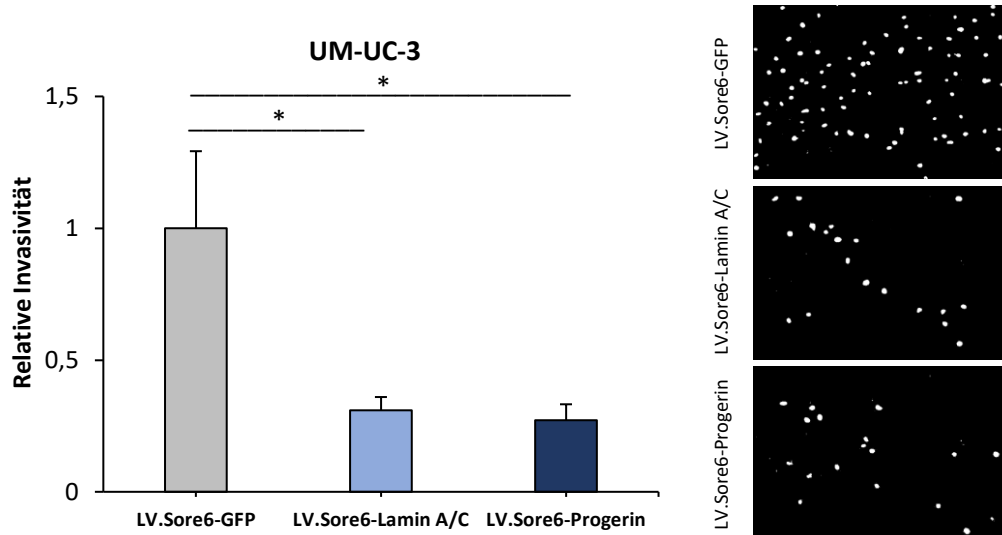


Abbildung 3.29: Messung des Invasivitätspotentials der Krebsstammzellen mittels Boyden-Chamber Assay

Das Invasivitätspotential der Krebsstammzellen wurde mithilfe von Boyden-Chamber Assays gemessen. Rechts sind exemplarische mikroskopische Aufnahmen von Zellen, welche das Matrigel durchwanderten, dargestellt. Daraus abgeleitet ist links die relative Invasivität der jeweiligen Zelllinie grafisch abgebildet. Statistische Signifikanz nach t-Test ($p \leq 0,05$) ist durch * gekennzeichnet.

Die durchgeführten Boyden-Chamber Assays untermauerten die Resultate der Scratch Assays. Die höchste Invasivität wurde in UM-UC-3 LV.Sore6-GFP gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle migrierten signifikant weniger Lamin A/C- bzw. Progerin-exprimierende Krebsstammzellen durch das Matrigel ($p \leq 0,05$). So betrug die relative Invasivität für LV.Sore6-Lamin A/C 0,31 und für LV.Sore6-Progerin 0,27. Zwischen LV.Sore6-Lamin A/C und LV.Sore6-Progerin ließen sich keine signifikanten Invasivitätsunterschiede feststellen ($p \geq 0,05$).

Zusammenfassend zeigte sich in den Untersuchungen eine gleichsinnige Veränderung der metastatischen Kapazität. Sowohl auf Proteinebene als auch in den funktionellen Assays verringerte die krebstammzellspezifische Progerin-Expression das invasive Potential. Auch Lamin A/C inhibierte die Aggressivität der Krebsstammzellen zumindest partiell.

4 Diskussion

Das vorrangige Interesse der aktuellen Krebsforschung gilt dem Verständnis der Karzinogenese und der Identifizierung von Metastasierungskaskaden. Als einer der Treiber der Tumorprogression konnten in verschiedenen Tumorentitäten, wie erstmals der akuten myeloischen Leukämie (Lapidot et al., 1994), Krebsstammzellen isoliert werden. Die Stammzellfähigkeit ist eine physiologische Eigenschaft, die es differenziertem Gewebe ermöglicht, die Pluripotenz zu erhalten und die Selbsterneuerung und Geweberegeneration zu fördern. Bei adäquatem Stimulus können auch differenzierte Tochterzellen entdifferenzieren und Stammzellen ersetzen (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014). Diese Plastizität, die im gesunden Gewebe zwischen differenzierten Zellen und Stammzellen existiert, wird analog während der Tumorprogression rekapituliert (Batlle & Clevers, 2017). Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass die Metastasierung mit einer Modulation von Differenzierungsvorgängen einhergeht. Die Reaktivierung von Prozessen der Embryonalentwicklung unterstützt die Entdifferenzierung von Tumorzellen und hält damit das Gleichgewicht zwischen gewöhnlichen Tumorzellen und Krebsstammzellen aufrecht (Logotheti et al., 2020). Diese Heterogenität innerhalb der Tumorphilpopulation konnte gleichermaßen im Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden. Im Jahr 2009 wurden erstmals tumorinitiierende Blasenkrebszellen beschrieben, welche im Expressionsmuster den Basalzellen, die das Urothel regenerieren, ähnelten (Chan et al., 2009). Auch in der humanen Harnblasenkarzinom-Zelllinie J82 konnten CD133-positive Tumorzellen, anteilig nur etwa 4 % aller untersuchten Zellen, identifiziert werden (Huang et al., 2013). Im Vergleich zu Tumorzellen ohne Expression des Stammzellmarkers zeichnete sich diese Subpopulation durch aggressiveres Tumorstwachstum und eine erhöhte Toleranz gegenüber Bestrahlung und dem Erstlinien-Chemotherapeutikum Cisplatin aus (ebd.). Tran et al. (2010, S. 387) charakterisieren die Harnblasenkrebsstammzellen daher als Subpopulationen, „die für die Tumorentstehung, die Differenzierung, die Rezidive, die Metastasierung und die Chemoresistenz verantwortlich sind.“

In Anbetracht dieser therapierelevanten Eigenschaften stellen Krebsstammzellen einen zentralen Angriffspunkt in der Krebstherapie dar. Das primäre Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, ein spezifisches Therapiekonzept gegen Krebsstammzellen zu entwickeln. Dazu wurde ein lentiviraler Vektor entwickelt, der Progerin unter der Kontrolle eines stammzellspezifischen Promoters in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms exprimiert. Die Krebsstammzellen sollten in Folge der Progerin-Expression nicht abgetötet, sondern in einen seneszenten Zustand mit verminderter Regenerationskapazität transferiert werden. Die auf diese Weise modifizierten Tumorzellen wurden anschließend auf Veränderungen der Stammzell- und Metastasierungskapazität untersucht. In den folgenden Abschnitten sollen die Ergebnisse diskutiert und in den literarischen Kontext eingeordnet werden. Abschließend werden die verwendeten Methoden und Limitationen der Arbeit kritisch erörtert.

4.1 Das Paradox der zellulären Seneszenz

Die altersbedingte Degeneration ist ein Merkmal nahezu aller Lebewesen und führt sowohl in Einzellern als auch in großen und komplex entwickelten Organismen zum sukzessiven Funktionsverlust. Bei Säugetieren stehen diese zellulären Veränderungen im Zusammenhang mit schwer therapierbaren Erkrankungen, wie Makuladegeneration, Atherosklerose oder neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder dem Parkinson-Syndrom (Regulski, 2017). Die latent zunehmende Alterung ist ursprünglich eine protektive Antwort auf endo- und exogene Stressoren. Die molekularen Reaktionen auf Stimuli, wie oxidativen Stress, DNA-Schäden oder Telomer-Erosion, reichen dabei von vollständiger Geweberegeneration bis hin zum Zelltod (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Einer der essenziellen Mechanismen ist die Induktion zellulärer Seneszenz, welche erstmalig 1961 von Hayflick beschrieben wurde. In Versuchen mit humanen diploiden Fibroblasten bewies er, dass humane Zellen nach etwa 50 bis 60 Zellteilungen, der Hayflick-Grenze, in einem irreversiblen Wachstumsstillstand verharren (Hayflick & Moorhead, 1961). Grundlage für den dauerhaften Zellzyklusarrest ist die Induktion der Tumorsuppressorsignalwege p53/p21^{CIP1} und p16^{INK4a}/Rb und der damit verbundenen Bindung und Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. In Folge dessen wird der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus blockiert (Chicas et al., 2010). Die zelluläre Seneszenz nimmt damit eine zentrale Rolle zum Schutz vor Gewebefibrose, in der Wundheilung und insbesondere in der Tumorsuppression ein (Regulski, 2017).

Das Hutchinson-Gilford-Syndrom ist eine genetische Erkrankung der beschleunigten Zellalterung, bei der die Patienten schon im Kindesalter progressive Alterungserscheinungen wie Alopezie und Atherosklerose zeigen (Hennekam, 2006). Der Treiber des Syndroms, das mutierte Protein Progerin, wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels eigens etablierter lentiviraler Vektoren in humanen Zelllinien des Harnblasenkarzinoms exprimiert, um die potentiell protektiven Funktionen der zellulären Seneszenz als antimetastatische Therapie nutzen zu können. Entgegen der Ausgangshypothese zeigten sich jedoch weder in der Gesamttumorpopulation noch in den isolierten Krebsstammzellen Zeichen zellulärer Seneszenz. Im Gegensatz dazu wiesen die als Kontrolle verwendeten physiologischen Vorhautfibroblasten unter der Progerin-Expression einen signifikanten Anstieg der untersuchten Seneszenz-Marker auf. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den aktuellen Erkenntnissen der Forschung. So detektierte die Arbeitsgruppe um Bidault et. al (2020) nach Progerin-Expression in humanen Endothelzellen oxidativen Stress, welcher wie in den hier verwendeten Vorhautfibroblasten zu einer gesteigerten Expression der Tumorsuppressoren p21 und p53 führt. Übereinstimmend zur durchgeführten Aktivitätsmessung der β -Galactosidase zeigen auch die Fibroblasten von HGPS-Patienten eine erhöhte Aktivität des Seneszenz-assoziierten Enzyms (Liu et al., 2011; von Muhlinen et al., 2018; Wheaton et al., 2017). Daneben kann in HGPS-Fibroblasten eine erhöhte Apoptoserate gemessen werden (Bridger & Kill, 2004), was sich mit dem Anstieg des Apoptosemarkers Bax und der

verminderten Proliferationsrate der hier untersuchten Progerin-exprimierenden Vorhautfibroblasten deckt. Zurückzuführen ist die Induktion zellulärer Seneszenz in karyotypisch normalen Zellen wahrscheinlich auf die Interaktion von Lamin A/C mit dem Tumorsuppressorprotein pRB. Mehrere Studien ergaben, dass Komplexe, bestehend aus nukleoplasmatischen A-Typ-Laminen und LAP2 α direkt an pRB binden können und dadurch die Stabilität und Lokalisierung des Tumorsuppressors direkt funktionell beeinflussen (Dorner et al., 2006; Mancini et al., 1994; Markiewicz et al., 2002). Dementsprechend korreliert ein Mangel an Lamin A/C mit einer erniedrigten Expression von pRB und einem defekten Zellzyklus (Johnson et al., 2004). Gleichmaßen zeigen auch die Fibroblasten von HGPS-Patienten einen Verlust von LAP2 α (Vidak et al., 2015) und eine deregulierte pRB-Signalkaskade (Marji et al., 2010), was die Ursache für den irreversiblen Proliferationsstopp von Progerin-exprimierenden Zellen sein könnte.

Während über die Wirkweise der Lamine und des Progerins im Kontext der Zellalterung weitreichende Erkenntnisse gewonnen werden konnten, scheint der Effekt der Progerin-Expression auf die Seneszenz-Induktion in Krebszellen noch nicht vollständig verstanden. In Versuchen mit einer Lungenkarzinomzelllinie korreliert die Progerin-Expression zwar mit einer verminderten Proliferationsrate, die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase und die Expression von p21, p53 und des Apoptosemarkers PARP1 sind jedoch nicht gesteigert (Hu et al., 2020). Analog verursacht eine Überexpression von Progerin auch im Prostata- und Mammakarzinom keine zelluläre Seneszenz (Tang et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese These, denn auch die verwendeten Zelllinien des Harnblasenkarzinoms zeigten nach Überexpression von Progerin keine Veränderungen in der Expression von Seneszenz-Markern, in der Aktivität der β -Galactosidase und der Proliferationsrate. Zudem gibt die Arbeit Hinweise darauf, dass dies nicht nur für gewöhnliche Tumorzellen gilt, sondern wahrscheinlich auch isolierte Krebsstammzellen resistent gegenüber der Seneszenz-Induktion durch Progerin sind.

Die Arbeitsgruppe um Hu et al. (2020) führt diese fehlende zelluläre Seneszenz auf die unbegrenzte Teilungsfähigkeit von Krebszellen zurück. Weiterhin ist der Tumorsuppressor p53 in Krebszellen häufig mutiert und inaktiviert, wodurch die Seneszenz-Induktion verhindert werden könnte (ebd.). Dieser Umstand könnte in ähnlicher Weise für die Resistenz der untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien verantwortlich sein. So beobachteten Fujimoto et al. (1992) eine starke Assoziation zwischen Mutationen im *TP53*-Gen und dem Auftreten invasiver Blasenkarzinome. In mehreren Studien konnte präzisiert werden, dass die Akkumulation des mutierten p53 den Übergang von nicht-invasiven zu infiltrierenden Harnblasenkarzinomen initiiert (Esrig et al., 1994; Esrig et al., 1993; Grossman et al., 1998; Spruck 3rd et al., 1994). Analog dazu ist das mit den A-Typ-Laminen interagierende pRB im Harnblasenkarzinom häufig dereguliert (Mitra et al., 2007) und mit einer erhöhten Muskelinvasivität des Tumors verbunden (Cairns et al., 1991). Im Vergleich zu Patienten mit normaler Expression von

p53 sowie pRB zeigen Patienten mit abnormer Expression der beiden Tumorsuppressoren eine signifikant stärkere Neigung zur Progression des Harnblasenkarzinoms (Grossman et al., 1998). Vor dem Hintergrund der beiden inaktivierten Zellzyklusregulatoren liegt es nahe, dass auch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie funktionellen Einfluss auf die Resistenz gegenüber der Seneszenz-Induktion besitzen könnten. Ursprünglich galt beispielsweise der Transkriptionsfaktor E2F1 als einer der Schlüsselfaktoren zur Induktion der Apoptose (Stanelle & Pützer, 2006; Stanelle et al., 2003). Dagegen identifizierten Lee et al. (2010) in Transkriptom-Analysen mehrere E2F1-abhängige Zielgene, die den Übergang von nicht-invasiven zu invasiven Harnblasentumoren vermitteln. Übereinstimmend damit beobachtete unsere Arbeitsgruppe, dass eine hohe Expression von E2F1 *in vitro* signifikant mit einer stärkeren Invasivität der Harnblasenkarzinomzellen korreliert (Khan et al., 2017). Demnach besitzt der Transkriptionsfaktor E2F1 abhängig vom molekularen Kontext nicht nur antiproliferative, sondern auch onkogene Eigenschaften (Engelmann & Pützer, 2012) und könnte damit entscheidend zur Seneszenzresistenz gegenüber Progerin beitragen.

Der Paradigmenwechsel, der die ambivalente Funktion des Transkriptionsfaktors E2F1 hervorhebt, könnte sich gleichermaßen für die zelluläre Seneszenz im Kontext der Tumorprogression vollziehen. Während die untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien gegenüber der Seneszenz-Induktion durch Expression von Progerin resistent waren, konnte in zahlreichen Studien mittels Chemotherapie oder ionisierender Strahlung zelluläre Seneszenz in Tumorzellen induziert werden (Demaria et al., 2017; Fan & Schmitt, 2017). Entgegen der ursprünglichen Erwartung, dass das proinflammatorische Sekretom die Elimination maligner Zellen initiieren könnte, wurden tumorfördernde Effekte nachgewiesen (Ou et al., 2021). Im physiologischen Gewebe induziert der SASP zwar die Verjüngung von Nachbarzellen und damit die Geweberegeneration (Ritschka et al., 2017), diese Plastizität führt im Tumorgewebe jedoch zu einer gesteigerten Expression von Stammzellmarkern (Milanovic et al., 2018). Dadurch können seneszente Tumorzellen die EMT, Invasivität und Chemoresistenz des Karzinoms fördern (Canino et al., 2012; Coppé et al., 2008; Tato-Costa et al., 2016). Perkins et al. (2020) demonstrierten anhand von Brustkrebsmodellen sogar, dass die Chemotherapie-induzierte Seneszenz physiologischer Fibroblasten ein geeignetes Milieu für Tumorzellen schaffen kann und damit eigentlich gesunde Körperzellen das Wachstum von Metastasen beschleunigen könnten. Im Gegensatz zum umstrittenen Nutzen einer Seneszenz-Induktion fördert das Abtöten seneszenten Zellen mit Medikamenten, wie Navitoclax oder Fisetin, signifikant die Chemosensitivität und Apoptoseinduktion (Jeong et al., 2019; J. Li et al., 2018; Tan et al., 2011). Perspektivisch könnten Senolytika daher regelhaft adjuvant zur Chemotherapie eingesetzt werden (Triana-Martínez et al., 2020). Diese Erkenntnisse stellen die tumorprotektive Funktion der zellulären Seneszenz stark in Frage. Es sind tiefergehende Studien notwendig, um die komplexe Allianz zwischen der zellulären Seneszenz und der Karzinogenese nachhaltig durchbrechen zu können.

4.2 Die Stammzellfähigkeit als entscheidender Treiber der malignen Progression

Der physiologische Antagonist zur zellulären Seneszenz ist die Stammzellfähigkeit. Über die Existenz von Stammzellen wurde erstmals diskutiert, als Becker et al. (1963) zeigten, dass die Implantation von Knochenmarkszellen in die Milz von bestrahlten Mäusen die Koloniebildung fördert. Diese Zellen waren scheinbar befähigt, sich in andere spezifische Zelltypen entwickeln zu können (ebd.). Kolios und Moodley (2013) charakterisieren Stammzellen daher anhand der drei Merkmale Klonalität, Selbsterneuerung und Potenz. Stammzellen gehen regelhaft aus einer einzigen Zelle hervor, können unbegrenzt proliferieren und sich in verschiedene Zelltypen differenzieren (ebd.). Im gesunden Gewebe können adulte Stammzellen in einer Nische ruhen, sich in Folge von Gewebeläsionen und -reparaturen jedoch aktiv vermehren (Falanga, 2012). Damit nehmen Stammzellen eine zentrale Rolle in der Gewebemöostase ein und ersetzen differenzierte Zellen, in denen zelluläre Seneszenz oder Apoptose induziert wurde (Li & Xie, 2005). Aufgrund dieser Eigenschaften gilt die Kultivierung und Transplantation von Stammzellen als bedeutsame Therapieoption in der regenerativen Medizin, um die Gewebeerneuerung im Rahmen altersbedingter Erkrankungen, wie chronisch ischämischer Herzkrankheiten (Perin et al., 2012), Morbus Alzheimer (Magga et al., 2012) oder Lungenfibrose (Tzouvelekis et al., 2011), zu fördern.

Wird das sensible Gleichgewicht zwischen Differenzierung, Zelltod und Selbsterneuerung durch endo- und exogene Stressoren gestört, kann die Stammzellfähigkeit jedoch ähnlich wie die zelluläre Seneszenz zur Tumorprogression beitragen. Aufgrund der Bedeutung von Stammzellen in der Entwicklungsbiologie und Gewebedifferenzierung entstand die Theorie, dass auch das Wachstum maligner Tumoren primär von undifferenzierten Zellen initiiert wird (Tran et al., 2010). Diese sogenannte Krebsstammzellhypothese findet immer breitere Akzeptanz in der onkologischen Forschung. Diesbezüglich wurde in zahlreichen Untersuchungen versucht, Krebsstammzellen anhand von spezifischen Markern zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass eine verringerte Expression der Stammzellmarker Oct-4, Nanog und CD133 im Mausmodell das Tumorstadium reduzieren kann. Umgekehrt besteht klinisch eine Korrelation zwischen einer hohen Expression dieser Marker und einer geringeren Überlebensrate von Melanom-Patienten (Meier et al., 2016). Auch in histologischen Proben des Harnblasenkarzinoms ist die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-4 im Vergleich zu nicht-tumorösen Biopsien signifikant gesteigert (Atlasi et al., 2007). Analog sind hohe Expressionslevel von Oct-4, Sox-2 und Nanog mit dem Auftreten von Tumorrezidiven in der Harnblase assoziiert (Huang et al., 2012; Siddiqui et al., 2020; Zhan et al., 2020). Dagegen kann das spezifische Ausschalten von Sox-2 *in vitro* und *in vivo* die Chemosensitivität und Tumorregression fördern (Chen et al., 2019; Zhu et al., 2017). Diese Studien implizieren, dass die gezielte Manipulation der Stammzellmarker im Harnblasenkarzinom eine potentiell gewinnbringende Therapiestrategie sein könnte.

Takahashi und Yamanaka (2006) entdeckten, dass die Expression der vier Gene c-Myc, Klf-4, Oct-4 und Sox-2, die seitdem als Yamanaka-Faktoren bezeichnet werden, die Reprogrammierung somatischer Zellen in pluripotente Stammzellen induzieren kann. Basierend auf diesem Wissen konstruierten Tang et al. (2015) ein stammzellspezifisches Expressionsplasmid. Der Promoter, welcher eine Bindestelle für die Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4 besitzt und damit nur in Zellen mit Stammzellfaktoren aktiv ist, wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Krebsstammzellen aus Harnblasenkarzinomzelllinien zu selektieren. In der Durchflusszytometrie wurden nach Transduktion eines lentiviralen Vektors, bei dem die für GFP und Progerin kodierende cDNA unter der Kontrolle des induzierbaren Promoters steht, in der aggressiven Zelllinie UM-UC-3 die meisten GFP-positiven Zellen detektiert. Dagegen stellten sich in den weniger invasiven Zelllinien RT-4 und T24 nur wenige Sore6-positive Zellen dar. Diese Ergebnisse decken sich mit dem initialen Screening zur Expression der Stammzellmarker. Hierbei zeigte sich in UM-UC-3 die höchste mRNA-Expression von Sox-2 und Oct-4, was konsistent zur Selektion durch die Durchflusszytometrie erscheint. Weiterhin stimmen diese Ergebnisse mit anderen Studien, in welchen das Sore6-Konstrukt verwendet wurde, überein. In der erstmaligen Nutzung des Systems zeigten Brustkrebszellen, die durch den Reporter markiert wurden, im Vergleich zur restlichen Zellpopulation eine erhöhte Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Metastasenbildung sowie eine gesteigerte Chemoresistenz (Tang et al., 2015). Ähnliche tumorfördernde Eigenschaften weisen die Sore6-positiven Zellen auch in Zelllinien des Lymphoms, Sarkoms, Prostata- und Magenkarzinoms auf (Li et al., 2021; Menendez et al., 2020; Pádua et al., 2020; Vaddi et al., 2019). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass mittels des verwendeten Sore6-Elementes tatsächlich Harnblasenkrebszellen mit stammzellspezifischen Eigenschaften isoliert werden konnten.

Die mittels Durchflusszytometrie aus Harnblasenkarzinomzelllinien isolierten Krebsstammzellen zeigten in Folge der Progerin-Expression eine verringerte Proteinexpression der Stammzellmarker. Gegenüber der Kontrolle ließ sich eine signifikante Verminderung der Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4 nachweisen. Dieser Verlust des Stammzellreservoirs lässt sich gleichermaßen in HGPS-Patienten beobachten. Die Expression von Progerin verringert die Proliferationskapazität und geht mit einer verminderten Population adulter Stammzellen einher (Espada et al., 2008; Rosengarten et al., 2011). Möglicherweise wird das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen durch die Progerin-Expression verändert. So weisen Progerin-exprimierende Stammzellen gewebespezifische und für Stammzellen untypische Differenzierungsmarker auf (Scaffidi & Misteli, 2008). Auch Zhang et al. (2011) zeigten, dass die Expression von Progerin insbesondere in Stammzellen Kernanomalien verursacht. Dagegen bleiben differenzierte Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, von der Progerin-Expression eher unbeeinflusst (Zhang et al., 2011). Der Verlust von Stammzellen erklärt wahrscheinlich auch, warum das Hutchinson-Gilford-Syndrom vorrangig Einfluss auf Gewebe mit mechanischer Belastung und hohem Zellumsatz, wie der Haut, nimmt (Halaschek-Wiener & Brooks-Wilson, 2007).

Daneben scheint auch die Überexpression von Lamin A/C die Proteinexpression der Stammzellmarker beeinflussen zu können. Im Vergleich zur Kontrolle waren insbesondere die Proteinlevel der Transkriptionsfaktoren Sox-2 und c-Myc nach Lamin A/C-Überexpression in den Sore6-positiven Zellen vermindert. Grund dafür könnte sein, dass die A-Typ-Lamine primär in differenzierten Zellen exprimiert werden (Constantinescu et al., 2006). Dagegen kann in embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen kein endogenes Lamin A/C nachgewiesen werden (Halaschek-Wiener & Brooks-Wilson, 2007). Kongruent dazu wird die Embryonalentwicklung von Mäusen, in denen die Expression von A-Typ-Laminen unterdrückt wurde, nicht beeinträchtigt (Sullivan et al., 1999). Scaffidi und Misteli (2008) stellten zudem dar, dass die Überexpression von Lamin A HGPS-ähnliche Zelldefekte initiieren kann und mit einer gesteigerten Expression von Differenzierungsmarkern einhergeht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Überexpression von Lamin A/C zumindest partiell eine Differenzierung von Krebsstammzellen in gewöhnliche differenzierte Tumorzellen eingeleitet hat.

Fraglich bleibt, warum die zellunspezifische Expression von Lamin A/C bzw. Progerin im Vergleich zur stammzellspezifischen Expression einen inversen Effekt hatte. Sowohl in der Lamin A/C- als auch in der Progerin-exprimierenden Gesamttumorpopulation zeigte sich eine gesteigerte Expression der Stammzellmarker. Gleichermäßen ist im Mausmodell das Wachstum von Prostatakarzinomen nach Injektion von Progerin signifikant gesteigert (Tang et al., 2010). Möglicherweise haben diese Zellen durch die Progerin-Expression stammzellspezifische Eigenschaften, wie Selbsterneuerung und unbegrenzte Proliferation, erworben. Der Effekt der Expression von A-Typ-Laminen könnte vom spezifischen Zelltyp abhängen. So wird die physiologische Form Lamin A/C in einer Vielzahl maligner Tumore vermindert exprimiert (vgl. 1.3.2), während beispielsweise maligne Tumoren der Haut eine erhöhte Expression der A-Typ-Lamine aufweisen (Tilli et al., 2003). Daneben stellten Willis et al. (2008) dar, dass A-Typ-Lamine wie erwartet in differenzierten Enterozyten exprimiert werden. Entgegen der Ursprungshypothese kann die Isoform Lamin A jedoch auch in der Kryptenbasis, der Nische von Darmstammzellen, detektiert werden (ebd.). Auch innerhalb eines Gewebes kann die endogene Expression von Lamin A/C variieren. So werden A-Typ-Lamine in Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms stark exprimiert, lassen sich in Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms jedoch nicht nachweisen (Guinde et al., 2018). Scheinbar ist die Funktion und Wirkungsweise der Lamine nicht nur abhängig vom jeweiligen Ursprungsgewebe, sondern auch vom Differenzierungsgrad der Zelle. Eine erhöhte Expression des Kernmembranproteins kann die zelluläre Identität möglicherweise je nach histologischem Subtyp bidirektional beeinflussen. Diesbezüglich ist weitere Forschung nötig, um die Wirkweise der A-Typ-Lamine und des mutierten Progerin in Abhängigkeit vom molekularen Kontext spezifischer einordnen zu können.

4.3 Die Epithelial-mesenchymale Transition im Harnblasenkarzinom

Die EMT ist ein physiologischer Prozess, welcher während der Embryonalentwicklung zur Implantation der befruchteten Eizelle (Chen et al., 2017), Gastrulation (Nakaya et al., 2008), Ausbildung der Neuralrinne (Theveneau & Mayor, 2012) und Organogenese (Gros & Tabin, 2014; Martínez-Estrada et al., 2010) beiträgt. In Folge von Entzündungen und anschließender Wundheilung kann die EMT analog in differenziertem Gewebe erfolgen (Banerjee et al., 2015; Correa-Costa et al., 2014). Auch Tumorzellen können im Rahmen der malignen Progression die Fähigkeit zur EMT erwerben. Die damit verbundene Eigenschaft, sich aus dem Zellverband lösen und entlang der extrazellulären Matrix aktiv migrieren zu können, begünstigt das invasive Wachstum und die Metastasierung von Primärtumoren (Diepenbruck & Christofori, 2016).

Hierzu ist die Aktivierung EMT-spezifischer Gene notwendig, wohingegen Gene der epithelialen Differenzierung herabreguliert werden (De Craene & Berx, 2013). Dieses charakteristische Genexpressionsmuster zeigt sich auch in Zellen des Harnblasenkarzinoms. So zum Beispiel werden durch die Unterdrückung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin die Zellpolarität und Zell-Zell-Kontakte aufgehoben (Puisieux et al., 2014). Dementsprechend ist der Verlust von E-Cadherin im Harnblasenkarzinom mit einem verringerten rezidiv- und progressionsfreien Überleben assoziiert (Yang et al., 2020; Ziaran et al., 2020). Dagegen reduziert eine Hochregulierung der E-Cadherin-Expression das Wachstums- und Metastasierungspotential von Harnblasenkarzinomzellen (C. Li et al., 2018). Der funktionelle Antagonist N-Cadherin wird im Urothel normalerweise nicht exprimiert, korreliert im Harnblasenkarzinom jedoch mit höheren Tumorstadien und postoperativen Rezidiven (Lascombe et al., 2006; Muramaki et al., 2012). N-Cadherin kann die Zellmigration fördern, indem es über transmembranöse Anteile Kontakt zur extrazellulären Matrix herstellt (Cavallaro & Christofori, 2004). Die Wandlung in einen mesenchymalen Phänotyp wird zudem über die Expression des Intermediärfilaments Vimentin induziert. Analog dazu wurde beschrieben, dass eine Vimentin-Expression im Harnblasenkarzinom mit einem erniedrigten progressionsfreien Überleben der Patienten verbunden ist (Zhao et al., 2014). Dieser sogenannte *cadherin switch* und die Wandlung der Zellmorphologie werden durch mehrere Transkriptionsfaktoren initiiert. Dazu zählen im Harnblasenkarzinom unter anderem die gesteigerte Expression von Slug und Snail1, die insbesondere die Repression von E-Cadherin induzieren (Salehi et al., 2017; Wu et al., 2013).

Vor dem Hintergrund der essenziellen Bedeutung von Krebsstammzellen liegt es nahe, dass insbesondere die Krebsstammzellen zur EMT befähigt sind. Im kolorektalen Adenokarzinom korreliert die Expression von CD133 mit einem erhöhten Expressionsniveau der EMT-Marker (Choi et al., 2017). Auch Brustkrebszellen zeigen nach Induktion der EMT, beispielsweise durch die Überexpression von Slug, ein stammzellspezifisches Genexpressionsmuster (Bhat-Nakshatri et al., 2010; Vijay et al., 2019; S. S. Wang et al., 2015). Gleichermaßen weisen zirkulierende Tumorzellen eine erhöhte Expression von

Oct-4, Sox-2 und Nanog auf (Liu et al., 2018). Umgekehrt können die stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren die EMT durch eine direkte Interaktion mit Slug initiieren (Gao et al., 2015; Wang et al., 2014). Die enge Beziehung zwischen EMT-Stimuli und Krebsstammzellen zeigt sich auch auf therapeutischer Ebene. Wirkstoffe, deren primäres Ziel die Hemmung der EMT ist, unterdrücken regelhaft auch stammzellspezifische Signalwege (Babaei et al., 2021). Exemplarisch kann Curcumin sowohl die Expression von EMT-Markern als auch stammzellähnliche Eigenschaften von Harnblasentumorzellen inhibieren (Liang et al., 2017).

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der EMT und Krebsstammzellen konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die abnehmende Expression der Stammzellmarker aufgrund der Progerin-Expression ging in isolierten Krebsstammzellen mit einer verminderten Proteinexpression der EMT-Marker einher. N-Cadherin und Vimentin, die in der Kontrollpopulation stark exprimiert wurden, waren nach Expression von Progerin nur noch marginal detektierbar. Dementsprechend verhielten sich auch die Transkriptionsfaktoren Slug und Snail1. Dagegen wurde das Adhäsionsmolekül E-Cadherin nach Progerin-Expression vermehrt exprimiert. Die Lamin A/C-exprimierenden Krebsstammzellen zeigten eine ähnliche Tendenz. Insbesondere die Proteinlevel von N-Cadherin und Slug waren nach Überexpression des Kernmembranproteins deutlich vermindert. Die Assays zur Messung der Migrations- und Invasionsfähigkeit der Krebsstammzellen korrelierten mit den durchgeführten Western Blots. Dies bestätigt den inhibitorischen Einfluss von Progerin und Lamin A/C auf die Metastasierungskapazität der Harnblasenkrebsstammzellen nicht nur auf molekularer, sondern auch auf funktioneller Ebene.

Als mögliche Mechanismen hinter dem anti-metastatischen Effekt der Expression von Lamin A/C bzw. Progerin in Krebsstammzellen könnten mehrere Signalkaskaden in Frage kommen. So zum Beispiel weisen HGPS-Patienten einen deregulierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg auf (Espada et al., 2008). Im Mausmodell reduziert die Expression von Progerin die Aktivität von β -Catenin signifikant, was zu einer fehlerhaften Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix führt (Hernandez et al., 2010). Auch Genexpressionsanalysen zeigen, dass Komponenten, welche an der Organisation des Zytoskelettes und der extrazellulären Matrix beteiligt sind, in Fibroblasten von HGPS-Patienten mehrheitlich dereguliert sind (Csoka et al., 2004). Song et al. (2014) konnten dies präzisieren und stellten dar, dass die Expression von Progerin im Mausmodell insbesondere die Expression von Vimentin verringert. Dies könnte erklären, warum Fibroblasten von HGPS-Patienten eine reduzierte Fähigkeit zur Migration und Wundheilung aufweisen (Verstraeten et al., 2008). Neben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg erscheint in Patienten mit dem Hutchinson-Gilford-Syndrom auch die Notch-Signalkaskade dereguliert. Scaffidi und Misteli beschrieben 2008, dass Progerin die Sequestrierung des Notch-Koaktivators SKIP inhibiert. Dadurch werden mehrere nachgeschaltete Effektorproteine verstärkt aktiviert (Scaffidi & Misteli, 2008).

Interessanterweise sind beide beschriebenen Signalkaskaden auch mit der EMT und Stammzellfähigkeit assoziiert (Babaei et al., 2021). Die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade reguliert physiologischerweise die Zellproliferation und den Erhalt der Stammzellen und nimmt damit eine zentrale Rolle in der Regeneration des normalen Urothels ein (Mohammed et al., 2016; Shin et al., 2011). Eine Deregulation der Signalkaskade wurde unter anderem im Kolon-, Lungen- und Brustkrebs beschrieben (Abugomaa et al., 2020). Einzelnukleotid-Polymorphismen in Genen, welche Teil des Wnt/ β -Catenin-Signalweges sind, scheinen maßgeblich an der Urothelkarzinogenese beteiligt zu sein (Pierzynski et al., 2015). Insbesondere fördert die Akkumulation von β -Catenin das Invasionspotential von Zellen des Harnblasenkarzinoms (Kastritis et al., 2009). Daneben verleiht die vermehrte Expression von Wnt6 den Tumorzellen eine gesteigerte Resistenz gegenüber Cisplatin und Gemcitabin (Pan et al., 2016). Der Notch-Signalweg stabilisiert den epithelialen Phänotyp und fungiert in der Harnblase als Tumorsuppressor (Maraver et al., 2015). Funktionsverlustmutationen in Notch-Rezeptoren sind mit myeloischen Leukämien, Ösophagus- und Lungenkarzinomen assoziiert (Ntziachristos et al., 2014). Auch Harnblasenkarzinome weisen in bis zu 60 % aller Fälle eine Deregulation in Komponenten der Notch-Signalkaskade auf (Rampias et al., 2014). Ein Verlust von Notch-1 fördert die Expression von Snail1, Slug und Vimentin und folglich die Ausbildung invasiver Merkmale von Harnblasenkrebszellen (Maraver et al., 2015). Dagegen kann eine Überexpression von Notch2 und Notch3 die Zellproliferation und Chemoresistenz im Harnblasenkarzinom steigern (Hayashi et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Die Manipulation der beiden EMT-fördernden Signalkaskaden könnte einerseits erklären, warum die Expression von Progerin in Stammzellen des Harnblasenkarzinoms einen anti-metastatischen Effekt hatte. Andererseits könnte dies der Grund sein, warum Patienten des Hutchinson-Gilford-Syndroms trotz der DNA-Schäden nur selten an Krebs erkranken. Halaschek-Wiener und Brooks-Wilson (2007) vermuten, dass Progerin den Stammzellpool erschöpft und eine maligne Transformation somit vorzeitig unterbrochen wird. Diese These wird durch die vorliegende Arbeit untermauert. Analog dazu stagniert auch die Inzidenzrate für Krebserkrankungen ab dem 80. Lebensjahr (DePinho, 2000). In diesem Alter könnte das Stammzellreservoir bereits mehrheitlich verbraucht sein, was letztlich zu einem verminderten Entartungsrisiko führen könnte (Halaschek-Wiener & Brooks-Wilson, 2007).

Konträr zu den Krebsstammzellen zeigte die Gesamttumorpopulation nach Lamin A/C- bzw. Progerin-Expression einen Zuwachs der metastatischen Kapazität. Kongruent zur Stammzellfähigkeit steigerten die Lamine in den Harnblasenkrebszellen die Expression der EMT-Marker und induzierten eine Abnahme des Levels von E-Cadherin. Diese Invasivitätssteigerung bestätigte sich auch im Scratch und Boyden-Chamber Assay. Es liegt daher nahe, dass nicht nur der Effekt des Progerins auf den Differenzierungsstatus, sondern auch der Einfluss auf die metastatische Fähigkeit vom molekularen Kontext abhängt. Auch im kolorektalen Karzinom inhibieren A-Typ-Lamine die Expression von E-Cadherin. Dies führt zu einer gesteigerten Invasivität und einem signifikant reduzierten

Patientenüberleben (Willis et al., 2008). Eine ähnliche tumorfördernde Wirkung zeigt sich auch bei Patienten, die an einem Glioblastoma multiforme leiden (Gatti et al., 2021). Daneben identifizierten Setti Boubaker et al. (2021) Lamin A/C als möglichen diagnostischen Biomarker, um Patienten mit einem nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom von gesunden Patienten zu unterscheiden. Diese Untersuchungen unterstreichen die dualistische Funktion der Lamine. Perspektivisch sind weitere Studien nötig, um die Ursachen für die Diskrepanzen zwischen den Zelltypen erklären zu können. Als Abschluss der Diskussion sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismen mithilfe von Tabelle 4.1 zusammengefasst werden.

Tabelle 4.1: Übersicht zum Effekt der Progerin-Expression auf die untersuchten Zelltypen

Zelltyp Eigenschaft	Normale Fibroblasten	Normale Tumorzellen	Isolierte Krebsstammzellen	Möglicher Mechanismus
Seneszenz	↑	---	---	Interaktion zwischen pRB und Laminen
Stammzellreservoir	/	↑	↓	Wnt/ β -Catenin-Signalweg
Metastasierungsfähigkeit	/	↑	↓	Notch-Signalkaskade
Abk.: erniedrigt (↓), erhöht (↑), unverändert (---), nicht untersucht (/)				

Zunächst wurde der Effekt einer Progerin- bzw. Lamin A/C-Überexpression auf die zelluläre Seneszenz untersucht. Während Progerin-exprimierende karyotypisch normale Fibroblasten Zeichen zellulärer Seneszenz zeigten, war nach Progerin-Expression weder in der Tumorgesamtpopulation noch in isolierten Krebsstammzellen ein Anstieg der Seneszenz-Marker zu beobachten. Die enge Wechselwirkung zwischen pRB und Laminen, die in Patienten mit HGPS wahrscheinlich zu der beschleunigten Alterung führt (Marji et al., 2010), könnte erklären, warum normale Fibroblasten durch Progerin-Expression in den Zellzyklusarrest eintreten. Dagegen könnte die Inaktivierung der Zellzyklusregulatoren p53 (Fujimoto et al., 1992) und pRb (Mitra et al., 2007) im Harnblasenkarzinom Ursache für die Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer Seneszenz-Induktion durch Progerin sein. Im folgenden Arbeitsschritt wurde festgestellt, dass Progerin-exprimierende Krebsstammzellen Stammzellmarker vermindert exprimieren. Ein möglicher molekularer Mechanismus, der sowohl mit dem erschöpften Stammzellreservoir von Patienten mit HGPS (Espada et al., 2008) als auch mit der Bildung von Krebsstammzellen (Babaei et al., 2021) assoziiert ist, ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Abschließend wurden Veränderungen auf das Metastasierungspotential der Harnblasenkarzinomzellen nachgewiesen. Dabei könnte die Notch-Signalkaskade, die bei HGPS-Patienten dereguliert ist (Scaffidi & Misteli, 2008), der zugrundeliegende Mechanismus hinter der tumorsuppressiven Wirkung von Progerin auf Stammzellen des Harnblasenkarzinoms sein.

4.4 Beurteilung der verwendeten Methoden und Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in mehrfacher Hinsicht klinisch relevant und bieten neue Erkenntnisse hinsichtlich der spezifischen Therapie von Krebsstammzellen. Teile der Ergebnisse decken sich mit den initial formulierten Hypothesen und publizierten Daten. Andererseits stellten sich einige Ergebnisse konträr zu den ursprünglichen Erwartungen und aktuellen Studien dar. Diesbezüglich soll in dem folgenden Kapitel erörtert werden, inwiefern die Ergebnisse hinsichtlich der verwendeten Methoden verwertbar sind.

Es wurden zunächst lentivirale Expressionssysteme entwickelt, welche Progerin bzw. Lamin A/C einerseits zellunspecific in der Gesamttumorpopulation und andererseits spezifisch in den Krebsstammzellen exprimierten. Ein Nachteil bei der Verwendung lentiviraler Vektoren besteht darin, dass der Einbau des Transgens in beliebige Bereiche der Wirts-DNA erfolgen kann. Wenn das Gen in Stellen, in denen die Transkription gedrosselt oder ausgeschaltet ist, integriert wird, wird das Transgen nicht in ausreichender Menge exprimiert. Daneben besteht die Gefahr einer Insertionsmutagenese nach Integration in das Genom des Wirts (Laufs et al., 2004). Daher wurden alle Experimente mit einer GFP-Kontrolle durchgeführt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte vom verwendeten Vektor verursacht wurden. Zur effizienteren Vermeidung klonaler Effekte wäre es zudem optimal gewesen, auch nach der lentiviralen Transduktion des zellunspecificen Systems eine durchflusszytometrische Einzelzellselektion durchzuführen. Daneben weisen die beiden Konstrukte ein unterschiedliches lentivirales Ausgangsplasmid auf, welches die Tumorzellen möglicherweise verschieden beeinflusst haben könnte. So zum Beispiel induzieren die zellunspecificen Plasmide die Expression eines Fusionsproteins aus GFP und Progerin bzw. Lamin A/C. Da die Lamine wichtige Strukturproteine des Zellkerns sind, könnte somit auch das direkt gekoppelte GFP einen molekularen Einfluss auf die Zellkernmembran genommen haben. Zum besseren Vergleich würde es sich daher anbieten, in Zukunft das gleiche Rückgrat zu verwenden.

Bezüglich des krebstammzellspezifischen Konstruktes muss festgehalten werden, dass der Sore6-Promoter trotz der guten Studienlage nicht mit endgültiger Sicherheit Krebsstammzellen des Harnblasenkarzinoms identifiziert haben muss. Hierbei muss unter anderem berücksichtigt werden, dass die Viruslast der mittels Calcium-Phosphat-Transfektion hergestellten Lentivirus-Suspensionen nicht bestimmt wurde. Mittels einer vorherigen Quantifizierung der lentiviralen Partikel je Milliliter hätte man sicherstellen können, dass alle Zelllinien unabhängig vom verwendeten Plasmid während der Inkubationszeit der Transduktion der gleichen Viruslast ausgesetzt worden wären. Daneben weist jede Zelllinie eine spezifische Transduktionseffizienz auf. So ist der Transduktionserfolg für die Zelllinie T24 erfahrungsgemäß oftmals sehr hoch, während sich die Zelllinie RT-4 lentiviral schwerer transduzieren lässt. Diese äußeren Faktoren und technischen Gegebenheiten müssen insbesondere

beachtet werden, wenn die absoluten Zahlen der identifizierten Krebsstammzellen zwischen den Zelllinien verglichen werden.

Nach der lentiviralen Transduktion wurden die Untersuchungen zum Einfluss auf die zelluläre Seneszenz sowie der Stammzell- und Metastasierungskapazität durchgeführt. Hierbei wurden die Experimente mit dem Sore6-System zeitlich getrennt von den Versuchen des zellunspezifischen Konstruktes durchgeführt. Für einen besseren Vergleich der zellspezifischen Effekte sollten die jeweiligen Experimente perspektivisch zeitgleich umgesetzt werden. Die Expression der Stammzellmarker wurde mittels qPCR auf RNA-Ebene sowie mittels Western Blot auch auf Proteinebene gemessen. Ein Effekt der Lamin-Expression zeigte sich hierbei vor allem auf Proteinebene. Dies könnte darauf hindeuten, dass Lamin A/C und Progerin insbesondere posttranslational wirken. Zur Validierung der durchgeführten Western Blots könnten sensitivere Methoden wie *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* oder immunhistochemische Untersuchungen ergänzt werden. Daneben wurde die Expression der Stammzellmarker zwar quantitativ gemessen, der funktionelle Einfluss auf die Stammzellkapazität wurde jedoch nicht untersucht. Diesbezüglich könnten die Daten der vorliegenden Arbeit gestärkt werden, wenn zusätzlich auch dynamische Untersuchungen wie Koloniebildungsassays durchgeführt werden.

Abschließend lässt sich kritisch erwähnen, dass für den experimentellen Ansatz der vorliegenden Arbeit lediglich Zelllinien des Harnblasenkarzinoms verwendet wurden. Es ist daher aktuell nicht möglich, den beobachteten Effekt der Lamin A/C- bzw. Progerin-Expression in Harnblasenkrebszellen auf andere Tumorentitäten zu übertragen. Falls das etablierte Konstrukt in Zukunft auch in anderen Karzinomen genutzt wird, könnten die Erkenntnisse der Arbeit besser eingeordnet und je nach Effekt möglicherweise sogar verallgemeinert werden.

5 Ausblick

Nicht nur beim Harnblasenkarzinom ist die systemische Chemotherapie ein Kernbestandteil von kurativen und palliativen Behandlungsoptionen. Die zellunspezifische zytostatische Wirkung ist jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Hierzu zählen unter anderem Übelkeit und Erbrechen, Diarrhö, Nephrotoxizität oder eine Knochenmarksdepression (Schirmacher, 2019). Daneben ist die konventionelle Chemotherapie nicht zwangsläufig mit einem Therapieerfolg verbunden. Im Jahr 2012 registrierte die WHO 14 Millionen neue Krebserkrankungen. Im gleichen Jahr starben bis zu 8,2 Millionen Menschen an einem malignen Tumor (McGuire, 2016). Im Hinblick auf diese ernüchternden Zahlen und die gravierenden Nebenwirkungen einer chemotherapeutischen Behandlung vollzog sich in der Krebsforschung eine Abkehr von der Suche nach neuen Zytostatika. Vielmehr gilt der aktuelle Schwerpunkt der Entwicklung zielgerichteter Therapien, die beispielsweise die tumorfördernde Wirkung von Genmutationen spezifisch begrenzen können (Schirmacher, 2019). Exemplarisch sei hier der Einsatz des ersten Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib genannt. Durch eine direkte Blockade der konstitutiv aktiven Rezeptorkinase wird eine unkontrollierte Zellproliferation inhibiert, weswegen die 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie mittlerweile fast 84 % beträgt (Hochhaus et al., 2017).

Auch in dieser Arbeit wurde ein spezifisches Therapiekonstrukt entwickelt. Ziel des Systems waren jedoch nicht Gendefekte, sondern Krebsstammzellen. Diese zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika aus und sind daher verantwortlich für Tumorrezidive nach konventioneller Therapie (Tran et al., 2010). Im Verlauf der Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Expression von Progerin und Lamin A/C antimetastatische Effekte auf Stammzellen des Harnblasenkarzinoms hat. Um aus diesem Ergebnis einen klinischen Nutzen zu generieren, ist eine intensivere Forschung zur Wirkweise von Progerin notwendig. Insbesondere sollte der molekulare Mechanismus, der der tumorsuppressiven Wirkung der Progerin-Expression zugrunde liegt, identifiziert werden. Die Diskussion hat gezeigt, dass dafür der Wnt/ β -Catenin- und Notch-Signalweg in Frage kommen könnten. Hierbei würde eine Hochdurchsatz-Sequenzierung einen generellen Überblick über das Genom Progerin-exprimierender Zellen geben. Da die A-Typ-Lamine auch posttranslational wirken können, müsste die RNA-Sequenzierung wahrscheinlich um Proteinanalyseverfahren ergänzt werden. So könnte spezifisch untersucht werden, ob Komponenten der beiden Signalkaskaden in Progerin-exprimierenden Stammzellen Veränderungen aufweisen. Um die divergenten Effekte von Lamin A/C und Progerin zwischen gewöhnlichen Tumorzellen und isolierten Krebsstammzellen besser nachvollziehen zu können, sollte zudem ein Plasmid, welches die Expression der A-Typ-Lamine unterdrückt, konstruiert werden. Dies könnte die Frage klären, ob und

wie der potentiell tumorfördernde Effekt von Progerin auf gewöhnliche Tumorzellen vermieden werden kann.

Die verminderte Expression der EMT- und Stammzellmarker in isolierten Harnblasenkrebsstammzellen lässt zudem die Vermutung zu, dass Progerin-exprimierende Krebsstammzellen chemosensitiver sein könnten. Dies sollte perspektivisch mittels Zystostatikaresistenzmessungen durch XTT-Assays oder Durchflusszytometrieanalysen geprüft werden. Sollten sich diese Hypothese und die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit auch in anderen Zelllinien oder sogar in Tierversuchen bestätigen, könnte dies den Weg für ein neues Therapiemodell ebnen. In einem ersten Therapieschritt könnte eine stammzellspezifische Expression von Progerin das Reservoir an aggressiven und chemoresistenten Krebsstammzellen erschöpfen. In einem direkt anschließenden Therapieschritt erfolgt die Durchführung einer systemischen Chemotherapie, welche die restlichen Tumorzellen effizienter abtöten könnte. An einer derartigen zweistufigen Therapiestrategie wird beispielsweise auch im Pankreaskarzinom geforscht. Die Gabe des Rho-Kinase-Inhibitors Fasudil, ursprünglich zur Behandlung von Schlaganfällen eingesetzt, verbessert im Mausmodell die Wirksamkeit einer nachfolgenden Chemotherapie. Diesen Effekt bezeichnet die Arbeitsgruppe als *Priming* des Tumorgewebes (Vennin et al., 2017). Die vorliegende Arbeit gibt erstmalig Hinweise darauf, dass auch Progerin ein geeigneter Kandidat zur Ergänzung einer konventionellen Chemotherapie sein könnte.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Das finale Stadium einer Krebserkrankung wird durch eine Zellsubpopulation, den sogenannten Krebsstammzellen, induziert. Diese haben die Fähigkeit, die Tumorphilipulation zu verjüngen und die metastatische Kapazität zu fördern. Selbst wenn Krebsstammzellen gezielt abgetötet werden, entdifferenzieren sich die umgebenden Tumorzellen und ersetzen angegriffene Krebsstammzellen. Daher bestand der potentielle Therapieansatz dieser Arbeit in der Beschleunigung ihrer Seneszenz, die eine natürliche Barriere gegen die Karzinogenese darstellt. Hierzu wurde Progerin, eine mutierte Form des Kernmembranproteins Lamin A/C, genutzt. Progerin verursacht das Hutchinson-Gilford-Syndrom, eine seltene genetische Erkrankung, die durch beschleunigte Altersprozesse charakterisiert ist.

Methoden: Es wurde ein lentivirales Konstrukt etabliert, dessen Promoter, der für die Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4 responsiv ist, eine stammzellspezifische Progerin-Expression in Zelllinien des Harnblasenkarzinoms induziert. Der Effekt auf die zelluläre Seneszenz, Stammzell- und Metastasierungsfähigkeit wurde auf RNA- und Proteinebene sowie in funktionellen Experimenten untersucht. Zum Vergleich der stammzellspezifischen Wirkung wurden alle Versuche auch mit einem zellunspecificen Konstrukt und der physiologischen Form Lamin A/C durchgeführt.

Ergebnisse: Während normale Fibroblasten nach Progerin-Expression Zeichen zellulärer Seneszenz zeigten, waren Harnblasenkarzinomzellen resistent gegenüber einer Seneszenz-Induktion durch Progerin. In normalen Tumorzellen korrelierte die Progerin-Expression mit einer Hochregulierung von Stammzellmarkern und förderte die Metastasierungsfähigkeit. Im Gegensatz dazu zeigten Progerin-exprimierende Krebsstammzellen eine Reduktion der Stammzellkapazität, Migration und Invasivität. Darüber hinaus waren metastasierungsrelevante Biomarker der Epithelial-mesenchymalen Transition in Krebsstammzellen herabreguliert.

Ausblick: Die vorliegende Arbeit liefert ein Therapiemodell zur spezifischen Behandlung von Krebsstammzellen. Von vorrangigem Interesse ist die Identifizierung des molekularen Mechanismus hinter dem antimetastatischen Effekt der krebsstammzellspezifischen Progerin-Expression. Hierbei sollten insbesondere die Wnt/ β -Catenin- und Notch-Signalkaskaden untersucht werden. Zeigt sich in Zytostatikaresistenzmessungen eine gesteigerte Sensitivität Progerin-exprimierender Krebsstammzellen, könnte Progerin ein geeigneter Kandidat zur Ergänzung einer konventionellen Chemotherapie sein.

7 Thesen

1. Die Aggressivität der verwendeten Zelllinien des Harnblasenkarzinoms korreliert mit der mRNA-Expression der stammzellspezifischen Yamanaka-Faktoren Sox-2 und Oct-4.
2. Die Nutzung des Sore6-Promoters eignet sich, um Krebsstammzellen des Harnblasenkarzinoms zu identifizieren.
3. Die Expression von Progerin kann in karyotypisch normalen Fibroblasten zelluläre Seneszenz induzieren.
4. Sowohl gewöhnliche Tumorzellen als auch Krebsstammzellen des Harnblasenkarzinoms sind gegenüber einer Seneszenz-Induktion durch die Expression von Progerin resistent.
5. Die Expression von Progerin bzw. Lamin A/C steigert in Harnblasenkrebszellen die Expression der Stammzellmarker sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene.
6. Das Proteinlevel der EMT-Marker ist in Progerin- bzw. Lamin A/C-exprimierenden Tumorzellen gesteigert. Dies geht mit einer erhöhten Potenz zur Migration und Invasion einher.
7. Die krebbsstammzellspezifische Expression von Progerin oder Lamin A/C induziert im Harnblasenkarzinom eine Erschöpfung der Stammzellmarker.
8. Analog zur verminderten Stammzellfähigkeit zeigen Progerin- und Lamin A/C-exprimierende Krebsstammzellen auf Proteinebene und in funktionellen Untersuchungen eine Reduktion der Metastasierungsfähigkeit.
9. Die Wirkungen der Progerin-Expression auf die Stammzell- und Metastasierungskapazität korrelieren miteinander. Dies bestätigt, dass die EMT insbesondere von Krebsstammzellen induziert wird.
10. Krebsstammzellen sind eng mit Arzneimittelresistenzen assoziiert. Eine adjuvante Behandlung mit einer stammzellspezifischen Expression von Progerin könnte daher die Wirksamkeit einer systemischen Chemotherapie verbessern.

8 Literaturverzeichnis

- Abugomaa, A., Elbadawy, M., Yamawaki, H., Usui, T., & Sasaki, K. (2020). Emerging Roles of Cancer Stem Cells in Bladder Cancer Progression, Tumorigenesis, and Resistance to Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target for Bladder Cancer. *Cells*, *9*(1), 235.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983-3988.
- Alhudiri, I. M., Nolan, C. C., Ellis, I. O., Elzagheid, A., Rakha, E. A., Green, A. R., & Chapman, C. J. (2019). Expression of Lamin A/C in early-stage breast cancer and its prognostic value. *Breast Cancer. Breast Cancer Research and Treatment*, *174*(3), 661-668.
- Atlasi, Y., Mowla, S. J., Ziaee, S. A., & Bahrami, A. R. (2007). OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *International journal of cancer*, *120*(7), 1598-1602.
- Babaei, G., Aziz, S. G., & Jaghi, N. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *133*, 110909.
- Babjuk, M., Burger, M., Zigeuner, R., Shariat, S. F., van Rhijn, B. W., Compérat, E., . . . European Association of Urology. (2013). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *European Urology*, *64*(4), 639-653.
- Balar, A. V., Castellano, D., O'Donnell, P. H., Grivas, P., Vuky, J., Powles, T., . . . Bellmunt, J. (2017). First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, *18*(11), 1483-1492.
- Banerjee, P., Venkatachalam, S., Mamidi, M. K., Bhonde, R., Shankar, K., & Pal, R. (2015). Vitiligo patient-derived keratinocytes exhibit characteristics of normal wound healing via epithelial to mesenchymal transition. *Experimental Dermatology*, *24*(5), 391-393.
- Barrallo-Gimeno, A., & Nieto, M. A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, *132*(14), 3151-3161.
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, *23*(10), 1124-1134.
- Becker, A. J., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, *197*, 452-454.
- Begicevic, R. R., & Falasca, M. (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), 2362.
- Belt, E. J., Fijneman, R. J., van den Berg, E. G., Bril, H., Delis-van Diemen, P. M., Tijssen, M., . . . Meijer, G. A. (2011). Loss of lamin A/C expression in stage II and III colon cancer is associated with disease recurrence. *European Journal of Cancer*, *47*(12), 1837-1845.
- Berdik, C. (2017). Unlocking bladder cancer. *Nature*, *551*(7679), S34-S35.
- Bhat-Nakshatri, P., Appaiah, H., Ballas, C., Pick-Franke, P., Goulet, R., Jr, B., S., . . . Nakshatri, H. (2010). SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC cancer*, *10*, 411.
- Bidault, G., Garcia, M., Capeau, J., Morichon, R., Vigouroux, C., & Béréziat, V. (2020). Progerin Expression Induces Inflammation, Oxidative Stress and Senescence in Human Coronary Endothelial Cells. *Cells* *9*(5), 1201.
- Boice Jr., J. D., Day, N. E., Andersen, A., Brinton, L. A., Brown, R., Choi, N. W., . . . al. (1985). Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *Journal of the National Cancer Institute*, *74*(5), 955-975.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA - A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394-424.
- Bridger, J. M., & Kill, I. R. (2004). Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Experimental gerontology*, *39*(5), 717-724.

- Cairns, P., Proctor, A. J., & Knowles, M. A. (1991). Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*, *6*(12), 2305–2309.
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews*, *99*(2), 1047-1078.
- Campbell, L. L., & Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, *6*(19), 2332-2338.
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(9), 729-740.
- Canino, C., Mori, F., Cambria, A., Diamantini, A., Germoni, S., Alessandrini, G., . . . Ciocce, M. (2012). SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*, *31*(26), 3148–3163.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *4*(2), 118–132.
- Chan, K. S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., . . . Weissman, I. L. (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 14016-14021.
- Chen, T., You, Y., Jiang, H., & Wang, Z. Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*, *232*(12), 3261–3272.
- Chen, X., Xie, R., Gu, P., Huang, M., Han, J., Dong, W., . . . Lin, T. (2019). Long Noncoding RNA LBCS Inhibits Self-Renewal and Chemoresistance of Bladder Cancer Stem Cells through Epigenetic Silencing of SOX2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *25*(4), 1389–1403.
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., . . . Lowe, S. W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*, *17*(4), 376-387.
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(10), 718-735.
- Choi, J. E., Bae, J. S., Kang, M. J., Chung, M. J., Jang, K. Y., Park, H. S., & Moon, W. S. (2017). Expression of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell markers in colorectal adenocarcinoma: Clinicopathological significance. *Oncology reports*, *38*(3), 1695–1705.
- Cleveland, R. H., Gordon, L. B., Kleinman, M. E., Miller, D. T., Gordon, C. M., Snyder, B. D., . . . Kieran, M. W. (2012). A prospective study of radiographic manifestations in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Pediatric Radiology*, *42*(9), 1089-1098.
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., . . . Wild, C. P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(24), 1827-1839.
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, *10*(1), 51-57.
- Constantinescu, D., Gray, H. L., Sammak, P. J., Schatten, G. P., & Csoka, A. B. (2006). Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *24*(1), 177-185.
- Coppedè, F. (2013). The epidemiology of premature aging and associated comorbidities. *Clinical Interventions in Aging*, *8*, 1023-1032.
- Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29568-29574.
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., . . . Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLOS Biology*, *6*(12), 2853-2868.

- Correa-Costa, M., Andrade-Oliveira, V., Braga, T. T., Castoldi, A., Aguiar, C. F., Origassa, C. S., . . . Câmara, N. O. (2014). Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 94(4), 455–466.
- Csoka, A. B., Cao, H., Sammak, P. J., Constantinescu, D., Schatten, G. P., & Hegele, R. A. (2004). Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *Journal of medical genetics*, 41(4), 304-308.
- Davies, B. S., Coffinier, C., Yang, S. H., Barnes 2nd, R. H., Jung, H. J., Young, S. G., & Fong, L. G. (2011). Investigating the purpose of prelamin A processing. *Nucleus*, 2(1), 4-9.
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews. Cancer*, 13(2), 97-110.
- de la Rosa, J., Freije, J. M., Cabanillas, R., Osorio, F. G., Fraga, M. F., Fernández-García, M. S., . . . López-Otín, C. (2013). Prelamin A causes progeria through cell-extrinsic mechanisms and prevents cancer invasion. *Nature Communications*, 4, 2268.
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., . . . Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer discovery*, 7(2), 165–176.
- DePinho, R. A. (2000). The age of cancer. *Nature*, 408, 248–254.
- Diepenbruck, M., & Christofori, G. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current Opinion in Cell Biology*, 43, 7-13.
- Domen, J., Gandy, K. L., & Weissman, I. L. (1998). Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*, 91(7), 2272-2282.
- Dorner, D., Vlcek, S., Foeger, N., Gajewski, A., Makolm, C., Gotzmann, J., . . . Foisner, R. (2006). Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *The Journal of cell biology*, 173(1), 83-93.
- Douville, J., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 18(1), 17-25.
- Dörr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J. H., . . . Schmitt, C. A. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, 501(7467), 421-425.
- Engelmann, D., & Pützer, B. M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer research*, 72(3), 571-575.
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., . . . Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293-298.
- Espada, J., Varela, I., Flores, I., Ugalde, A. P., Cadiñanos, J., Pendás, A. M., . . . López-Otín, C. (2008). Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *The Journal of cell biology*, 181(1), 27–35.
- Esrig, D., Elmajian, D., Groshen, S., Freeman, J. A., Stein, J. P., Chen, S. C., . . . Cote, R. J. (1994). Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *The New England journal of medicine*, 331(19), 1259–1264.
- Esrig, D., Spruck 3rd, C. H., Nichols, P. W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., . . . Cote, R. J. (1993). p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *The American journal of pathology*, 143(5), 1389–1397.
- Eyler, C. E., & Rich, J. N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), 2839-2845.
- Fairchild, W. V., Spence, C. R., Solomon, H. D., & Gangai, M. P. (1979). The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *The Journal of Urology*, 122(2), 163-164.
- Falanga, V. (2012). Stem cells in tissue repair and regeneration. *The Journal of investigative dermatology*, 132(6), 1538–1541.

- Fan, D. N., & Schmitt, C. A. (2017). Detecting Markers of Therapy-Induced Senescence in Cancer Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1534, 41–52.
- Ferguson, A. R. (1911). Associated bilharziosis and primary malignant disease of the urinary bladder, with observations on a series of forty cases. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 16, 76-94.
- Fernandez, P., Scaffidi, P., Markert, E., Lee, J. H., Rane, S., & Misteli, T. (2014). Transformation resistance in a premature aging disorder identifies a tumor-protective function of BRD4. *Cell Reports*, 9(1), 248-260.
- Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Journal of the American Medical Association*, 306(7), 737-745.
- Friedmann-Morvinski, D., & Verma, I. M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Reports*, 15(3), 244-253.
- Fujimoto, K., Yamada, Y., Okajima, E., Kakizoe, T., Sasaki, H., Sugimura, T., & Terada, M. (1992). Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer research*, 52(6), 1393–1398.
- Gao, H., Teng, C., Huang, W., Peng, J., & Wang, C. (2015). SOX2 Promotes the Epithelial to Mesenchymal Transition of Esophageal Squamous Cells by Modulating Slug Expression through the Activation of STAT3/HIF- α Signaling. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 21643–21657.
- Gatti, G., Vilardo, L., Musa, C., Di Pietro, C., Bonaventura, F., Scavizzi, F., . . . D'Agnano, I. (2021). Role of Lamin A/C as Candidate Biomarker of Aggressiveness and Tumorigenicity in Glioblastoma Multiforme. *Biomedicines*, 9(10), 1343.
- Gerhard-Herman, M., Smoot, L. B. W., N., Kieran, M. W., Kleinman, M. E., Miller, D. T., Schwartzman, A., . . . Gordon, L. B. (2012). Mechanisms of premature vascular aging in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Hypertension*, 59(1), 92-97.
- Gros, J., & Tabin, C. J. (2014). Vertebrate limb bud formation is initiated by localized epithelial-to-mesenchymal transition. *Science*, 343(6176), 1253-1256.
- Grossman, H. B., Liebert, M., Antelo, M., Dinney, C. P., Hu, S. X., Palmer, J. L., & Benedict, W. F. (1998). p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(4), 829–834.
- Guinde, J., Frankel, D., Perrin, S., Delecourt, V., Lévy, N., Barlesi, F., . . . Kaspi, E. (2018). Lamins in Lung Cancer: Biomarkers and Key Factors for Disease Progression through miR-9 Regulation? *Cells*, 7(7), 78.
- Halaschek-Wiener, J., & Brooks-Wilson, A. (2007). Progeria of stem cells: stem cell exhaustion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 62(1), 3-8.
- Hall, M. C., Chang, S. S., Dalbagni, G., Pruthi, R. S., Seigne, J. D., Skinner, E. C., . . . Schellhammer, P. F. (2007). Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *The Journal of Urology*, 178(6), 2314-2330.
- Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J. W., Spinler, K. R., Athirasala, A., . . . Discher, D. E. (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 669-682.
- Hay, E. D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental Dynamics*, 233(3), 706-720.
- Hayashi, T., Gust, K. M., Wyatt, A. W., Goriki, A., Jäger, W., Awrey, S., . . . Black, P. C. (2016). Not all NOTCH Is Created Equal: The Oncogenic Role of NOTCH2 in Bladder Cancer and Its Implications for Targeted Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(12), 2981–2992.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.

- Hennekam, R. C. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *140*(23), 2603-2624.
- Hernandez, L., Roux, K. J., Wong, E. S., Mounkes, L. C., Mutalif, R., Navasankari, R., . . . Stewart, C. L. (2010). Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Developmental cell*, *19*(3), 413-425.
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(4), 1238-1246.
- Ho, C. Y., & Lammerding, J. (2012). Lamins at a glance. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 9), 2087-2093.
- Hochhaus, A., Larson, R. A., Guilhot, F., Radich, J. P., Branford, S., Hughes, T. P., . . . Investigators, I. (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*, *376*(10), 917-927.
- Hu, X. T., Song, H. C., Yu, H., Wu, Z. C., Liu, X. G., & Chen, W. C. (2020). Overexpression of Progerin Results in Impaired Proliferation and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 2629-2642.
- Huang, P., Chen, J., Wang, L., Na, Y., Kaku, H., Ueki, H., . . . Kumon, H. (2012). Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, *29*(2), 829-834.
- Huang, P., Watanabe, M., Kaku, H., Ueki, H., Noguchi, H., Sugimoto, M., . . . Kumon, H. (2013). Cancer stem cell-like characteristics of a CD133 + subpopulation in the J82 human bladder cancer cell line. *Molecular and Clinical Oncology*, *1*(1), 180-184.
- Irianto, J., Pfeifer, C. R., Ivanovska, I. L., Swift, J., & Discher, D. E. (2016). Nuclear lamins in cancer. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *9*(2), 258-267.
- Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods in Molecular Biology*, *371*, 21-31.
- Jeong, J. H., Oh, J. M., Jeong, S. Y., Lee, S. W., Lee, J., & Ahn, B. C. (2019). Combination Treatment with the BRAF V600E Inhibitor Vemurafenib and the BH3 Mimetic Navitoclax for BRAF-Mutant Thyroid Carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, *29*(4), 540-548.
- Johnson, B. R., Nitta, R. T., Frock, R. L., Mounkes, L., Barbie, D. A., Stewart, C. L., . . . Kennedy, B. K. (2004). A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(26), 9677-9682.
- Kang, S. M., Yoon, M. H., & Park, B. J. (2018). Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases. *BMB Reports*, *51*(7), 327-337.
- Kastritis, E., Murray, S., Kyriakou, F., Horti, M., Tamvakis, N., Kavantzias, N., . . . Bamias, A. (2009). Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear b-catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: evidence for Wnt pathway implication. *International journal of cancer*, *124*(1), 103-108.
- Khan, F. M., Marquardt, S., Gupta, S. K., Knoll, S., Schmitz, U., Spitschak, A., . . . Pützer, B. M. (2017). Unraveling a tumor type-specific regulatory core underlying E2F1-mediated epithelial-mesenchymal transition to predict receptor protein signatures. *Nature communications*, *8*(1), 198.
- Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, *15*(1), 25-41.
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*, *85*(1), 3-10.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *113*(Pt 20), 3613-3622.
- Laberge, R. M., Awad, P., Campisi, J., & Desprez, P. Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenvironment*, *5*(1), 39-44.

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648.
- Lascombe, I., Clairotte, A., Fauconnet, S., Bernardini, S., Wallerand, H., Kantelip, B., & Bittard, H. (2006). N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), 2780–2787.
- Laufs, S., Nagy, K. Z., Giordano, F. A., Hotz-Wagenblatt, A., Zeller, W. J., & Fruehauf, S. (2004). Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(5), 874–881.
- Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P. Y., Campisi, J., & Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *British Journal of Cancer*, 114(11), 1180-1184.
- Lee, J. S., Leem, S. H., Lee, S. Y., Kim, S. C., Park, E. S., Kim, S. B., . . . Chu, I. S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(16), 2660–2667.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft/ Deutsche Krebshilfe/ AWMF). (2020). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL. Verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> (abgerufen am: 10.12.2020).
- Li, C., Liu, J., Zhang, Q., Cui, K., Ge, Q., Wang, C., & Chen, Z. (2018). Upregulation of E-cadherin expression mediated by a novel dsRNA suppresses the growth and metastasis of bladder cancer cells by inhibiting β -catenin/TCF target genes. *International journal of oncology*, 52(6), 1815–1826.
- Li, J., Gong, X., Jiang, R., Lin, D., Zhou, T., Zhang, A., . . . Li, H. (2018). Fisetin Inhibited Growth and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by Reversing Epithelial-to-Mesenchymal Transition via PTEN/Akt/GSK3 β Signal Pathway. *Frontiers in pharmacology*, 9, 772.
- Li, J., Haque, M., Shang, C., Hassan, B., Liu, D., Chen, W., & Lai, R. (2021). Identification and Characterization of Cancer Stem-Like Cells in ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma Using the SORE6 Reporter. *Current issues in molecular biology*, 43(2), 543–557.
- Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 605–631.
- Liang, Z., Lu, L., Mao, J., Li, X., Qian, H., & Xu, W. (2017). Curcumin reversed chronic tobacco smoke exposure induced urocytic EMT and acquisition of cancer stem cells properties via Wnt/ β -catenin. *Cell death & disease*, 8(10), e3066.
- Liu, G. H., Barkho, B. Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S. L., . . . Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 472(7342), 221–225.
- Liu, T., Xu, H., Huang, M., Ma, W., Saxena, D., Lustig, R. A., . . . Fan, Y. (2018). Circulating Glioma Cells Exhibit Stem Cell-like Properties. *Cancer research*, 78(23), 6632–6642.
- Logotheti, S., Marquardt, S., Richter, C., Sophie Hain, R., Murr, N., Takan, I., . . . Pützer, B. M. (2020). Neural Networks Recapitulation by Cancer Cells Promotes Disease Progression: A Novel Role of p73 Isoforms in Cancer-Neuronal Crosstalk. *Cancers*, 12(12), 3789.
- Magga, J., Savchenko, E., Malm, T., Rolova, T., Pollari, E., Valonen, P., . . . Koistinaho, J. (2012). Production of monocytic cells from bone marrow stem cells: therapeutic usage in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(5), 1060–1073.
- Mahlknecht, P., Nußbaumer, B., Sommer, I., & Gartlehner, G. (2014). Subgruppeneffekte der Wirksamkeit und Sicherheit von organerhaltenden, adjuvanten und neoadjuvanten Therapien des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase: Systematische Übersichtsarbeit und Subgruppenanalyse. Verfügbar

- unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0380Leb_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04.pdf (abgerufen am: 10.12.2020).
- Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S., & Lee, W. H. (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(1), 418-422.
- Maraldi, N. M., Capanni, C., Cenni, V., Fini, M., & Lattanzi, G. (2011). Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(4), 979-992.
- Maraver, A., Fernandez-Marcos, P. J., Cash, T. P., Mendez-Pertuz, M., Dueñas, M., Maietta, P., . . . Serrano, M. (2015). NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. *The Journal of clinical investigation*, *125*(2), 824–830.
- Marji, J., O'Donoghue, S. I., McClintock, D., Satagopam, V. P., Schneider, R., Ratner, D., . . . Djabali, K. (2010). Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition. *PloS one*, *5*(6), e11132.
- Markiewicz, E., Dechat, T., Foisner, R., Quinlan, R. A., & Hutchison, C. J. (2002). Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Molecular biology of the cell*, *13*(12), 4401–4413.
- Martini, A., Sfakianos, J. P., Renström-Koskela, L., Mortezaei, A., Falagario, U. G., Egevad, L., . . . Wiklund, N. P. (2020). The natural history of untreated muscle-invasive bladder cancer. *BJU International*, *125*(2), 270-275.
- Martínez-Estrada, O. M., Lettice, L. A., Essafi, A., Guadix, J. A., Slight, J., Velecela, V., . . . Hastie, N. D. (2010). Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nature genetics*, *42*(1), 89–93.
- McGuire, S. (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *7*(2), 418–419.
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, *217*(1), 65-77.
- McKeon, F. D., Kirschner, M. W., & Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature*, *319*(6053), 463-468.
- Meier, C., Hardtstock, P., Joost, S., Alla, V., & Pützer, B. M. (2016). p73 and IGF1R Regulate Emergence of Aggressive Cancer Stem-like Features via miR-885-5p Control. *Cancer research*, *76*(2), 197–205.
- Menendez, S. T., Rey, V., Martínez-Cruzado, L., González, M. V., Morales-Molina, A., Santos, L., . . . Rodríguez, R. (2020). SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers*, *12*(4), 964.
- Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., . . . Schmitt, C. A. (2018). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*, *553*(7686), 96-100.
- Mitra, A. P., Birkhahn, M., & Cote, R. J. (2007). p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World journal of urology*, *25*(6), 563–571.
- Moch, H., Humphrey, P. A., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* (4 ed., Vol. 8). International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon.
- Mohammed, M. K., Shao, C., Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Collier, Z., . . . Lee, M. J. (2016). Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes & diseases*, *3*(1), 11-40.
- Morrison, C. D., Liu, P., Woloszynska-Read, A., Zhang, J., Luo, W., Qin, M., . . . Trump, D. L. (2014). Whole-genome sequencing identifies genomic heterogeneity at a nucleotide and chromosomal level in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 672-681.

- Muramaki, M., Miyake, H., Terakawa, T., Kumano, M., Sakai, I., & Fujisawa, M. (2012). Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection. *Urologic oncology*, *30*(2), 161–166.
- Méjat, A., & Misteli, T. (2010). LINC complexes in health and disease. *Nucleus*, *1*(1), 40-52.
- Nakaya, Y., Sukowati, E. W., Wu, Y., & Sheng, G. (2008). RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nature cell biology*, *10*(7), 765-775.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23-28.
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer cell*, *25*(3), 318–334.
- Ohishi, T., Koga, F., & Migita, T. (2015). Bladder Cancer Stem-Like Cells: Their Origin and Therapeutic Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 43.
- Ou, H. L., Hoffmann, R., González-López, C., Doherty, G. J., Korkola, J. E., & Muñoz-Espín, D. (2021). Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection. *Molecular oncology*, *15*(10), 2634–2671.
- Pan, J., Li, X., Wu, W., Xue, M., Hou, H., Zhai, W., & Chen, W. (2016). Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. *Cancer letters*, *382*(1), 64–76.
- Parry, D. A., & Steinert, P. M. (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *32*(2), 99-187.
- Perin, E. C., Silva, G. V., Zheng, Y., Gahremanpour, A., Canales, J., Patel, D., . . . Willerson, J. T. (2012). Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. *American heart journal*, *163*(3), 415–421.
- Perkins, D. W., Haider, S., Robertson, D., Buus, R., & Isacke, C. M. (2020). Therapy-induced senescence in normal tissue promotes breast cancer metastasis. Verfügbar unter: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.17.343590v3> (abgerufen am: 27.11.2021).
- Pierzynski, J. A., Hildebrandt, M. A., Kamat, A. M., Lin, J., Ye, Y., Dinney, C. P., & Wu, X. (2015). Genetic Variants in the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Indicators of Bladder Cancer Risk. *The Journal of urology*, *194*(6), 1771–1776.
- Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 488-494.
- Pádua, D., Barros, R., Amaral, A. L., Mesquita, P., Freire, A. F., Sousa, M., . . . Almeida, R. (2020). A SOX2 Reporter System Identifies Gastric Cancer Stem-Like Cells Sensitive to Monensin. *Cancers*, *12*(2), 495.
- Rahman, M., Deleyrolle, L., Vedam-Mai, V., Azari, H., Abd-El-Barr, M., & Reynolds, B. A. (2011). The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery*, *68*(2), 531-545.
- Rampias, T., Vgenopoulou, P., Avgeris, M., Polyzos, A., Stravodimos, K., Valavanis, C., . . . Klinakis, A. (2014). A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nature medicine*, *20*(10), 1199–1205.
- Regulski, M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*, *29*(6), 168-174.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105-111.
- Richterstetter, M., Wullich, B., Amann, K., Haeberle, L., Engehausen, D. G., Goebell, P. J., & Krause, F. S. (2012). The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU International*, *110*(2 Pt 2), E76-79.
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., . . . Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & Development*, *31*(2), 172-183.

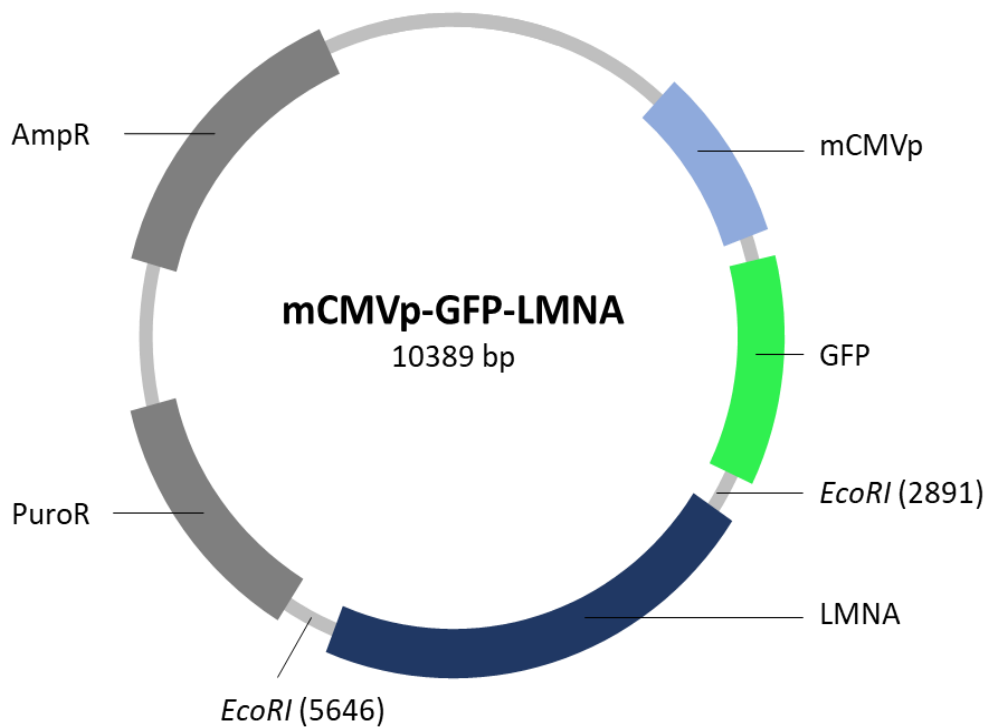
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547-556.
- Rodriguez, S., Coppedè, F., Sagelius, H., & Eriksson, M. (2009). Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *European Journal of Human Genetics*, 17(7), 928-937.
- Rodríguez, J., Calvo, F., González, J. M., Casar, B., Andrés, V., & Crespo, P. (2010). ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes. *Journal of Cell Biology*, 191(5), 967-979.
- Rosengarten, Y., McKenna, T., Grochová, D., & Eriksson, M. (2011). Stem cell depletion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell*, 10(6), 1011-1020.
- Röber, R. A., Weber, K., & Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development*, 105(2), 365-378.
- Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry*, 164(44), 257-264.
- Salehi, S., Mansoori, B., Mohammadi, A., Davoudian, S., Musavi Shenasi, S., Shajari, N., . . . Baradaran, B. (2017). An analysis of suppressing migratory effect on human urinary bladder cancer cell line by silencing of snail-1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 96, 545-550.
- Scaffidi, P., & Misteli, T. (2008). Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nature cell biology*, 10(4), 452-459.
- Schips, L., Augustin, H., Zigeuner, R. E., Gallé, G., Habermann, H., Trummer, H., . . . Hubner, G. (2002). Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer? *Urology*, 59(2), 220-223.
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407-419.
- Setti Boubaker, N., Gurtner, A., Trabelsi, N., Manni, I., Ayed, H., Saadi, A., . . . Ouerhani, S. (2021). The diagnostic applicability of A-type Lamin in non-muscle invasive bladder cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 54, 151808.
- Shin, K., Lee, J., Guo, N., Kim, J., Lim, A., Qu, L., . . . Beachy, P. A. (2011). Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*, 472(7341), 110-114.
- Siddiqui, Z., Srivastava, A. N., Sankhwar, S. N., Dalela, D., Singh, V., Zaidi, N., . . . Anjum, S. (2020). Synergic effects of cancer stem cells markers, CD44 and embryonic stem cell transcription factor Nanog, on bladder cancer prognosis. *British journal of biomedical science*, 77(2), 69-75.
- Smythe, C., Jenkins, H. E., & Hutchison, C. J. (2002). Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *The EMBO Journal*, 19(15), 3918-3931.
- Song, M., San, H., Anderson, S. A., 3rd Cannon, R. O., & Orlic, D. (2014). Shear stress-induced mechanotransduction protein deregulation and vasculopathy in a mouse model of progeria. *Stem cell research & therapy*, 5(2), 41.
- Spruck 3rd, C. H., Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., . . . Cote, R. (1994). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer research*, 54(3), 784-788.
- Stanelle, J., & Pützer, B. M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 12(4), 177-185.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Rödicker, F., Köhler, K., Theseling, C., & Pützer, B. M. (2003). Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*, 59(2), 512-519.
- Stein, J. P., & Skinner, D. G. (2004). Surgical atlas. Radical cystectomy. *BJU International*, 94(1), 197-221.

- Sternberg, C. N., Yagoda, A., Scher, H. I., Watson, R. C., Geller, N., Herr, H. W., . . . al. (1989). Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer*, *64*(12), 2448-2458.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., . . . Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *The Journal of cell biology*, *147*(5), 913–920.
- Swift, J., Ivanovska, I. L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P. C., Pinter, J., . . . Discher, D. E. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*, *341*(6149), 1240104.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., . . . Morris, J. H., Bork P, Jensen LJ, Mering CV. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D607-D613.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–676.
- Tamiello, C., Kamps, M. A., van den Wijngaard, A., Verstraeten, V. L., Baaijens, F. P., Broers, J. L., & Bouten, C. C. (2013). Soft substrates normalize nuclear morphology and prevent nuclear rupture in fibroblasts from a laminopathy patient with compound heterozygous LMNA mutations. *Nucleus*, *4*(1), 61-73.
- Tan, N., Malek, M., Zha, J., Yue, P., Kassees, R., Berry, L., . . . Belmont, L. D. (2011). Navitoclax enhances the efficacy of taxanes in non-small cell lung cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(6), 1394–1404.
- Tang, B., Raviv, A., Esposito, D., Flanders, K. C., Daniel, C., Nghiem, B. T., . . . Wakefield, L. M. (2015). A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. *Stem cell reports*, *4*(1), 155–169.
- Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., & Nie, D. (2010). Promotion of tumor development in prostate cancer by progerin. *Cancer Cell International*, *10*(47).
- Tato-Costa, J., Casimiro, S., Pacheco, T., Pires, R., Fernandes, A., Alho, I., . . . Costa, L. (2016). Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*, *15*(2), 170–178.
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental biology*, *366*(1), 34-54.
- Tilli, C. M., Ramaekers, F. C., Broers, J. L., Hutchison, C. J., & Neumann, H. A. (2003). Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *The British journal of dermatology*, *148*(1), 102–109.
- Tran, M. N., Goodwin Jinesh, G., McConkey, D. J., & Kamat, A. M. (2010). Bladder cancer stem cells. *Current stem cell research & therapy*, *5*(4), 387–395.
- Triana-Martínez, F., Loza, M. I., & Domínguez, E. (2020). Beyond Tumor Suppression: Senescence in Cancer Stemness and Tumor Dormancy. *Cells*, *9*(2), 346.
- Tzouvelekis, A., Koliakos, G., Ntoliou, P., Baira, I., Bouros, E., Oikonomou, A., . . . Bouros, D. (2011). Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal. *Journal of translational medicine*, *9*, 182.
- Ullrich, N. J., Silvera, V. M., Campbell, S. E., & Gordon, L. B. (2012). Craniofacial abnormalities in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *American Journal of Neuroradiology*, *33*(8), 1512-1518.
- Vaddi, P. K., Stamnes, M. A., Cao, H., & Chen, S. (2019). Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers*, *11*(9), 1331.
- Vennin, C., Chin, V. T., Warren, S. C., Lucas, M. C., Herrmann, D., Magenau, A., . . . Timpson, P. (2017). Transient tissue priming via ROCK inhibition uncouples pancreatic cancer progression,

- sensitivity to chemotherapy, and metastasis. *Science translational medicine*, 9(384), eaai8504.
- Verstraeten, V. L., Ji, J. Y., Cummings, K. S., Lee, R. T., & Lammerding, J. (2008). Increased mechanosensitivity and nuclear stiffness in Hutchinson-Gilford progeria cells: effects of farnesyltransferase inhibitors. *Aging cell*, 7(3), 383-393.
- Vidak, S., Kubben, N., Dechat, T., & Foisner, R. (2015). Proliferation of progeria cells is enhanced by lamina-associated polypeptide 2 α (LAP2 α) through expression of extracellular matrix proteins. *Genes & Development*, 29(19), 2022-2036.
- Vijay, G. V., Zhao, N., Den Hollander, P., Toneff, M. J., Joseph, R., Pietila, M., . . . Mani, S. A. (2019). GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 21(1), 37.
- von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., . . . Harris, C. C. (2018). p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene*, 37(18), 2379-2393.
- Wang, A. S., Kozlov, S. V., Stewart, C. L., & Horn, H. F. (2015). Tissue specific loss of A-type lamins in the gastrointestinal epithelium can enhance polyp size. *Differentiation*, 89(1-2), 11-21.
- Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X., Wei, X., . . . Liu, C. (2014). Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, 5(21), 10803-10815.
- Wang, S. S., Jiang, J., Liang, X. H., & Tang, Y. L. (2015). Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *OncoTargets and therapy*, 8, 2973-2980.
- Wheaton, K., Campuzano, D., Ma, W., Sheinis, M., Ho, B., Brown, G. W., & Benchimol, S. (2017). Progerin-Induced Replication Stress Facilitates Premature Senescence in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Molecular and cellular biology*, 37(14), e00659-00616.
- Willis, N. D., Cox, T. R., Rahman-Casañs, S. F., Smits, K., Przyborski, S. A., van den Brandt, P., . . . Hutchison, C. J. (2008). Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer. *PLoS one*, 3(8), e2988.
- Woodward, W. A., & Hill, R. P. (2016). Cancer Stem Cells. *Recent Results Cancer Research*, 198, 25-44.
- Wu, K., Zeng, J., Zhou, J., Fan, J., Chen, Y., Wang, Z., . . . He, D. (2013). Slug contributes to cadherin switch and malignant progression in muscle-invasive bladder cancer development. *Urologic oncology*, 31(8), 1751-1760.
- Yang, T., Fan, J., Liang, H., He, D., Zeng, X., Fan, J., & Wu, K. (2020). Reduced E-cadherin expression as a prognostic factor in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*, 30(2), 66-74.
- Yu, Z., Yue, W., Jiuzhi, L., Youtao, J., Guofei, Z., & Wenbin, G. (2018). The risk of bladder cancer in patients with urinary calculi: a meta-analysis. *Urolithiasis*, 46(6), 573-579.
- Yue, F., Hirashima, K., Tomotsune, D., Takizawa-Shirasawa, S., Yokoyama, T., & Sasaki, K. (2017). Reprogramming of retinoblastoma cancer cells into cancer stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 549-555.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1429-1437.
- Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD), & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). (2020). Krebs in Deutschland für 2015/2016. Verfügbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am: 10.12.2020).
- Zhan, Y., Chen, Z., He, S., Gong, Y., He, A., Li, Y., . . . Zhou, L. (2020). Long non-coding RNA SOX2OT promotes the stemness phenotype of bladder cancer cells by modulating SOX2. *Molecular cancer*, 19(1), 25.
- Zhang, H., Liu, L., Liu, C., Pan, J., Lu, G., Zhou, Z., . . . Qian, C. (2017). Notch3 overexpression enhances progression and chemoresistance of urothelial carcinoma. *Oncotarget*, 8(21), 34362-34373.

- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., . . . Colman, A. (2011). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell stem cell*, 8(1), 31–45.
- Zhao, J., Dong, D., Sun, L., Zhang, G., & Sun, L. (2014). Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 40(2), 179–189.
- Zhu, F., Qian, W., Zhang, H., Liang, Y., Wu, M., Zhang, Y., . . . Li, Y. (2017). SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. *Stem cell reports*, 9(2), 429–437.
- Ziaraň, S., Harsanyi, S., Bevizova, K., Varchulova Novakova, Z., Trebaticky, B., Bujdak, P., . . . Danisovic, L. (2020). Expression of E-cadherin, Ki-67, and p53 in urinary bladder cancer in relation to progression, survival, and recurrence. *European journal of histochemistry : EJH*, 64(2), 3098.

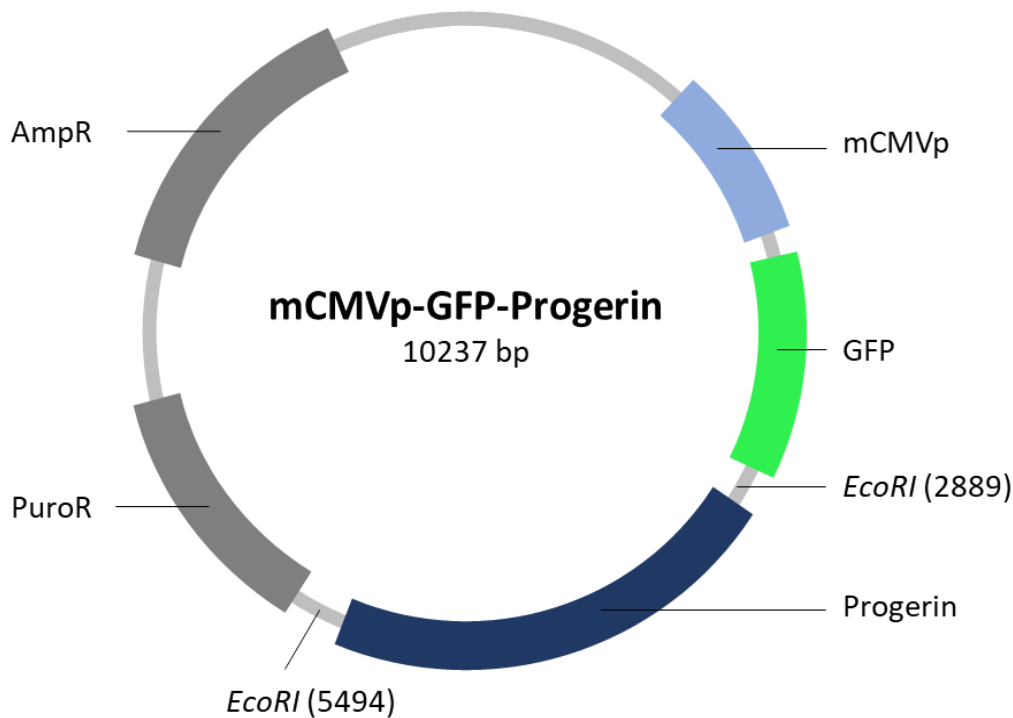
9 Anhang



5'-AGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
 ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCACAACTTTGTACGATCCCAGTGTGGTG
 GTACGTACGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
 GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACGCGTGCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTA
 CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
 TGACCTACGGCGTGCACTGCTTACGCCGCTACCCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATG
 CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
 CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
 ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
 AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
 AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
 GGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGC
 AGCGCTGCCAACCTGCCGGCCATGGAGACCCCGTCCCAGCGGCGCGCCACCCGACGCGGGGCGCAGGCCAGC
 TCCACTCCGCTGTCGCCCA-3'

Abbildung 9.1: Plasmidkarte und Sequenzierung des mCMVp-GFP-LMNA Vektors

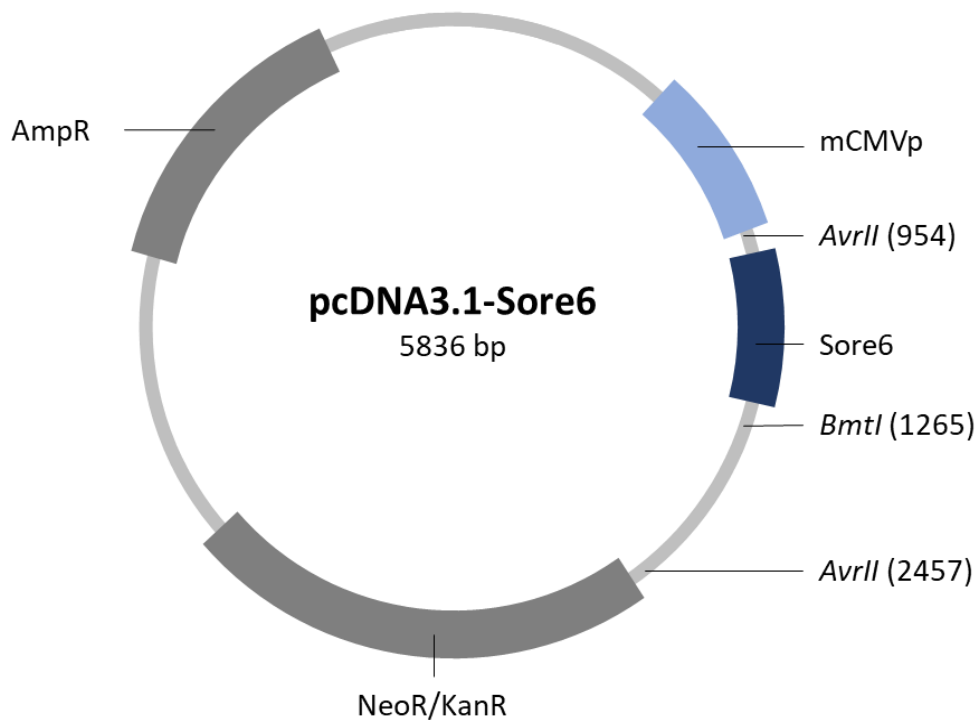
Oben ist die Plasmidkarte des mCMVp-GFP-LMNA Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus einem CMV-Promoter und dem Transgen GFP-LMNA. Das für den analytischen Verdau verwendete Enzym *EcoRI* schneidet an den Stellen 2 891 und 5 646 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.



5'-AGGCGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
 ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCACAACCTTTGTACGATCCCAGTGTGGTG
 GTACGTACGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTG
 GTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTA
 CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCC
 TGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATG
 CCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
 CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
 ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
 AACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
 AAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCAT
 GGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCTGAATTCTGCAGTGCACGGTACCGCGGGC
 AGCGCTGCCAACCTGCCGGCCATGGAGACCCCGTCCAGCGGCCGCGCCACCCGAGCGGGGCGCAGGCCAGC
 TCCACTCCGCTGTGCCCA-3'

Abbildung 9.2: Plasmidkarte und Sequenzierung des mCMVp-GFP-Progerin Vektors

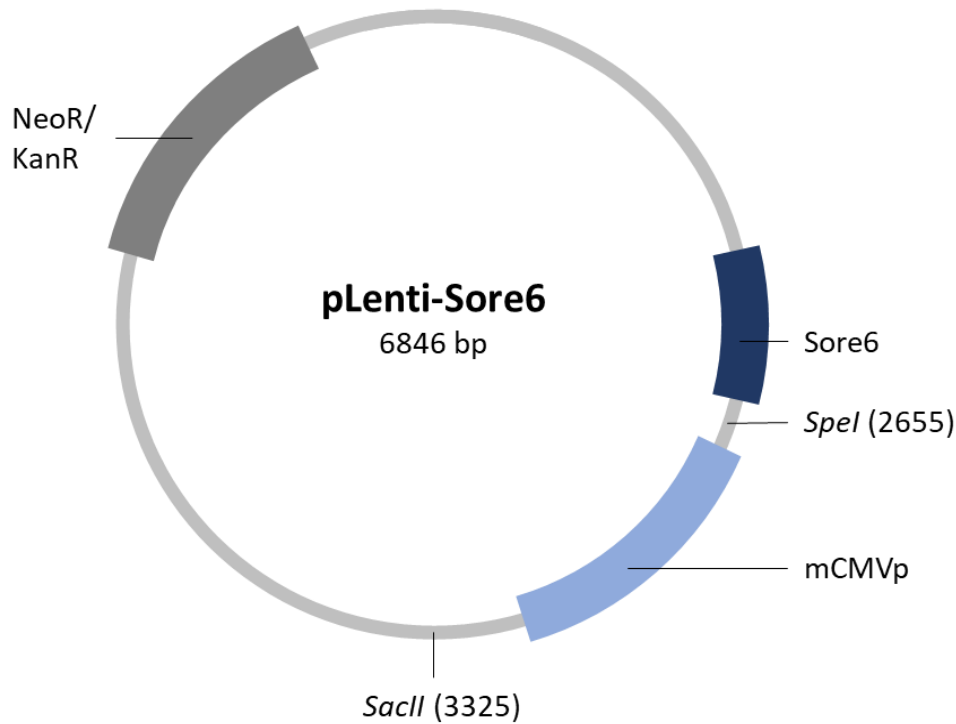
Oben ist die Plasmidkarte des mCMVp-GFP-Progerin Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus einem CMV-Promoter und dem Transgen GFP-Progerin. Das für den analytischen Verdau verwendete Enzym *EcoRI* schneidet an den Stellen 2 889 und 5 494 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.



5'-GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC AAGTCTCCA
 CCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCG
 CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTA
 GAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTAAG
 CTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGCCCTTCTAGGCCAAATTACAAAATTCAAA
 ATTTTATCGATCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCA
 GCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGGAAATTCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTT
 TTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGACTAGTTAGGCGGTACGGGC
 CAACTTTTGTATACAAAGTGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCT-3'

Abbildung 9.3: Plasmidkarte und Sequenzierung des pcDNA3.1-Sore6 Vektors

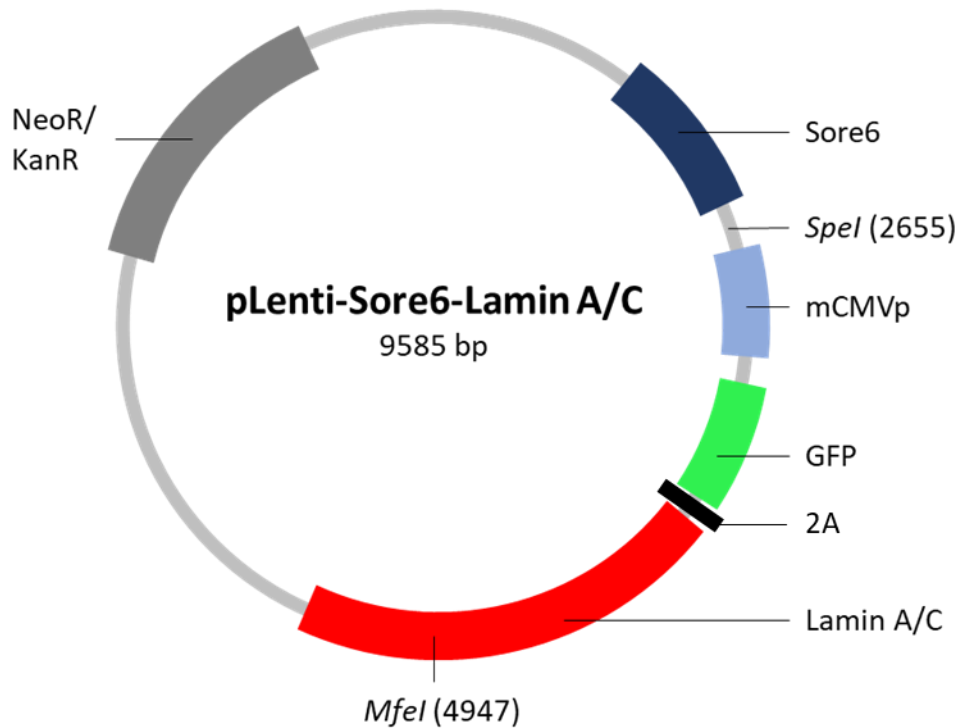
Oben ist die Plasmidkarte des pcDNA3.1-Sore6 Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus einem CMV-Promoter und dem Transgen Sore6. Die für den analytischen Verdau verwendeten Enzyme *AvrII* und *BmtI* schneiden an den Stellen 954, 1 265 und 2 457 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.



5'-TTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAC
 ATACAAACTAAAGAACTACAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTTTCGAACCTAGGCCAAATT
 ACAAATTCAAAATTTATCGATCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAAT
 GGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGGGAATTCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTG
 GTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGACTAGTTAG
 GCGTGTACGGGCCAACTTTTGTATACAAAGTGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTGC
 T-3'

Abbildung 9.4: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6 Vektors

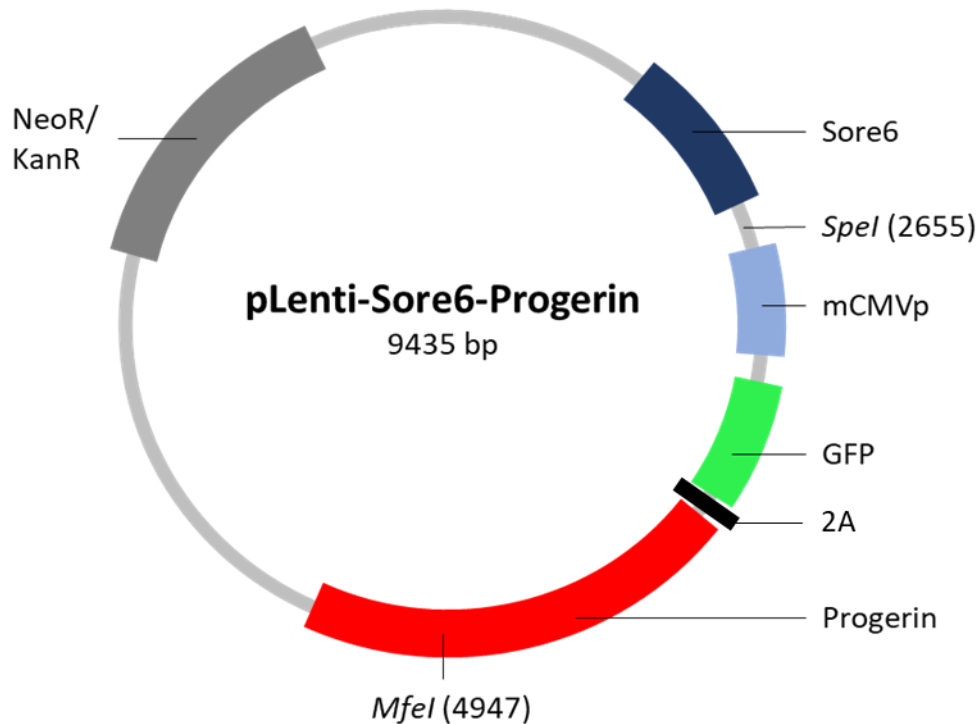
Oben ist die Plasmidkarte des pLenti-Sore6 Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus einem CMV-Promoter und dem Transgen Sore6. Die für den analytischen Verdau verwendeten Enzyme *SpeI* und *SacII* schneiden an den Stellen 2 655 und 3 325 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.



5'-CCAAATTACAAAATTCAAAATTTTATCGATCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTG
 CATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGGAAATCCAGCTACTTTTGCATTACA
 ATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTG
 ACTAGTTAGGCGTGTACGGGCCAACTTTTGTATACAAAGTGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGC
 AGAGCTGCTAGCGATGGATATCTTAGGTACCAGCTTAGGCTCGAGCGGCCGCGTGCACAGATCTTCTAGACTA
 GCGATCGATACGCGTCCTGCAGGATGCCCCGCATGAAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCACCCTGAACGGCG
 TGGAGTTCGAGTTGGTAGGCGGCGGAGAGGGCACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGC
 ACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCAC
 CTACCCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCGCATCGAG
 AAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGTCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAGGCCGCGCGTGATCGGGCGAC
 TTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCGACAAGATCATCCGACGCAACGCCA
 CCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCAGCTTCGCCCCGACCTTCAGC-3'

Abbildung 9.6: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6-Lamin A/C Vektors

Oben ist die Plasmidkarte des pLenti-Sore6-Lamin A/C Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus dem Sore6-Element, einem CMV-Promoter und den Transgenen GFP und Lamin A/C. Aufgrund einer 2A-Peptid-Sequenz sind die Transgene nicht direkt aneinandergeschlossen. Die für den analytischen Verdau verwendeten Enzyme *SpeI* und *MfeI* schneiden an den Stellen 2 655 und 4 947 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.



5'-CCAAATTACAAAATTCAAAATTTTATCGATCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTG
 CATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGGAAATCCAGCTACTTTTGCATTACA
 ATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTGCAGCTACTTTTGCATTACAATGGCCTTGGTG
 ACTAGTTAGGCGTGACGGGCCAACTTTTGTATACAAAGTGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGC
 AGAGCTGCTAGCGATGGATATCTTAGGTACCAGCTTAGGCTCGAGCGGCCGCGTGCACAGATCTTCTAGACTA
 GCGATCGATACGCGTCCTGCAGGATGCCCCCATGAAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCACCCTGAACGGCG
 TGGAGTTTCGAGTTGGTAGGCGGCGGAGAGGGCACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGC
 ACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCAC
 CTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCGCATCGAG
 AAGTACGAGGACGGCGGCGTGCTGCACGTGAGCTTACGCTACCGCTACGAGGCCGGCCGCGTGATCGGGCAG
 TTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGCAGCAACGCCA
 CCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCAGCTTCGCCCCACCTTCAGC-3'

Abbildung 9.7: Plasmidkarte und Sequenzierung des pLenti-Sore6-Progerin Vektors

Oben ist die Plasmidkarte des pLenti-Sore6-Progerin Vektors schematisch dargestellt. Das Plasmid besteht primär aus dem Sore6-Element, einem CMV-Promoter und den Transgenen GFP und Progerin. Aufgrund einer 2A-Peptid-Sequenz sind die Transgene nicht direkt aneinandergeschlossen. Die für den analytischen Verdau verwendeten Enzyme *SpeI* und *MfeI* schneiden an den Stellen 2 655 und 4 947 bp. Unten ist die Sequenzierung abgebildet, mit welcher positive Klone verifiziert wurden.

10 Danksagung

Mein erster großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer für das Vertrauen, an Ihrem Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung wissenschaftliches Arbeiten erlernen und eine experimentelle Dissertation erfolgreich durchführen zu können. Stella Logotheti danke ich für die außergewöhnliche Betreuung, vor allem für die zahlreichen lösungsorientierten und kreativen Ideen bei Problemen und Unsicherheiten. Bei dem gesamten Team des IEGTs bedanke ich mich für die Geduld bei praktischen Fragen, konstruktiven Ratschläge und uneigennützigem laborexperimentellen Zuarbeiten. Hierzu zählen unter anderem Alf Spitschak, Anja Stoll, Christin Richter, Christoph Söhnchen, Nico Murr, Stephan Marquardt, Ingrid Winkler und Ottmar Herchenröder. Insbesondere danke ich Obay, Dinis, Prabir, Ida und Renée, dass wir die Höhen und Tiefen der intensiven Laborarbeit nicht nur als Arbeitskollegen, sondern als Freunde bewältigt haben.

Ein weiterer Dank gilt der Deutschen Krebshilfe für die Förderung im Rahmen des Mildred-Scheel-Doktorandenprogrammes. Das Stipendium gab mir die Sicherheit, mich während des Forschungsjahres mit meiner gesamten Energie auf dieses Projekt konzentrieren zu können.

All meinen Wegbegleitern und Freunden möchte ich Danke für die endlose Unterstützung sagen. Euer Verständnis und eure Denkanstöße haben mich stets motiviert und vorangetrieben. Vornehmlich danke ich meiner Freundin Cara für die Selbstverständlichkeit und Leidenschaft, mit welcher sie die Umsetzung der Arbeit unterstützt hat. Immer hattest du ein offenes Ohr bei Fragen zu Zitiertechniken und Formulierungen.

Der letzte Dank geht an meine gesamte Familie. Vor allem meinen Eltern, meinem Bruder und Julia danke ich für den emotionalen Rückhalt auf jedem Lebensweg. Dieses Werk ist auch euer Verdienst.

11 Eidesstattliche Erklärung

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

Philipp Morgenroth

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Morgenroth, Philipp
Geburtsdatum, -ort: 13.07.1997, Rathenow
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademischer Werdegang

08.11.2022 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.10.2020 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.09.2017 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.10.2015 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
26.06.2015 Allgemeine Hochschulreife am Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium Rathenow

Klinische Erfahrungen

Seit 03/23 Assistenzarzt in Weiterbildung Innere Medizin, Havelland Kliniken Rathenow

Praktisches Jahr

07/22 – 10/22 Chirurgie, Bezirkskrankenhaus Linz, Österreich
03/22 – 06/22 Anästhesie, Kreiskrankenhaus Prignitz gGmbH, Perleberg
11/21 – 02/22 Innere Medizin, Havelland Kliniken GmbH, Rathenow

Famulaturen

09/19 Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
08/19 Gastroenterologie, Havelland Kliniken GmbH, Rathenow
08/18 Orthopädie und Traumatologie, Bezirkskrankenhaus Kufstein, Österreich
02/18 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Manuela Dorst, Rathenow

Stipendien

10/20 – 09/21 Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm, Stiftung Deutsche Krebshilfe
10/15 – 09/16 Deutschlandstipendium, Bundesministerium für Bildung und Forschung

Wissenschaftlicher Konferenzbeitrag

Morgenroth P, Söhnchen C, Spitschak A, Puetzer BM, Logotheti S: Effect of cancer stem cell-specific progerin expression on metastatic potential. Abstract #2340, AACR 2021