

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie, Stoffwechsel und klinische Infektiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas M. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Funktionelle Analyse der Rolle von PLAC8 in neuroendokrinen Tumorzellen des Pankreas

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johanna Kaloudis
aus Aschaffenburg

Marburg, 2026

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
10.02.2026

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Hertl

Referent: Herr Prof. Dr. M. Buchholz

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. L. Schulte

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Neuroendokrine Pankreastumore.....	1
1.2 PLAC8.....	3
1.3 LIN54.....	4
1.4 Funktionsweise von siRNAs.....	5
1.5 Funktionsweise von GapmeRs.....	6
1.6 Aktueller Stand der Wissenschaft.....	7
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Zellkultur	10
2.1.2 Laborgeräte	10
2.1.3 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.4 Chemikalien	13
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	15
2.1.6 Kit-Systeme.....	17
2.1.7 Oligonukleotide.....	17
2.1.8 Antikörper.....	19
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 MTT-Assay	23
2.2.3 Extraktion der RNA.....	24
2.2.4 cDNA-Synthese.....	24
2.2.5 qPCR.....	25
2.2.6 Proteinextraktion	27
2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	27
2.2.8 Western Blot.....	28
2.2.9 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	30
2.2.10 BrdU-Assay	32
2.2.11 γ -H2AX-Foci-Staining	33
2.2.12 Statistische Auswertung.....	34

3	Ergebnisse.....	35
3.1	<i>Ausbleibender Effekt der Transfektion mit siRNAs gegen LIN54 auf die Zellviabilität</i>	<i>35</i>
3.2	<i>Verminderung der Zellviabilität durch Transfektion der Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8.</i>	<i>37</i>
3.3	<i>Erfolgreicher PLAC8-Knockdown auf Proteinebene.....</i>	<i>39</i>
3.4	<i>Beeinflussung von Proteinen der Zellzyklusregulation und Apoptose durch den PLAC8-Knockdown.....</i>	<i>40</i>
3.5	<i>Vermehrte Ansammlung der Zellen in der S-Phase bei Durchführung einer Durchflusszytometrie des Zellzyklus</i>	<i>44</i>
3.6	<i>DNA-Damage als möglicher Effekt der Transfektion mit GapmeRs gegen PLAC8.....</i>	<i>47</i>
4	Diskussion.....	51
4.1	<i>Wachstumsverhalten der BON1-Zellen als möglicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse</i>	<i>51</i>
4.2	<i>Relevanz von PLAC8 für ein Überleben und die Proliferation von BON1-Zellen.....</i>	<i>53</i>
4.3	<i>Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs zwischen den Proteinen PLAC8 und LIN54.....</i>	<i>54</i>
4.4	<i>Wirkungsweise spezifischer siRNAs im Vergleich zu spezifischen GapmeRs</i>	<i>56</i>
4.5	<i>DNA-Damage als Folge eines PLAC8-Knockdowns.....</i>	<i>60</i>
4.6	<i>Fazit</i>	<i>64</i>
5	Zusammenfassung.....	66
6	Summary	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	77
8.1	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer:innen.....</i>	<i>77</i>
8.2	<i>Danksagung.....</i>	<i>78</i>

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cEt	2',4'-constrained ethyl bicyclic nucleic acid
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
CHR	cell cycle genes homology region
C _t -Wert	Cycle threshold-Wert
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	double-stranded RNA
DTT	Dithiothreitol
FBS	Fetales Kälberserum
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HRP	Horseradish Peroxidase
LNA	Locked Nucleic Acids
lncRNA	long non-coding RNA
miRNA	microRNA
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NC	Nitrocellulose
ORF	Open reading frame
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
pATM	phospho-Ataxia-Telangiectasia Mutated
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
pCHK1	phosphorylierte Checkpoint-Kinase 1
PI	Propidiumiodid

PLAC8	Placenta-specific 8
pNET	pankreatische neuroendokrine Tumore
pRPS6	phosphoryliertes ribosomales Protein S6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small-interfering RNA
ssDNA	single-stranded DNA
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
UTR	Untranslated region

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MTT-Assays bei Transfektion mit spezifischen siRNAs.....	36
Abbildung 2: RT-PCR bei Verwendung spezifischer siRNAs.....	37
Abbildung 3: MTT-Assays 72 h nach Transfektion bei Verwendung von 4 µl RNAiMAX und 6 µl GapmeRs	38
Abbildung 4: PLAC8 Knockdown auf RNA-Ebene durch Transfektion mit GapmeRs	39
Abbildung 5: PLAC8-Knockdown auf Protein-Ebene	40
Abbildung 6: Expression des Proteins p21 nach der Behandlung von BON1-Zellen mit GapmeRs	41
Abbildung 7: Weitere Zellzyklus-Proteine im Western Blot.....	42
Abbildung 8: Keine ersichtliche Apoptose im Western Blot.....	43
Abbildung 9: Keine signifikante Veränderung der Expression von LIN54 im Western Blot	43
Abbildung 10: Durchflusszytometrie Zellzyklus 72 h nach der Transfektion	44
Abbildung 11: Durchflusszytometrie Zellzyklus ohne und mit Verwendung von Nocodazol im Vergleich.....	45
Abbildung 12: BrdU-Assay 72 h nach Transfektion	46
Abbildung 13: Zeitreihe γ -H2AX-Foci-Staining nach GapmeR-Transfektion	48
Abbildung 14: γ -H2AX-Foci-Staining 24 h nach Transfektion und Mitomycin-Positivkontrolle	49
Abbildung 15: DNA-Damage-Response Marker im Western Blot	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinie	10
Tabelle 2: Nährmedien und Kultivierungszubehör	10
Tabelle 3: Laborgeräte.....	10
Tabelle 4: Arbeits- und Verbrauchsmaterial	12
Tabelle 5: Chemikalien	13
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	15
Tabelle 7: Kit-Systeme.....	17
Tabelle 8: Primer zur cDNA-Synthese.....	17
Tabelle 9: Primer für qPCR	18
Tabelle 10: siRNAs	18
Tabelle 11: GapmeRs	19
Tabelle 12: Antikörper.....	19
Tabelle 13: Ansatz für die cDNA-Synthese	25
Tabelle 14: Ansatz für den Mastermix für die qPCR.....	26
Tabelle 15: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (für 2 Gele).....	28

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Pankreastumore

Neuroendokrine Tumore stellen im Vergleich zu anderen Tumoren eine äußerst seltene Entität von Neoplasien dar. Sie kommen in Organen wie beispielsweise der Schilddrüse, Nebenniere und vor allen Dingen im gastroenteropankreatischen System vor, welches den häufigsten Ursprungsort neuroendokriner Neoplasien darstellt. Durch verbesserte und vermehrt stattfindende Diagnostik ist in den letzten Jahren ein Anstieg dieser Tumorentität zu verzeichnen, wobei die Karzinome vermehrt in frühen Stadien diagnostiziert werden (Scherübl et al., 2019).

Somit stellen die pankreatischen neuroendokrinen Tumoren nach den duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas derzeit die zweithäufigste Tumorart des Pankreas dar (Mpilla et al., 2020). Schätzungen zufolge liegt der prozentuale Anteil der pNETs an allen Pankreastumoren bei weniger als 2 % (Halfdanarson et al., 2008). Meist treten die Tumore in der sechsten oder siebten Lebensdekade auf, wobei epidemiologisch keine Unterschiede bezüglich der Häufigkeit bei Männern und Frauen festgestellt werden können (Salahshour et al., 2021). Während die Mehrzahl der pNETs sporadisch auftritt, stehen knapp 5 % der Erkrankungen in Zusammenhang mit erblichen Tumorsyndromen. Von großer Bedeutung sind hierbei das MEN1- und Von-Hippel-Lindau-Syndrom sowie die Neurofibromatose Typ 1 und die tuberöse Sklerose (Clift et al., 2020).

Neuroendokrine Tumoren im Allgemeinen lassen sich in funktionelle, hormonaktive und nicht funktionelle, hormoninaktive Tumoren differenzieren. Subtypen der funktionellen pNETs sind Insulinome, Gastrinome sowie seltenere Glucagonome, Somatostatinome und VIPome, die vasoaktives intestinales Peptid sezernieren. Die Symptomatik der jeweiligen Tumore entspricht dabei in erster Linie dem namensgebenden sezernierten Hormon, sodass Patienten mit einem Insulinom mit niedrigen Blutzuckerspiegeln imponieren, wohingegen bei Vorliegen eines VIPoms eine wässrige Diarrhoe mit ausgeprägtem Elektrolytverlust im Vordergrund steht (Rinke et al., 2018).

Die funktionellen Tumore machen 10–40 % der pNETs aus und führen durch eine hormonell ausgelöste Symptomatik und die Möglichkeit der Spiegel-Bestimmung des entsprechenden Hormons zur erleichterten Diagnosestellung im Vergleich zu den deutlich häufigeren hormoninaktiven Tumoren. Letztere führen in der Regel durch lokale Komplikationen durch die Raumforderung erst spät zu Symptomen (Maharjan et al., 2021). Eine weitere Klassifikation der Tumoren erfolgt anhand der Mitoserate pro zehn Hauptgesichtsfeldern oder des Proliferationsfaktors Ki67. Demnach werden die Tumoren

Einleitung

in low grade (G1), intermediate rate (G2) und high grade (G3) neuroendokrine Neoplasien sowie high grade neuroendokrine Karzinome eingeteilt (Cives & Strosberg, 2017).

Als Grundvoraussetzung für die Diagnosestellung eines pNET werden in der Leitlinie eine Hypervaskularisierung, die in der Bildgebung in Form eines MRT oder CT ersichtlich wird, sowie ein positiver Somatostatin-Rezeptor-Nachweis genannt (Rinke et al., 2018).

Die Therapie pankreatischer neuroendokriner Tumoren stellt aufgrund der Komplexität der Erkrankung in der Regel eine multidisziplinäre und multimodale Aufgabe dar und erfolgt in Abhängigkeit von diversen Faktoren wie beispielsweise dem Allgemeinzustand des Patienten und den Eigenschaften des Tumors. Somit spielen sowohl Chemo-, Radio- und Immuntherapie als auch die Resektion des Tumors eine wichtige Rolle in der Therapie. Da die meisten pNETs Somatostatinrezeptoren exprimieren, können beispielsweise Somatostatinrezeptorantagonisten wie Octreotid zur Verbesserung der Symptomatik hormonell aktiver Tumore angewendet werden (Mpillá et al., 2020).

Dem aktuellen Stand der Wissenschaft nach fungiert jedoch die chirurgische Resektion des Primärtumors und vorhandener Metastasen derzeit als die einzige potenziell kurative Therapiemethode (Deguelte et al., 2018). Außerdem konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einem lokalisierten nicht funktionellen pNET, die operiert werden, einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den Patienten aufweisen, die sich nicht einer chirurgischen Therapie unterziehen (Hill et al., 2009). Tumoren mit einer Größe über 2 cm oder dem Verdacht auf eine Manifestation in den Lymphknoten sollten je nach Lokalisation durch eine partielle Pankreatikoduodenektomie oder durch eine Pankreaslinksresektion mit oder ohne Erhalt der Milz reseziert werden, wohingegen kleinere Tumoren auch mithilfe einer Pankreaskorpusresektion oder Enukleation entfernt werden können (Rinke et al., 2018).

Auch bei funktionellen pNETs richtet sich die chirurgische Therapie nach der Lokalisation des Tumors. Der Erfolg der Operation lässt sich durch den Rückgang der durch den Tumor ausgelösten Symptome beweisen, sodass beispielsweise bei Vorliegen eines Insulinoms nach der operativen Entfernung dessen die Serumglukosewerte auch ohne Zufuhr glukosehaltiger Infusionen ansteigen (Tseng et al., 2007). Im Zusammenhang mit Gastrinomen stellt die chirurgische Resektion bisher ebenfalls eine wichtige Säule der Therapie dar, da sie mit einem verminderten Auftreten hepatischer Metastasen assoziiert ist, deren Abwesenheit als wichtiger prognostischer Faktor hinsichtlich des Überlebens gesehen werden kann (Norton et al., 2006).

Einleitung

Das häufige Vorkommen der neuroendokrinen Pankreastumoren in Zusammenhang mit den derzeit nur eingeschränkten Therapiemethoden verdeutlicht die Relevanz der wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit dieser Tumorentität.

1.2 PLAC8

Das cysteinreiche Placenta-specific 8, das auch als Onzin bekannt ist, ist im menschlichen Genom auf Chromosom 4 lokalisiert und in drei unterschiedlichen Transkriptvarianten vorhanden (NCBI Datenbank). In Fibroblasten kann eine verstärkte Expression des kleinen, hoch konservierten Proteins PLAC8 zu verstärkter Zellproliferation, Verlust der Zellzykluskontrolle und letztlich Entstehung von Tumoren führen, während die Inhibierung von PLAC8 eine verminderte Wachstumsrate und höhere Sensitivität gegenüber apoptotischen Reizen zur Folge hat (Rogulski et al., 2005). Das 12,5 kDa große Protein wurde erstmals in Zellen des Trophoblasten der Plazenta von Mäusen nachgewiesen (Galaviz-Hernandez et al., 2003). Später wurde es in humanen dendritischen Zellen ausfindig gemacht und seitdem mit diversen Tumorentitäten in Organen wie der Leber, dem Darm, der Prostata und der Lunge in Verbindung gebracht. Dabei fungiert das Protein kontextabhängig als Onkogen oder als Tumorsuppressor. Beispielsweise fördert PLAC8 *in vivo* und *in vitro* die Zellproliferation bei Lungenkrebs über die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges (Chen et al., 2022). Die Überexpression von PLAC8-mRNA in Gewebeproben klarzelliger Nierenkarzinome korrelierte positiv mit der Tumorgroße, dem TNM-Stadium und negativ mit der Überlebenszeit (Shi et al., 2017). Darüber hinaus wurde eine erhöhte PLAC8-Expression in Zellen nasopharyngealer Tumore entdeckt, wobei PLAC8 eine Blockierung der Autophagie über den AKT/mTOR Signalweg bewirkt (Mao et al., 2021). Durch einen Knockdown von PLAC8 kann die Autophagie über den AKT/mTOR Signalweg induziert werden und dadurch die Zellproliferation gehemmt sowie die Apoptose gefördert werden (Huang et al., 2020). Außerdem ist eine erhöhte Expression von PLAC8 in kolorektalen Tumoren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Metastasen sowie eines Wiederauftretens des Primärtumors assoziiert (Hung et al., 2020). Im Rahmen der Prostata-Karzinogenese konnte festgestellt werden, dass PLAC8 das Überleben und die Proliferation von Zellen bei cadmiuminduzierten Prostatakarzinomen fördert, indem es die Fusion von Autophagosom und Autolysosom unterstützt (Pal et al., 2017).

Einleitung

Abgesehen von der proliferationsfördernden Wirkung von PLAC8 im Rahmen der Karzinogenese tritt das Protein auch im Zusammenhang mit vermindertem Therapieansprechen in Erscheinung. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe PLAC8-Expression in Mammakarzinomen zu einer Resistenz gegen Adriamycin führen kann (Chen et al., 2021). Durch den Knockdown von PLAC8 mithilfe von siRNAs konnte eine erhöhte Empfindlichkeit von Zellen eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms gegenüber Cisplatin erzielt werden (Shi et al., 2017). Auch bei nasopharyngealen Tumoren konnte eine Strahlenresistenz im Zusammenhang mit PLAC8 festgestellt werden, die vermutlich auf eine Inhibierung des PI3K/AKT/GSK3B-Signalwegs zurückzuführen ist (Yang et al., 2018). Gleichzeitig konnte mit einem PLAC8-Knockdown im Mausmodell die Strahlenempfindlichkeit durch eine Induktion der Apoptose erhöht werden (Shen et al., 2021).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das Protein PLAC8 im Rahmen diverser Tumorentitäten eine Rolle spielt. Im Zentrum der Betrachtung steht dabei die proliferationsfördernde Wirkung, die Teil der Tumorentstehung und Metastasenbildung ist. Darüber hinaus kann das Protein mit vermindertem Ansprechen eines Tumors auf spezifische Therapien in Verbindung gebracht werden. Diese Zusammenhänge stellen die Relevanz der Forschung an PLAC8 heraus.

1.3 LIN54

LIN54 ist ein Gen, das ebenfalls auf Chromosom 4 downstream von PLAC8 lokalisiert ist. Das von LIN54 kodierte Protein agiert kontextabhängig als Transkriptionsaktivator- oder Repressor und ist Teil des DREAM-Komplexes (NCBI Datenbank). Der DREAM-Komplex beinhaltet unter anderem den LIN-Komplex bestehend aus RBBP4, LIN9, LIN37, LIN52 sowie LIN54 (Matsuo et al., 2012). LIN54 enthält zwei cysteinreiche Domänen (CXC), zwischen denen sich ein Platzhalter, der sogenannte „Hinge“ befindet. Diese Domäne ist essentiell für die DNA-Bindung, sodass LIN54 sequenzspezifisch an zwei Stellen an den cdc2-Promotor binden kann (Schmit et al., 2009).

LIN54 ist dafür verantwortlich, die Bindung des LIN-Komplexes an die CHR zu koordinieren. CHR steht für cell cycle genes homology region und befindet sich in den Promotoren von zellzyklusregulierten Genen. Dabei ist sie Teil der Genunterdrückung in der G₀- sowie frühen G₁-Phase und an der Genaktivierung in der G₂ und M-Phase beteiligt

(Marceau et al., 2016). Damit spielt LIN54 insgesamt eine entscheidende Rolle für die Zellzyklusregulation.

1.4 Funktionsweise von siRNAs

Small-interfering RNAs, kurz siRNAs, können sequenzspezifisch im Rahmen sogenannter RNA-Interferenz die Expression bestimmter Zielgene herunterregulieren, indem sie einen gezielten mRNA-Abbau hervorrufen (Hu et al., 2020). Abgesehen von siRNAs können auch sogenannte microRNAs, kurz miRNA, zur RNA-Interferenz eingesetzt werden. Allerdings ist die siRNA so konzipiert, dass sie perfekt komplementär zur Ziel-mRNA ist, wohingegen miRNAs nur partiell komplementär zu dieser sind (Wang et al., 2021).

RNA-Interferenz beruht im Gegensatz zu Antisense-Technologien in der Regel auf einem katalytischen Mechanismus. Da der mit der siRNA beladene RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) nach der Spaltung der mRNA von dieser dissoziieren und ein anderes Molekül binden kann, werden nur sehr niedrige siRNA-Konzentrationen benötigt, um einen effizienten Knockdown herbeizuführen (Friedrich & Aigner, 2022).

Voraussetzung für den Prozess des post-transkriptionellen Gen-Silencings durch siRNAs ist eine eindeutige Watson-Crick-Basenpaarung zwischen der siRNA und mRNA, die letztlich zur Spaltung der mRNA durch den RISC führt (Kim & Rossi, 2007). Im Detail funktioniert dies so, dass zunächst siRNAs aus dsRNA entstehen, die durch die Endoribonuklease Dicer 2 zu siRNAs verarbeitet werden (Meister & Tuschl, 2004). Anschließend wird der siRNA-Duplex in den RISC geladen und in zwei Stränge geteilt, von denen nur der Führungsstrang erhalten bleibt, während der andere Strang verworfen wird (Glazier et al., 2020). Idealerweise hat der Führungsstrang ein flexibleres 5'-Ende, um im RISC zurückgehalten zu werden und eine 3'-Region mit geringerer Affinität, um die Produktfreisetzung zu bewirken (Khvorova & Watts, 2017). Sobald der Führungsstrang im RISC-Komplex auf einen perfekt komplementären mRNA-Strang trifft, schneidet die Komponente AGO2 des Komplexes die mRNA, um das Gen auszuschalten (Glazier et al., 2020).

Diese Wirkungsweise kann sich auch in Hinblick auf die gezielte Ausschaltung von Genen zu Nutze gemacht werden, die an der Karzinogenese, Metastasierung und der Resistenz gegenüber Chemo- oder Radiotherapie beteiligt sind (Ozpolat et al., 2016). Allerdings sind siRNAs nicht nur anfällig für den Abbau durch Nukleasen, sondern

weisen zusätzlich ein Problem in Bezug auf den Transport zur Zielstruktur auf. Durch die negative Ladung ist die Diffusion durch die negativ geladene Zellmembran nicht ohne Weiteres gewährleistet, sodass ein Träger erforderlich wird, um die effiziente Aufnahme in beispielsweise Krebszellen zu ermöglichen (Ferrari et al., 2012).

1.5 Funktionsweise von GapmeRs

Als Alternative zum Knockdown von mRNA und lncRNA durch siRNAs können GapmeRs genutzt werden, die in Form einzelsträngiger Antisense-Oligonukleotide zur Verwendung kommen (Pendergraft et al., 2017). Namensgebend ist dabei die 8–10 Basen große Lücke (englisch „gap“) entsprechend dem DNA-Abschnitt im Zentrum eines GapmeRs (Maranon & Wilusz, 2020). Diese Oligonukleotide sind von modifizierten Nukleotiden am 5'- und am 3'-Ende flankiert, was zu einer erhöhten Nukleasestabilität und besseren Affinität für Ziel-RNAs führt (Crooke et al., 2021). Locked Nucleic Acids, kurz LNAs, sowie deren methyliertes Analogon 2',4'-constrained ethyl bicyclic nucleic acid, kurz cEt, gehören zu diesen verschiedenen chemischen Modifikationen, die hauptsächlich über Phosphorothioatbindungen mit den Nukleotiden verbunden sind, was zusätzlich die Nukleaseresistenz erhöht und den Transport in die Zellen verbessert (Shin et al., 2022). GapmeRs binden an komplementäre Ziel-RNA in Zellen, sodass RNA-DNA-Hybride entstehen, welche anschließend als Substrat für die RNase H1 fungieren, die selektiv den RNA-Strang des Hybrids spaltet (Migawa et al., 2019). Die Rekrutierung dieser RNase findet vorwiegend im Zellkern, aber ebenfalls im Zytoplasma statt, sodass GapmeRs besonders effizient einen Knockdown herbeiführen können (Hagedorn et al., 2018).

Im Vergleich zu siRNAs bieten GapmeRs den Vorteil, dass sie eine geringere Größe, eine höhere Stabilität und eine hohe Wirksamkeit durch die Strangspezifität aufweisen sowie dass die Wirkung durch das ubiquitäre Vorkommen der RNase H1 nicht lokal beschränkt ist (Abewe et al., 2020).

Im Mausmodell konnte es bereits gelingen, durch spezifische GapmeRs einen effizienten Knockdown des KCNT1-Gens hervorzurufen, das eine Rolle bei epileptischen Erkrankungen spielen kann. Durch das Ausschalten des Gens kam es zu einer starken Reduktion der Häufigkeit der Anfälle und einer verbesserten Überlebenszeit (Burbano et al., 2022). Außerdem wurde festgestellt, dass sich GapmeRs für den Knockdown von

Einleitung

lncRNA und mRNA in menschlichen primären CD4⁺ T-Zellen eignen (Abewe et al., 2020).

Auch darüber hinaus kommen therapeutische Ansätze in Form von GapmeRs insbesondere bei neurologischen Erkrankungen zum Tragen. So wurden GapmeRs bereits bei Behandlungen von Chorea Huntington, der spinalen Muskelatrophie und der Muskeldystrophie Typ Duchenne eingesetzt (Verma et al., 2020).

1.6 Aktueller Stand der Wissenschaft

Wie zuvor beschrieben, stellt PLAC8 ein wichtiges Protein dar, das in die Karzinogenese zahlreicher Tumore verwickelt ist. Bei Transkriptomanalysen intraepithelialer Neoplasien des Pankreas konnte PLAC8 als potenzielles proliferationsförderndes Gen identifiziert werden, das vor allem in höhergradigen Neoplasien stärker exprimiert ist (Buchholz et al., 2005). So konnte ebenfalls bereits herausgefunden werden, dass PLAC8 in Zellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene überexprimiert ist (Kaistha et al., 2016).

Die hauptsächliche Lokalisation des Proteins ist dabei die Innenseite der Plasmamembran. Durch eine Inhibierung der PLAC8-Expression mithilfe von siRNAs wurde das Wachstum der Zellen gehemmt, indem es zur Abschwächung der Zellzyklusprogression kam. Dies war mit einer im Western Blot nachweisbaren Veränderung der Expression der Zellzyklusregulatoren Retinoblastom-Protein, p21 und Cyclin D1 verbunden. Dass die verminderte Zellviabilität in erster Linie auf eine durch die zuvor genannten Prozesse verminderte Proliferation und nicht auf vermehrten Zelltod zurückzuführen ist, wurde auch dadurch deutlich, dass bei Western-Blot-Analysen zu den Apoptosemarkern PARP und Caspase keine Zeichen für erhöhte Apoptose gefunden werden konnten (Kaistha et al., 2016).

Auch in Zellen neuroendokriner pankreatischer Tumore konnte PLAC8 als wichtiger Mediator im Zusammenhang mit Zellwachstum und Tumorprogression durch Einflussnahme auf den Zellzyklus identifiziert werden (Tatura et al., 2020). Dies führt zu der Hypothese, dass ein gezielter Einsatz therapeutischer Methoden, die gegen PLAC8 gerichtet sind, zu einer Verbesserung der Prognose für betroffene Patienten führen könnten. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Buchholz (Gastroenterologie, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Marburg) wurde festgestellt, dass es nicht möglich ist, bei der PLAC8-Protein defizienten Zelllinie G2#1, die als Klon von der

Einleitung

Zelllinie S2-007 abstammt, den endogenen PLAC8-Locus und letztlich vollständig die Expression der PLAC8-RNA auszuschalten. Die These, dass die durch PLAC8 hervorgerufene Zellproliferation anstelle des Proteins durch die RNA vermittelt wird, führte zu der Vermutung, dass PLAC8 als sogenannte lncRNA fungiert (Stark, 2022). Eine long non-coding RNA ist per Definition eine RNA, die mehr als 200 Nukleotide lang ist und nicht für Proteine kodiert. Diese können bei der Genregulation eine Rolle spielen, indem sie die Transkription benachbarter Gene beeinflussen oder auf weiter entfernte Loci wirken (Statello et al., 2021). Insgesamt können sie viele Rollen in zellulären Prozessen spielen und so Einfluss auf den Zellzyklus, den Metabolismus, die Differenzierung und die Entstehung von Krankheiten nehmen (Bridges et al., 2021).

Im weiteren Verlauf wurde das Protein LIN54 als potenzieller, downstream von PLAC8 gelegener Mediator der PLAC8-vermittelten Effekte identifiziert. Diese Hypothese basiert auf der räumlichen Nähe beider Gene, der bekannten zellulären Funktion von LIN54 sowie der Überlegung, dass PLAC8 als cis-acting lncRNA fungieren könnte. Cis-acting lncRNAs wirken direkt an dem Ort, an dem sie transkribiert werden und entfalten ihre regulatorische Wirkung lokal beispielsweise auf benachbarte Gene. Im Gegensatz dazu verlassen trans-acting lncRNAs nach Transkription und Prozessierung ihren Ursprungsort und agieren an anderen Stellen im Zellkern oder Zytoplasma (Gil & Ulitsky, 2020).

Diese Überlegung soll im Rahmen dieser Arbeit für die Zelllinie BON1, die aus pankreatischen neuroendokrinen Tumoren stammt, durch eine Transfektion der Zellen mit spezifischen siRNAs untersucht werden. Dabei soll außerdem ermittelt werden, ob es einen Feedback-Loop zwischen LIN54 und PLAC8 gibt. Im zweiten Versuchsansatz sollen die Auswirkungen einer Transfektion mit GapmeRs gegen PLAC8 auf die Zellen analysiert werden. Da die Wirkung von GapmeRs im Vergleich zu siRNAs zusätzlich zur Wirkung im Zytoplasma spezifisch im Zellkern erfolgt, sollen so mit höherer Effizienz potenzielle lncRNA-ähnliche Funktionen der PLAC8-mRNA inhibiert und charakterisiert werden.

Ziel der Arbeit ist insgesamt die Beantwortung der folgenden Fragen:

- 1.) Fungiert LIN54 als Mediator der Effekte von PLAC8?
- 2.) Besteht ein Feedback-Loop zwischen PLAC8 und LIN54?

Einleitung

- 3.) Kann durch die Transfektion der Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8 eine Verminderung der Zellviabilität und ein effizienter Knockdown auf RNA-Ebene erzielt werden?
- 4.) Welche Veränderungen entstehen durch die Behandlung mit GapmeRs auf Proteinebene und wie werden Zellzyklus und Apoptose beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Zelllinie

Tabelle 1: Zelllinie

Zelllinie	Abstammung	Zellkulturmedium
BON1	Lymphknotenmetastase eines Patienten mit einem pNET (Grozinsky-Glasberg et al., 2012)	DMEM/F-12, 10 % FBS

Nährmedien und Kultivierungszubehör

Tabelle 2: Nährmedien und Kultivierungszubehör

Nährmedium / Kultivierungszubehör	Hersteller
DMEM/F-12 (1:1) (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium; F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,5 %)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)

2.1.2 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet International Inc (Edison, USA)
AxioCam MRm	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Axiovert 200M	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
BD FACSCanto II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Centro LB 960 Luminometer	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland)
Chemocam	INTAS Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
Cytoflex LX	Beckman Coulter (Brea, USA)
Digitale Laborwaage S-403	Denver Instrument GmbH (Göttingen, Deutschland)
Education Line EL20	Mettler Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz)
Freezer Mediline LKexv 3910 (4 °C, -20 °C)	LIEBHERR (Bulle, Schweiz)

Material und Methoden

HERAcell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Heraeus Megafuge 1,0 R	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Hera Freeze HFU T Series (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Inkubator Modell 300	Memmert GmbH (Schwabach, Deutschland)
Joystick	Ludl electronic products LTD (Hawthorne, USA)
Kippschüttler RS-RS 5	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen, Deutschland)
Kreisschüttler KS 250 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Magnetrührer 2002	Heidolf Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop Leica DM IL LED (Seriennummer: 385670)	Leica Microsystems CMS GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mini-PROTEAN Tetra-System (Blot- Station)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Multipette M4	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Nanodrop 1000 Spectrophometer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
omniPAGE Mini vertical Protein electrophoresis system	Cleaver Scientific Ltd (Rugby, UK)
PeqPower 300 V	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Pipetten P1000 P200 P100 P20 P10	Gilson (Middleton, USA)
Probenständer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
See-Saw Rocker SSL4	Stuart (Stone, UK)
Semidry-blot	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Vortexer REAX2000	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)

Material und Methoden

Zählkammer Neubauer improved	Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Zentrifuge Sprout (Seriennummer: HSD 43872)	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)

2.1.3 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Arbeits- und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Adhesive qPCR Seal	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Advanced Soft Papiertuch	Tork (Mannheim, Deutschland)
Alufolie	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Blotting Papier	MACHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland)
BrdU Platte 96-Well	PerkinElmer (Waltham, USA)
Comply Steam Indicator Tape	3M Deutschland GmbH (Neuss, Deutschland)
Menzel Deckgläser 24 x 24 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
DNA low-binding tubes 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Falcon 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Falcon 50 ml conical bottom	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Falcon 50 ml mit Stehrand	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Flow Citometry Tubes 5 ml PS	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Frischhaltefolie Sarogold	Saropack GmbH (Lörrach, Deutschland)
Gelloader Pipette Tips 1–200 µl	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Handschuhe blau	Semper Care (Neuwied, Deutschland)
Immun-blot PVDF membrane for protein blotting 0,2 µl	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Klarlack	Essence cosnova GmbH (Sulzbach im Taunus, Deutschland)
Kosmetiktücher clean and clever	IGEFA Handelsgesellschaft mbH & Co. KG (Ahrensfelde, Deutschland)
MTT-Platte Mikrotestplatte, 96-Well, F	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Multipipettenspitzen 2,5 ml; 5 ml; 10 ml Combitips advanced	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Nitrocellulose blotting Membran supported 0,2 µm NC	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)

Material und Methoden

Nitrocellulose blotting Membran supported 0,45 µm NC	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Objektträger Superfrost plus	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Parafilm "M" laboratory film	BEMIS flexible packaging (Meckenheim, Deutschland)
Pasteur-Pipetten aus Glas ca. 145 mm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
PCR Platte MicroAmp Fast 96-Well- Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)
Pipettenspitzen Diamond D10 D200 D1000	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark Professional (Dallas, USA)
Pursept AF	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
SafeSeal Reagiergefäße, Polypropylen 0,5 ml 1,5 ml 2 ml 2 ml ohne Deckel	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten 2 ml 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Sterilium Classic-Pure	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
TC-Flasche T75 Standard Bel. Ka.	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
TC-Platte 6-Well Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Zellkultur-Petrischale 35 x 10 mm Nunc lon delta	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol > 99 % (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
2-Propanol puriss p.a. > 99,8 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Material und Methoden

Acrylamid: Rotiphorese-Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin pH 5,2 50 g	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Standard 2,0 mg/ml in 0,9 % aqueous	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Aqua 1000 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Clarity Western ECL Substrate 500 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Clarity Max Western ECL Substrate 100 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Coomassie Plus Protein Assay Reagent 950 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
DAPI Fluoreszenzfarbstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol Rotipuran > 99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd-Lösung 3,5–3,7 % neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)
Glycerol 99+ %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin PUFFERAN > 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen (Waltham, USA)
Methanol puriss. p.a. > 99,8 %	HoneyWell Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Mitomycin C from Streptomyces caespitosus	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaF	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid (NaCl) > 99,8 % mit Antitackmittel	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhypochlorit-Lösung 12 % Cl stabilisiert technisch 2,5 l	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nocodazol	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Propidium Iodide solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Material und Methoden

Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ProteaseArrest 2 ml	G-Biosciences (St. Louis, USA)
RNase A	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Salzsäure 1M	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
SDS ultra pure > 99 % f.d. Elektrophorese	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Slimfast Schoko Royale	Sun Nutricional, Inc. (Berkshire, UK)
Spectra Multicolor high range protein ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tetranatriumpyrophosphatdecahydrat (Na ₄ P ₂ O ₇ *H ₂ O)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Thiazolylblau > 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TRI-hydrochlorid PUFFERAN > 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS PUFFERAN > 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Triton-X-100 reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung		pH-Wert
10 % APS	1 g 10 ml	Ammoniumpersulfat Aqua destillata	
2 % BSA TBS Triton	10 ml 90 ml 500 µl 2 g	10x TBS Aqua Triton-X-100 BSA	
10x Blottingpuffer	250 mM 1,92 M	Tris Base Glycin Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	8,3
10x Laufpuffer	250 mM 1,92 M 1 %	Tris Base Glycin SDS Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	8,3

Material und Methoden

10x TBS (tris-gepufferte NaCl-Lösung)	24,2 g 80 g 15 ml	Tris Base NaCl HCl (37 %) Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	7,6
TBS – 0,5 % Triton	10 ml 90 ml 500 µl	10x TBS Aqua Triton-X-100	
1x Blottingpuffer	10 % 20 % 70 %	10x Blottingpuffer Methanol Aqua destillata	8,3
1x Laufpuffer	10 % 90 %	10x Laufpuffer Aqua destillata	8,3
1x TBS-T (tris-gepufferte NaCl-Lösung mit Tween 20)	10 % 0,1 %	10x TBS Tween 20 Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	7,6
1x Trypsin	450 ml 50 ml	PBS 10x Trypsin-EDTA	
4x SDS-Probenpuffer	2 g (253 mM) 0,05 % 40 % 2 %	Tris-Hydrochlorid Bromphenolblau Glycerol SDS Mit Aqua destillata auf 50 ml auffüllen	6,8
DTT-Lösung	154, 25 mg	DTT Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	
Ethanol 70 %	70 ml 30 ml	Ethanol (100 %) Aqua destillata	
Ethanol 80 %	80 ml 20 ml	Ethanol (100 %) Aqua destillata	
Lösung zum Blocken der Membranen	2 g 40 ml	Milchpulver/BSA TBS-T	
Lysepuffer für Proteine	50 mM 150 mM 1 mM 10 % 1 % 100 mM 10 mM vor der Verwendung: 960 µl 10 µl 10 µl 20 µl	HEPES (pH 7,5) NaCl EGTA Glycerol Triton-X-100 NaF Na ₄ P ₂ O ₇ Stammlösung PMSF Protease Arrest Na ₃ VO ₄	
MTT-Reagenz	5 mg 1 ml	Thiazolylblau PBS	

Material und Methoden

MTT solubilization solution	8 ml 1 ml 1 ml	2-Propanol Triton-X-100 HCl (1M)	
Sammelgellösung	25 ml 59 ml 16 ml	Sammelgelpuffer Aqua destillata Acrylamidlösung (30 % / 0,8 %)	
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris Base SDS Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	6,8
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris Base SDS Mit Aqua destillata auf 1 Liter auffüllen	8,8

2.1.6 Kit-Systeme

Tabelle 7: Kit-Systeme

Kit-System	Verwendungszweck	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (chemiluminescent)	BrdU-Proliferationsassay	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Quiagen (Hilden, Deutschland)
peqGold Total RNA Kit	RNA-Isolierung	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

2.1.7 Oligonukleotide

Primer zur cDNA-Synthese

Tabelle 8: Primer zur cDNA-Synthese

Name	Sequenz	Hersteller
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'	Biomers.net (Ulm, Deutschland)

Primer für qPCR

Tabelle 9: Primer für qPCR

Name	Forward primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Hersteller
LIN54	GCCTTTTCCTTCCTGTGT AGTACTTAC	CCAACCCTCCCCAAATA GTCTT	Biomers .net (Ulm, D)
PLAC8 2. Teilfrag- ment	TGGTTCTTCACAGTGTAG CCTCAT	TATGTATGTTGAAGGCA GGGAAGAT	Biomers .net (Ulm, D)
PLAC8 3. Teilfragm- ent	CCTCCTGGGCTCAAGTGT TAAT	GGCGGATCACTTGAGGT TAGG	Biomers .net (Ulm, D)
PLAC8 ext	TGCTATCTAGGAACGTGA GATGTGA	GCACTCAACAAATTCAA GCACTCT	Biomers .net (Ulm, D)
PLAC8 ORF	GGGTGTCAAGTTGCAGCT GAT	TAGATCCAGGGATGCCA TATCG	Biomers .net (Ulm, D)
PLAC8 UTR	AGGAGAGCCATGCGTACT TTCTA	AGATGGTGAAGAACTCA AGCTGAA	Biomers .net (Ulm, D)
RPLP0	TGGGCAAGAACACCATG ATG	AGTTTCTCCAGAGCTGG GTTGT	Biomers .net (Ulm, D)

siRNAs

Tabelle 10: siRNAs

Name	Produktsequenz 5'-3'	siRNA ID	Hersteller
Negativkontrolle siRNA Duplex	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	1027310	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Silencer Pre- designed siRNA LIN54_1	GGGAAUGUGGGUUAUGCAGtt	126567	Ambion by life technologies (Dreieich, Deutschland)
Silencer Pre- designed siRNA LIN54_2	GCUCAGUAUGUUACUCAGCtt	126568	Ambion by life technologies (Dreieich, Deutschland)

Material und Methoden

Silencer Pre-designed siRNA LIN54_3	CGAUCAGGAUGUCUAAAAAtt	126569	Ambion by life technologies (Dreieich, Deutschland)
Silencer Pre-designed siRNA PLAC8_3	GAACUCCAACUGGCAGACAtt	46267	Ambion by life technologies (Dreieich, Deutschland)

GapmeRs

Tabelle 11: GapmeRs

Name	Produktsequenz 5'-3'	Katalognummer	Hersteller
Antisense LNA GapmeR Negativkontrolle	AACACGTCTATACGC	339533 LG00000002-FZA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Antisense LNA GapmeR PLAC8_1	CTAACGGGACGAAACT	LG00804438-DDA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Antisense LNA GapmeR PLAC8_2	GGAGGACTCTAAGTAA	LG00804439-FZA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Antisense LNA GapmeR PLAC8_3	CCGACAGTAGTGAATT	LG00804440-DFA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Antisense LNA GapmeR PLAC8_5	CGCTGATTTGAATGCT	LG00804442-DFA	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.8 Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

	Name	Ursprung	Verdünnung	Puffer	Hersteller
Primärantikörper	alpha-rabbit IgG Alexa Fluor 488	goat	1:500	2 % BSA in TBS-Triton-X-100	life technologies (Dreieich, Deutschland)
	Anti-ATR	rabbit	1:10.000	5 % Milch/ 5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-Caspase-3	rabbit	1:1.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-CHK1	mouse	1:10.000	5 % Milch	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, USA)

Material und Methoden

	Anti-Cleaved-Caspase-3	rabbit	1:1.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-Cyclin D1	rabbit	1:500	5 % Milch	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-LIN54	rabbit	1:1.000	5 % Milch	Bethyl Laboratories (Montgomery, USA)
	Anti-p21	rabbit	1:1.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-Parp	rabbit	1:1.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-pATM	mouse	1:10.000	5 % BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, USA)
	Anti-pCHK1	rabbit	1:10.000	5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-PLAC8	rabbit	1:1.000	5 % BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Anti-pRPS6	rabbit	1:1.000	5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-RAD51	rabbit	1:10.000	5 % Milch	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, USA)
	P-Histone H2A.X	rabbit	1:200	2 % BSA in TBS-Triton-X-100	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Sekundärantikörper	Anti-mouse HRP-gekoppelt	horse	1:10.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
	Anti-rabbit HRP-gekoppelt	goat	1:10.000	5 % Milch	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Ladekontrolle	Anti-β-Aktin HRP-gekoppelt	mouse	1:40.000	5 % Milch	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung der BON1-Zellen

Die Zellen wuchsen optimal bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C im Nährmedium DMEM/F-12 mit 10 % FBS. Die Teilung der Zellen erfolgte bei einer Bedeckung des Bodens von etwa 80 %. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen anschließend mit 10 ml PBS gespült. Zur Ablösung der Zellen vom Zellrasen wurden 3 ml Trypsin hinzugegeben und die Flasche für fünf Minuten in den Inkubator gestellt. Während dieser Zeit wurden 10 ml frisches Medium in eine neue Zellkulturflasche vorgelegt. Nach der fünfminütigen Inkubation hatten sich die Zellen vom Zellrasen gelöst und wurden durch Pipettieren gemischt und resuspendiert. Anschließend wurde der Zellsuspension frisches Medium hinzugefügt, um Verdünnungen im Bereich von 1:3 bis 1:5 zu erzielen. Zuletzt wurde 1 ml der Mischung in die vorbereitete neue Zellkulturflasche überführt.

Zellzählung und Aussaat

Zur Aussaat der Zellen wurde zunächst wie oben beschrieben vorgegangen. Die trypsinisierten Zellen wurden vor dem Zählen durch Zugabe von weiterem Medium verdünnt und anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden 10 µl der Zelllösung unter das Deckglas pipettiert und die Zellen in allen vier großen Quadranten gezählt. Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert gebildet, der angibt, wie viele Zellen sich in 0,1 µl der Lösung befinden. Auf dieser Grundlage wurde berechnet, welches Volumen der Zelllösung für die gewünschte Zellzahl erforderlich war. Die Zelllösung wurde anschließend mit Zellkulturmedium so weit verdünnt, dass ein ausreichendes Volumen für die Aussaat zur Verfügung stand. Für die Aussaat wurden jeweils 2 ml Medium in die Wells einer 6-Well-Platte vorgelegt und anschließend 1 ml der Zellsuspension zugegeben.

Transfektion mit siRNAs

Im Rahmen der Transfektion mit siRNAs wurden drei verschiedene siRNAs untersucht, die gegen PLAC8 gerichtet waren. Zur Kontrolle möglicher zellulärer Effekte und Schäden, die allein durch den Transfektionsvorgang entstehen könnten, wurde jeweils ein Well mit einer siRNA-Kontrolle transfiziert sowie ein unbehandeltes Well in den Versuch eingeschlossen.

Material und Methoden

Für die Transfektion wurden zunächst 150 µl Medium in low binding reaction tubes vorgelegt und jeweils 3 µl bzw. 4 µl der entsprechenden siRNA hinzugefügt. Um das Eindringen der siRNAs in die Zellen zu ermöglichen, wurde eine liposomale Transfektionsmethode verwendet. Dabei wurden die siRNAs mit Lipofectamine RNAiMAX, einem lipophilen Reagenz, gekoppelt. Diese Komplexe können aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit mit der Zellmembran fusionieren und die siRNA in das Zytoplasma einschleusen.

Zur Herstellung des Transfektionsreagenzes wurde ein Mastermix aus 3 µl RNAiMAX in 150 µl Medium angesetzt. Nach dem Vermischen der Reagenzien und einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurden jeweils 150 µl des Mastermixes zu den siRNA-haltigen Reaktionsgefäßen gegeben und erneut gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Während dieser Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel in den zu transfizierenden Wells durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich nach Zugabe des Transfektionsansatzes in allen Wells identische Volumina befinden. In das unbehandelte Well wurden statt des 300 µl Transfektionsansatzes entsprechende Mengen an Vollmedium gegeben.

Nach Ablauf der Inkubation wurde der jeweilige Reaktionsansatz tropfenweise in das zugehörige Well pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am folgenden Tag wurde das Medium in der 6-Well-Platte erneut gewechselt.

Transfektion mit GapmeRs

Die Transfektion mit GapmeRs erfolgte ähnlich wie die zuvor beschriebene Transfektion mit siRNAs.

Untersucht wurden drei verschiedene GapmeRs, die auf eine Verminderung von PLAC8 abzielten. Nach der Aussaat von 100.000 Zellen pro Well wurde die Transfektion 48 Stunden später durchgeführt.

Für jedes Well wurden in anfänglichen Versuchen 3 µl RNAiMAX und 4 µl GapmeR und in späteren Versuchen 4 µl RNAiMAX und 6 µl des jeweiligen GapmeRs verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix bestehend aus 3 µl bzw. 4 µl RNAiMAX in 150 µl Medium hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde dieser dem jeweiligen Reaktionsansatz zugegeben, der 4 µl bzw. 6 µl GapmeRs in 150 µl Medium enthielt. Nach dem Vermischen folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Während dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel in den zu transfizierenden Wells durchgeführt. Im Anschluss wurden 300 µl des Reaktionsansatzes tropfenweise in das entsprechende Well pipettiert. Neben den drei GapmeRs gegen PLAC8 wurden auch eine Positiv- und eine Negativkontrolle angelegt. In das Well der Negativkontrolle wurden anstelle des Transfektionsansatzes 300 µl frisches Medium gegeben.

Nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einem Mediumwechsel am folgenden Tag.

2.2.2 MTT-Assay

Das MTT-Assay dient der Beurteilung der metabolischen Aktivität von Zellen und ermöglicht somit Rückschlüsse auf deren Viabilität. Die Methode beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), der nach Ablauf der Reaktion als Formazan blau-violett erscheint. Die Intensität der Farbreaktion korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Zur Durchführung des Assays wurden 100.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Transfektion mit drei unterschiedlichen siRNAs bzw. GapmeRs sowie einer negativen Kontrolle erfolgte 48 Stunden nach der Aussaat. Zusätzlich wurde ein unbehandeltes Well als Kontrolle mitgeführt.

72 Stunden nach der Transfektion wurden jeweils 90 µl des MTT-Reagenzes in die Wells pipettiert und die Platte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Überstandsmedium entfernt und pro Well 400 µl einer Solubilization Solution zugegeben. Innerhalb von fünf Minuten wurde das gebildete Formazan mithilfe eines Kippschüttlers aus den Zellen gelöst.

Bei starker Blaufärbung wurde in jedem Well eine Verdünnung mit identischen Mengen PBS durchgeführt, um eine möglichst exakte photometrische Messung zu ermöglichen. Jeweils 100 µl der Proben wurden in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mithilfe des Multiskan FC Photometers gemessen.

2.2.3 Extraktion der RNA

Ziel der Extraktion der RNA aus den Zellen war die Gewinnung von cDNA-Proben, um anhand dieser eine qPCR durchzuführen. Für die Isolation von RNA aus den Zellen wurden diese mit 100.000 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät. Zwei Tage nach der Aussaat erfolgte die Transfektion und nach weiteren 48 Stunden wurde der Überstand aus den Wells abgesaugt und die 6-Well-Platte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Die Isolation der RNA erfolgte mithilfe des peqGOLD Total RNA-Kits. Dabei wurden durch Zugabe von 350 μl Lysepuffer auf die noch gefrorene Platte die Zellen vom Boden gelöst. Durch Resuspendieren und Abspülen des Wells wurde eine maximale Ausbeute bei der RNA-Gewinnung sichergestellt. Der Lysepuffer wurde auf die gelbe Homogenisier-Säule des Kits pipettiert und für zwei Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Sammelgefäß des Kits aufgefangen, mit 350 μl 70 %igem Ethanol gemischt und auf die orangene RNA-Säule pipettiert. Die Proben wurden zunächst eine Minute lang bei 10.000 g zentrifugiert und anschließend zuerst mit 500 μl Waschpuffer durch 30-sekündige Zentrifugation bei 10.000 g, danach zweimal mit 600 μl 80 %igem Ethanol durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 g gewaschen. Zum Trocknen der Proben wurde der Überstand zweimal durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 12.000 g entfernt. Zuletzt wurden 30 μl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für zwei Minuten bei 12.000 g zentrifugiert, um die Proben zu gewinnen. Anschließend konnte der RNA-Gehalt der Probe mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop 1000 ermittelt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.2.4 cDNA-Synthese

Da die isolierte RNA als Ausgangsmaterial für eine qPCR diente, musste sie zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Im Gegensatz zur genomischen DNA enthält cDNA keine Introns und stellt somit eine direkte Abschrift der exprimierten mRNA-Sequenz dar.

Für die cDNA-Synthese wurde das Omniscript Kit verwendet. Dabei wurde ein Mastermix entsprechend Tabelle 13 aus destilliertem Wasser, 10x Puffer, dNTPs, Oligo(dT)-Primern und der reversen Transkriptase angesetzt. Die Reverse Transkriptase fungiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase und ermöglicht die Synthese der cDNA auf Basis eines RNA-Einzelstrangs. Die Oligo(dT)-Primer bestehen aus kurzen DNA-

Material und Methoden

Sequenzen, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und so die Anlagerung der reversen Transkriptase ermöglichen. Die dNTPs dienen als Bausteine für die entstehende cDNA, während der Puffer die optimalen Reaktionsbedingungen gewährleistet.

Tabelle 13: Ansatz für die cDNA-Synthese

Reagenzien	Menge pro Probe
Destilliertes Wasser	1 μ l
10x Puffer	2 μ l
dNTPs	2 μ l
Oligo(dT)-Primer	0,4 μ l
Reverse Transkriptase	0,5 μ l
RNA	1.000 ng
Destilliertes Wasser	ad 20 μ l

Pro Probe wurden 5,9 μ l des Mastermixes mit 14,1 μ l RNA-Probe vermischt. Durch vorherige Verdünnung der RNA-Probe mit Wasser wurde eine Konzentration von 1.000 ng RNA pro Probe sichergestellt. Die Umwandlung der RNA in cDNA erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei 37 °C.

2.2.5 qPCR

Bei der quantitativen PCR, auch Real-Time-PCR genannt, handelt es sich um eine Art der Polymerasekettenreaktion, die durch Vervielfältigung von Nukleinsäuren eine Quantifizierung der DNA ermöglicht. Zur Begrenzung des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts werden Forward- und Reverse-Primer verwendet. Das Prinzip der qPCR beruht auf der Interkalierung und Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen, in diesem Fall SYBR Green. Dabei korreliert die Menge der erhaltenen Fluoreszenzsignale mit der Menge der PCR-Produkte und lässt somit Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der untersuchten Nukleinsäuren zu. Zur Auswertung erfolgt die Bestimmung des Threshold Cycle bzw. C_t -Wertes. Dieser bezeichnet die Zeit, nach der ein vorher definierter Grenzwert des Fluoreszenzsignals überschritten wird. Durch Korrelation der Fluoreszenzsignale mit der Menge der DNA ist der C_t -Wert somit umso kleiner, je mehr DNA enthalten ist.

Material und Methoden

Im Rahmen des Experiments sollten der Knockdown von PLAC8 auf RNA-Ebene sowie mögliche Wechselwirkungen zwischen PLAC8 und LIN54 untersucht werden.

Zunächst wurden die im vorherigen Schritt generierten cDNA-Proben durch Zugabe von 2 μl der Probe zu 98 μl Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt. Anschließend wurde ein Mastermix, bestehend aus SYBR Green, Wasser sowie den entsprechenden Forward- und Reverse-Primern, hergestellt.

Tabelle 14: Ansatz für den Mastermix für die qPCR

Reagenzien	Menge pro Probe
SYBR Green	10,0 μl
Wasser	4,6 μl
Primer forward	0,2 μl
Primer reverse	0,2 μl

Von diesem Mastermix wurden jeweils 15 μl in die entsprechenden Wells der PCR-Platte pipettiert und 5 μl der zu untersuchenden Probe hinzugefügt. Als Referenz-Gen in jeder Probe wurde das ribosomale Protein RPLP0 verwendet. Außerdem erfolgte jede Messung als Doppelbestimmung und mit einer Wasserkontrolle, um potenzielle Verunreinigungen der Reagenzien auszuschließen. Die PCR-Platte wurde nun mit der Adhesive qPCR Seal-Folie abgedeckt und kurz zentrifugiert, um Verschmutzungen zu vermeiden sowie Flüssigkeitsreste von den Wänden zu entfernen und sicherzustellen, dass sich das Reaktionsvolumen vollständig am Boden der Wells befindet. Die Durchführung der qPCR erfolgte mit dem 7500 Fast Real-Time-PCR System.

Zur Auswertung der qPCR wurde eine Betrachtung der ΔC_T -Werte durchgeführt, die sich aus der Differenz der C_T -Werte des zu untersuchenden Gens und des Referenz-Gens RPLP0 ergeben. Die Normierung auf das Referenz-Gen dient dem Ausgleich von unterschiedlichen DNA-Mengen in den Proben, die beispielsweise durch Pipettierabweichungen entstanden sein könnten. Somit ermöglicht der ΔC_T -Wert eine verlässliche Beurteilung der Genexpression unabhängig von Schwankungen in der Probenkonzentration.

2.2.6 Proteinextraktion

Zur Gewinnung der Proben, die für Western Blots verwendet werden sollten, wurden zunächst 100.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Zwei Tage später wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX transfiziert und weitere 72 Stunden später mit der Gesamt-Protein-Extraktion begonnen. Hierfür wurden die Zellen vom Boden der Wells abgekratzt und mit dem vorhandenen Medium in Eppendorf-Gefäße überführt. Das Pellet, das sich nach Zentrifugation für drei Minuten bei 4.500 rpm gebildet hatte, wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml PBS aufgenommen. Dann wurden die Proben erneut bei 8.000 rpm für drei Minuten zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Pellets bei -20°C eingefroren.

Anschließend wurde der Lysepuffer für Proteine entsprechend dem in Tabelle 6 beschriebenen Ansatz hergestellt und je nach Pelletgröße ein Volumen von 50–200 μ l auf die noch gefrorenen Pellets gegeben. Die Proben wurden gevortext und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Proben nun bei 17.000 g für drei Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Bei den Proben, die für die Western Blots der Proteine RAD51, CHK1, pCHK1, ATR und pATM und somit als Marker für DNA-damage-response verwendet werden sollten, erfolgte die Proteinextraktion schon 24 Stunden nach der Transfektion. Dies liegt darin begründet, dass der Zeitpunkt infolge der Zeitreihen des γ -H2AX-Foci-Stainings als derjenige mit dem höchsten DNA-Schaden erschien. Alle weiteren Schritte der Proteinextraktion, der Konzentrationsbestimmung und des Western Blots wurden analog zu den anderen Proben vorgenommen.

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie, dessen Absorptionsmaximum sich bei Bindung an Proteine im sauren Milieu von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Diese spektrale Änderung ermöglicht eine photometrische Quantifizierung von Proteinmengen.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in den Proben wurde zunächst eine Standardreihe in einer 96-Well-Platte angelegt. Dafür wurden 3 ml Coomassie Plus Protein Assay Reagenz mit 30 μ l des verwendeten Lysepuffers vermischt und jeweils 200 μ l dieses Gemischs in die entsprechenden Wells pipettiert. Für die Standardreihe

Material und Methoden

wurde BSA mit einer Konzentration von 1 µg/µl in steigenden Volumina (0–6 µl in 1-µl-Schritten) hinzugegeben und gemischt. Für jeden Wert der Standardreihe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Außerdem wurde in die Wells, mithilfe derer die Proteinkonzentrationen in den Proben bestimmt werden sollten, 200 µl Coomassie sowie 2 µl der entsprechenden Probe gegeben und die Platte für 5–10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Farbentwicklung zu ermöglichen. Die anschließende photometrische Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte mit dem Multiskan FC Photometer.

2.2.8 Western Blot

Die Methode des Western Blot dient dem spezifischen Nachweis einzelner Proteine innerhalb eines komplexen Proteingemischs. Dabei werden die Proteine zunächst mithilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt die Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran – in dieser Arbeit entweder PVDF oder Nitrocellulose – mittels eines elektrischen Feldes. Der Nachweis der Proteine erfolgt schließlich durch den Einsatz spezifischer Primär- und Sekundärantikörper.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (für 2 Gele)

		8 % Gel	10 % Gel	15 % Gel
Trenngel	Aqua destillata	5,2 ml	4,4 ml	2,4 ml
	Trenngelpuffer	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
	Acrylamidlösung (30 %)	3,2 ml	4,0 ml	6,0 ml
	Glycerol	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
	APS 10 %	20 µl	20 µl	20 µl
	TEMED	20 µl	20 µl	20 µl
Sammelgel	Sammelgellösung		4 ml	
	APS 10 %		10 µl	
	TEMED		10 µl	
Stoppgel	Trenngellösung		0,5 ml	
	APS 10 %		5 µl	
	TEMED		5 µl	

Material und Methoden

Zu Beginn wurden die Polyacrylamidgele hergestellt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins enthielten diese 8 %, 10 % oder 15 % Acrylamid. Je größer das zu untersuchende Protein war, desto geringer war der Acrylamid-Anteil im Gel.

Die Herstellung der Gele erfolgte gemäß Tabelle 15. APS und TEMED wurden immer zuletzt hinzugefügt, da diese den Polymerisationsprozess initiieren. Nachdem 1 ml der Stoppgel-Lösung eingefüllt wurde, folgten 5 ml der Trenngel-Lösung und zuletzt 1–2 ml der Sammelgel-Lösung. Anschließend musste das Gel für mindestens 45 Minuten aushärten.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurden die Proben für den Western Blot mit 14 μ l DTT-Lösung und 32 μ l SDS pro 100 μ l Probe versetzt. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Währenddessen wurde der 1x Laufpuffer in die Elektrophoresekammer eingefüllt.

Anschließend wurden die vorbereiteten Proben zusammen mit 7 μ l des Standards PageRuler Prestained Protein Ladder zur Größenreferenz in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Die benötigten Volumina der geladenen Proben wurden zuvor auf Basis der bestimmten Proteinkonzentrationen angepasst, um eine vergleichbare Proteinmenge pro Spur zu gewährleisten.

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst eine Spannung von 120 V angelegt, bis die Proben die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde bis zum Erreichen des Stoppgels eine Spannung bis zu 200 V angelegt.

Im nächsten Schritt mussten die der Größe nach im Gel aufgetrennten Proteine durch den Wet-Blot oder Semi-Dry-Blot auf eine Membran transferiert werden. Als Blotting-Membran wurde entweder eine Nitrocellulose-Membran oder eine PVDF-Membran nach vorheriger Aktivierung in Methanol gewählt.

Für den Wet-Blot war dabei die Verwendung von Blottingkassetten erforderlich. Innerhalb derer befanden sich in der entsprechenden Reihenfolge ein Schwamm, zwei Filterpapiere, das Gel, eine PVDF- oder NC-Membran, zwei Filterpapiere und erneut ein Schwamm. Das Blotten erfolgte bei einer Stromstärke von 300 mA und einer zeitlichen Dauer in Abhängigkeit von der Proteingröße, wobei länger geblottet wurde, je größer das Protein war.

Beim Semidry-Blot wurde auf ein Filterpapier die Membran, das Gel und noch ein Filterpapier gelegt. Der Stromfluss wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der zu blottenden Gele ausgewählt, wobei pro Blot eine Stromstärke von 65 mA nötig war.

Material und Methoden

Zur Kontrolle der erfolgreichen Transferierung der Proteine von dem Gel auf die Membran wurde eine Färbung mit Ponceau S für fünf Minuten durchgeführt. Diese ermöglicht eine reversible Visualisierung der übertragenen Proteinbänder.

Für die immunologische Darstellung der Proteine auf der Membran und die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran wurde diese für 2–4 Stunden je nach anschließendem Antikörper in 5 % Magermilch oder 5 % BSA geblockt.

Der Primärantikörper, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet, wurde nach Entfernen der Block-Lösung auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot viermal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurden 10 ml des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers hinzugegeben, welcher an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. HRP (Horseradish Peroxidase oder Meerrettich-Peroxidase) ist dabei ein Enzym, das verwendet wird, um die Anwesenheit eines Proteins auf der Membran zu detektieren. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler. Danach wurde die Membran erneut viermal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteinbande wurde anschließend das Clarity Western ECL Substrate aufgetragen. Bei geringer Expression des Proteins erfolgte die Darstellung mittels Clarity Max Western ECL Substrate. Das HRP katalysiert nun eine chemolumineszente Reaktion mit dem ECL-Substrat, was ein Lichtsignal erzeugt. Die Lichtemission kann anschließend visualisiert werden. Die Inkubation des ECL-Substrats erfolgte jeweils für fünf Minuten unter Lichtausschluss, bevor die Proteine mit der Chemocam sichtbar gemacht wurden. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Abschließend wurde die Quantifizierung der Proteinbanden mithilfe des Programms ImageJ durchgeführt. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Intensitäten der detektierten Antikörper-Banden auf die entsprechenden β -Aktin-Signale. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf die Proteinmengen in den analysierten Proben gezogen werden.

2.2.9 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Ziel der Durchführung der Durchflusszytometrie war die Darstellung und Quantifizierung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen der mit GapmeRs behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgt bei der

Material und Methoden

Durchflusszytometrie über die Messung des DNA-Gehalts. Hierfür wird die DNA mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs angefärbt. Die Fluoreszenzintensität erlaubt Rückschlüsse auf die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Um Proben für die Durchflusszytometrie zu gewinnen, wurden zunächst 100.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. 48 Stunden nach der Aussaat erfolgte die Transfektion und wiederum 72 Stunden später die Ernte der Proben.

Dafür wurde zunächst der Überstand aus einem Well in ein 15 ml Falcon überführt und das Well mit 1 ml PBS gewaschen, das danach ebenfalls in das Falcon hinzugegeben wurde. Um die Zellen von der Platte zu isolieren, wurden diese mithilfe von 500 μ l Trypsin und einer kurzen Inkubationszeit gelöst. Die durch das Trypsin ausgelöste Reaktion wurde mit 1 ml Vollmedium gestoppt und das Gemisch anschließend resuspendiert und ebenfalls in das Falcon überführt. Nun wurde die Probe für fünf Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Durchmischen der Probe mittels eines Vortexers wurden aus jeder Probe 100 μ l entnommen, um eine ungefärbte Kontrolle zu generieren. Die Proben wurden dann erneut bei 1.500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Um die Proben zu konservieren, wurde zunächst das Pellet während stetigen Vortexens in 3–4 Tropfen PBS gelöst und anschließend die Zellen durch tröpfchenweise Zugabe von 700 μ l $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem 70 %igem Ethanol fixiert. Die Proben mussten nun mindestens fünf Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Im weiteren Verlauf wurden die Proben bei 2.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, dann mit 700 μ l PBS gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zwischenzeitlich konnte die Färbelösung hergestellt werden, die aus 15 ml PBS, 75 μ l RNase A und 300 μ l PI bestand. Von dieser wurden jeweils 500 μ l zu den Proben gegeben, mit Ausnahme der ungefärbten Kontrolle, bei der PI ausgelassen wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunklen und bei Raumtemperatur konnte die Messung durchgeführt werden.

Die Daten zur Durchflusszytometrie des Zellzyklus wurden mit dem Cytoflex LX erhoben. Da BON1-Zellen zur Zellaggregation neigen, wurden die Zellen zur Minimierung der Dublettenzahl und Ermöglichen einer korrekten Zellzyklus-Analyse unmittelbar vor Durchführung der Messung mithilfe einer Pipette resuspendiert.

Zur besseren Interpretation der gewonnenen Ergebnisse wurden zusätzlich Zellzyklus-Analysen bei Zellen durchgeführt, die mit Nocodazol behandelt wurden. Nocodazol greift in die Polymerisation von Mikrotubuli ein und bewirkt somit einen

Arrest der Zellen in der G₂-Phase. Als optimale Inkubationszeit des Nocodazols, nach der sich ein Großteil der mit Nocodazol behandelten Zellen in der G₂-Phase befanden, wurde ein Zeitraum von 24 Stunden für BON1-Zellen ermittelt.

2.2.10 BrdU-Assay

Bei dem BrdU-Assay handelt es sich um eine Methode zur Beurteilung der Proliferation der Zellen, indem indirekt die DNA-Synthese gemessen wird. Bromdesoxyuridin ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin, das in phosphorylierter Form in der S-Phase des Zellzyklus in neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Im Rahmen des Assays kann dann antikörpervermittelt Bromdesoxyuridin detektiert werden.

Um BrdU-Assays durchzuführen, wurde das Cell proliferation ELISA, BrdU Kit verwendet. Zu Beginn wurden 4.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Für jede Transfektionsbedingung wurden jeweils vier Wells ausgesät, wobei aus dreien bei der Auswertung ein Mittelwert gebildet wurde und das vierte Well als Hintergrundkontrolle genutzt wurde.

Die Transfektion der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Aussaat. Neben den mit GapmeRs transfizierten Zellen wurden auch Zellen mit einer PLAC8 spezifischen siRNA transfiziert, da in vorherigen Untersuchungen bereits eine in BrdU-Assays deutlich werdende Proliferationsminderung bei dieser festgestellt werden konnte (Kaistha et al., 2016). Für die Transfektion wurden dabei Konzentrationen von 3 µl GapmeRs mit 2 µl RNAiMAX sowie 2 µl siRNAs mit 1,5 µl RNAiMAX verwendet.

44 Stunden bzw. 68 Stunden nach der Transfektion wurden alle Zellen mit Ausnahme der Hintergrundkontrollen mit 100 µl der BrdU labeling solution gelabelt. Im für das Labeling gewählten Zeitraum von vier Stunden wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden auch die Hintergrundkontrollen gelabelt und unmittelbar danach alle Wells der 96-Well-Platte abgesaugt. Zur Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA wurden 200 µl Fix Denate in jedes Well pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen und durch 100 µl Anti-BrdU-POD Working Solution ersetzt, welche 60 Minuten bei Raumtemperatur in den Wells verblieb.

Während die Wells danach dreimal für fünf Minuten mit 200 µl der Washing solution gewaschen wurden, wurde bereits die Substrate Solution angesetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jeweils 100 µl der Substanz in jedes Well pipettiert und für drei Minuten im

Dunklen auf einem Schüttler inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung mit dem Centro LB960 Luminometer.

Zur Auswertung wurde aus jeweils drei der Wells der arithmetische Mittelwert gebildet und von diesem die Hintergrundkontrolle subtrahiert.

2.2.11 γ -H2AX-Foci-Staining

Zur Ermittlung des DNA-Schadens und der genomischen Instabilität wurde ein γ -H2AX-Foci-Staining durchgeführt. Das γ -H2AX-Foci-Staining ist eine Methode zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. Bei Auftreten eines Doppelstrangbruchs wird das Histonprotein H2AX in der Umgebung der Bruchstelle an der Serin-139-Position phosphoryliert. Diese phosphorylierte Form, das γ -H2AX, kann mittels immunhistochemischer Färbung spezifisch markiert und mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die dabei entstehenden fluoreszierenden Signalpunkte, sogenannte Foci, im Zellkern spiegeln die Anzahl der Doppelstrangbrüche wider und dienen somit als quantifizierbarer Marker für DNA-Schäden (Ivashkevich et al., 2011).

Um eine Positivkontrolle als Vergleichsprobe zu generieren, sollten die Zellen mit Mitomycin behandelt werden. Mitomycin ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das als Chemotherapeutikum eingesetzt wird und durch Quervernetzung der DNA-Doppelstränge DNA-Schäden verursacht, wodurch es als wirksamer Induktor von DNA-Doppelstrangbrüchen dient.

Für das γ -H2AX-Foci-Staining erfolgte am ersten Tag die Aussaat von 100.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten auf autoklavierte Deckgläser und 48 Stunden später die Transfektion dieser Zellen, wobei in einem Well zusätzlich 100 nM Mitomycin C zur Induktion von DNA-Schäden und somit als Positivkontrolle zugegeben wurde.

Die erste Färbung wurde je nach Versuchsreihe zwischen 4 Stunden und 84 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt und diese jeweils vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen 10 Minuten lang auf einem Kippschüttler mithilfe von 1 ml 3,7 %igem Formaldehyd auf den Deckgläsern fixiert. Danach wurde 1 ml $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltes Methanol in die Wells pipettiert und für eine Minute auf einem Kippschüttler inkubiert. Nachfolgend wurden die Wells zunächst für fünf Minuten auf einem Kippschüttler mit PBS und danach für 10 Minuten mit 1 ml TBS + 0,5 % Triton-X-100 gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 1 ml 2 % BSA in TBS-Triton-X-100 für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurde

Material und Methoden

der Primär-Antikörper im Verhältnis 1:200 in 2 % BSA-TBS-Triton X-100 verdünnt und 100 µl der Lösung direkt auf die Deckgläser pipettiert. Zur Inkubation des Antikörpers wurden die Deckgläser mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde der Parafilm mit einer Pinzette entfernt und die Antikörper-Lösung abgesaugt, woraufhin die Wells dreimal für jeweils fünf Minuten mit 1 ml 2 % BSA in TBS-Triton-X-100 gewaschen wurden. Der fluorophor-konjugierte Sekundär-Antikörper wurde im Verhältnis 1:500 in 2 % BSA in TBS-Triton-X-100 verdünnt und 100 µl der Lösung wurden auf die Deckgläser gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte im Dunklen bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Wells zweimal für jeweils fünf Minuten mit 2 % BSA in TBS-Triton-X-100 gewaschen. Im nächsten Schritt wurde auf einen Objektträger ein Tropfen DAPI zur Kernfärbung appliziert und das Deckglas mithilfe einer Pinzette auf den Objektträger überführt. Zur besseren Fixierung wurde an den Ecken des Deckglases Klarlack aufgetragen. Nach einer Trocknungs- und Inkubationszeit von ca. 30 Minuten erfolgte die Betrachtung der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop.

Die Auswertung des Stainings erfolgte mithilfe von ImageJ, wobei gezählt wurde, wie viele Foci pro Zellkern ersichtlich waren. In die Auswertung eingeflossen sind anschließend nur solche Zellen, die mehr als 10 Foci pro Nukleus aufwiesen. Zuletzt wurde der Anteil dieser Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ermittelt.

2.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Zum Vergleich der Kontroll- und Interventionsgruppen wurden jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz kam ein zweiseitiger, unabhängiger t-Test mit gleichen Varianzen zum Einsatz. Die p-Werte werden in den Abbildungen durch Sternchen gekennzeichnet: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

In bisherigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass PLAC8 in pNETs überexprimiert ist und zu einer verstärkten Tumorprogression beiträgt (Tatura et al., 2020). Durch die Verwendung spezifischer, gegen PLAC8 gerichteter CRISPR/Cas-Konstrukte konnte zwar ein Knockout von PLAC8 auf Proteinebene erzielt, jedoch kein vollständiger Knockdown auf RNA-Ebene erreicht werden, was zu der Hypothese führte, dass die PLAC8-RNA als lncRNA fungieren könnte (Stark, 2022). Um mögliche Interaktionen mit dem downstream von PLAC8 gelegenen LIN54 zu untersuchen, wurden die Effekte einer Transfektion mit siRNAs betrachtet und zusätzlich GapmeRs eingesetzt, um lncRNA-Effekte effizienter zu erfassen.

3.1 Ausbleibender Effekt der Transfektion mit siRNAs gegen LIN54 auf die Zellviabilität

Die zunächst durchgeführten MTT-Assays sollten den Einfluss der siRNAs gegen LIN54 auf die Zellviabilität untersuchen. Im Falle des Vorliegens eines Feedback-Loops zwischen PLAC8 und LIN54 würde ein effizienter Knockdown von LIN54 auch eine Abnahme der Zellviabilität über PLAC8-vermittelte Effekte hervorrufen.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass es mit einer Konzentration von 4 μ l siRNA und 3 μ l RNAiMAX nicht möglich war, eine Verminderung der Zellviabilität durch die Transfektion mit gegen LIN54 gerichteten siRNAs hervorzurufen. Wie Abbildung 1 zeigt, gelang es jedoch, bei den mit der siRNA gegen PLAC8 transfizierten Zellen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität zu bewirken, was schon aus vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe bekannt war. Gleichzeitig konnte man differierende Werte der optischen Dichte zwischen der unbehandelten Kontrolle und der Positivkontrolle erkennen. Diese Werte sprechen dafür, dass die Transfektion selbst einen Schaden in den Zellen hervorgerufen hat, der zu einer Abnahme der Zellviabilität geführt hat.

Ergebnisse

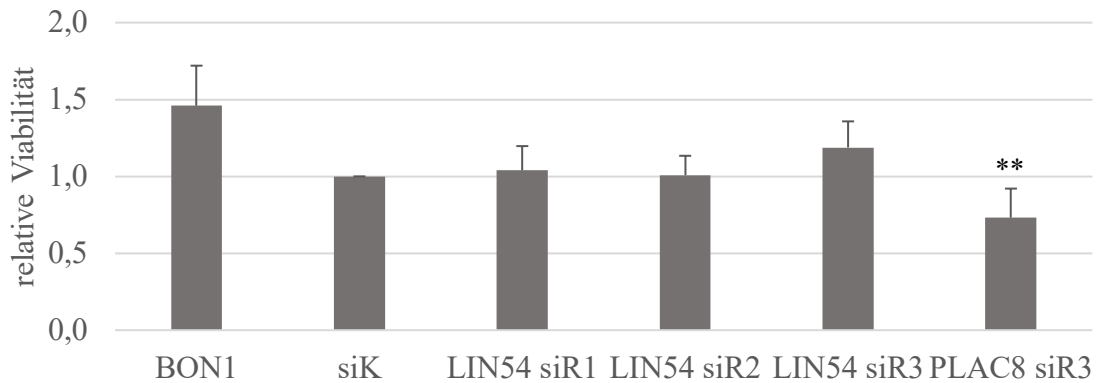


Abbildung 1: MTT-Assays bei Transfektion mit spezifischen siRNAs

Die Bestimmung der Zellviabilität der BON1-Zellen nach Transfektion mit siRNAs gegen LIN54 bzw. gegen PLAC8 erfolgte mit einem MTT-Assay. Dabei erfolgte die Messung 72 h nach der Transfektion mit 4 μ l siRNAs und 3 μ l RNAiMAX. Es wurden die Mittelwerte aus n = 9 Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Zellviabilität der siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** p < 0,01.

Um zu untersuchen, ob trotz ausbleibender Effekte auf die Zellviabilität ein Knockdown auf RNA-Ebene stattfand, wurden RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass durch die Transfektion mit spezifischen siRNAs eine signifikante Herunterregulation der LIN54-RNA erzielt werden konnte. Außerdem führte die Behandlung der Zellen mit PLAC8-spezifischen siRNAs zu einem PLAC8-Knockdown auf RNA-Ebene. Diese Ergebnisse spiegeln wider, dass die Transfektion mit siRNAs an sich, trotz ausbleibender Effekte auf die Zellviabilität, erfolgreich war. Allerdings lässt sich, wie Abbildung 2 zeigt, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen LIN54 und PLAC8 herausstellen, da eine Transfektion mit siRNAs, die gegen LIN54 gerichtet sind, keine verminderte Expression von PLAC8 auf RNA-Ebene bewirkte. Gleichzeitig zeigte sich in der RT-PCR, bei der der Primer für LIN54 verwendet wurde, keine veränderte Expression von LIN54-RNA, wenn die Zellen zuvor mit einer siRNA gegen PLAC8 transfiziert worden waren.

Ergebnisse

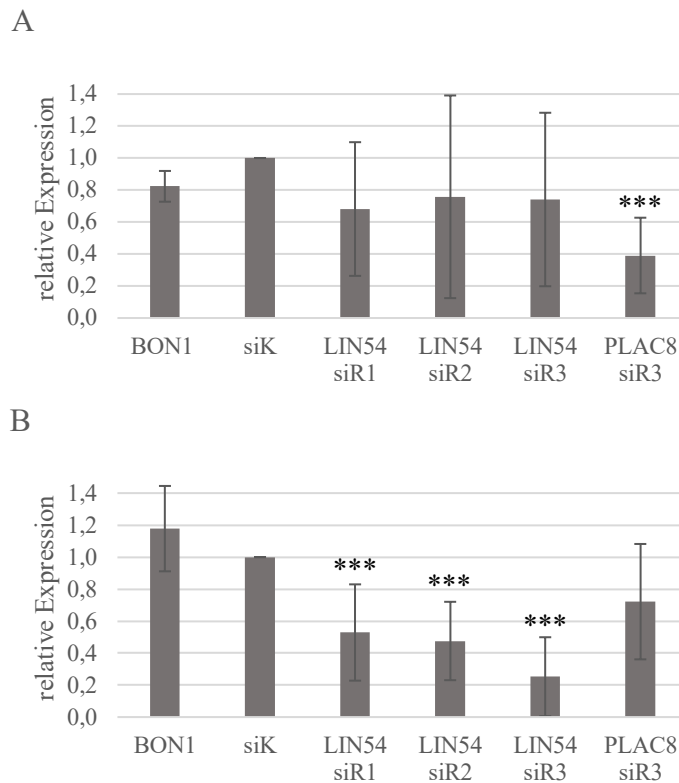


Abbildung 2: RT-PCR bei Verwendung spezifischer siRNAs

Die relative Expression von PLAC8 und LIN54 wurde mithilfe einer RT-PCR nach Transfektion mit 4 μ l siRNAs und 3 μ l RNAiMAX ermittelt. Es wurden die Mittelwerte aus $n = 2$ Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die relative Expression bei den siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. *** $p < 0,001$. (A) PLAC8 extended Primer (B) LIN54 Primer

3.2 Verminderung der Zellviabilität durch Transfektion der Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Auswirkungen der Transfektion mit GapmeRs auf die Zellen untersucht werden. Da GapmeRs im Gegensatz zu siRNAs nicht nur im Zytoplasma, sondern zusätzlich spezifisch im Zellkern wirken, sollten so mit höherer Effizienz lncRNA-ähnliche Funktionen der PLAC8-mRNA inhibiert und charakterisiert werden. Wie schon bei den vorherigen Untersuchungen mit siRNAs wurden zur Beurteilung der Zellviabilität nach erfolgter Transfektion MTT-Assays durchgeführt. Hierbei stellte sich nach mehreren Versuchsansätzen mit verschiedenen Konzentrationen der GapmeRs und des RNAiMAX heraus, dass es mit einer Konzentration von 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX pro Well gelang, eine signifikante Verminderung der Zellviabilität zu erreichen. Die Zellviabilität konnte dabei, je nach verwendetem

Ergebnisse

GapmeR, auf Werte zwischen 50–70 % verringert werden, was auf Abbildung 3 ersichtlich ist. Gleichzeitig differierten die gemessenen Werte der optischen Dichte im MTT-Assay bei den beiden Kontrollen nur wenig. Dies spricht dafür, dass die Behandlung der Zellen mit den GapmeRs selbst den Zellen keinen Schaden zugefügt hat.

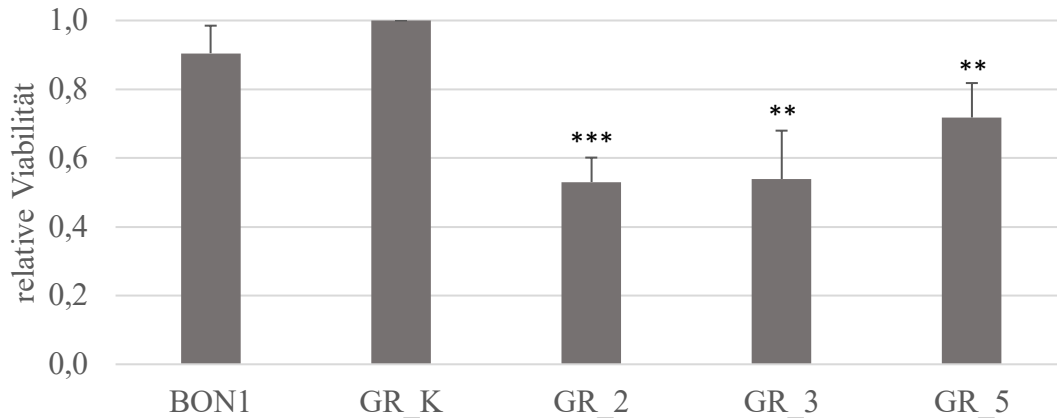


Abbildung 3: MTT-Assays 72 h nach Transfektion bei Verwendung von 4 μ l RNAiMAX und 6 μ l GapmeRs

Die Bestimmung der Zellviabilität der BON1-Zellen nach Transfektion mit GapmeRs gegen PLAC8 erfolgte mit einem MTT-Assay. Dabei erfolgte die Messung 72 h nach der Transfektion mit 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX. Es wurden die Mittelwerte aus $n = 4$ Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Zellviabilität der GR_K-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Außerdem konnte auf RNA-Ebene ein erfolgreicher Knockdown der PLAC8-RNA festgestellt werden. Für die RT-PCR wurden die Primer „2. Teilfragment“, „3. Teilfragment“, „ORF“, „UTR“, „PLAC8 extended“ sowie ein Primer für LIN54 verwendet. Bereits mit Transfektions-Konzentrationen von 3 μ l RNAiMAX und 4 μ l GapmeRs gelang ein signifikanter Knockdown der PLAC8-RNA bei den oben genannten Primern. Es konnte allerdings keine Veränderung der relativen Expression von LIN54 festgestellt werden.

Da im Rahmen der Suche nach der optimalen Konzentration für die Transfektion bereits mit diesen niedrigeren Konzentrationen erfolgreiche PLAC8-Knockdowns auf RNA-Ebene möglich waren, während die Untersuchungen der Zellviabilität durch MTT-Assays noch keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen zeigten, wurden mit der Konzentration von 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX lediglich zwei PCR-Analysen durchgeführt. Im Rahmen dieser funktionierte der Knockdown bei Verwendung der Primer des zweiten Teilfragments, ORF, UTR und PLAC8 extended am besten. Im Hinblick auf die ursprünglich aufgestellte These bezüglich des Zusammenhangs zwischen PLAC8 und LIN54 wurde in der RT-PCR auch ein Primer für LIN54 verwendet.

Ergebnisse

Wie bereits in den Versuchen mit spezifischen siRNAs gegen PLAC8 war auch bei dem durch GapmeRs herbeigeführten Knockdown von PLAC8 keine Auswirkung auf die RNA des Proteins LIN54 zu erkennen.

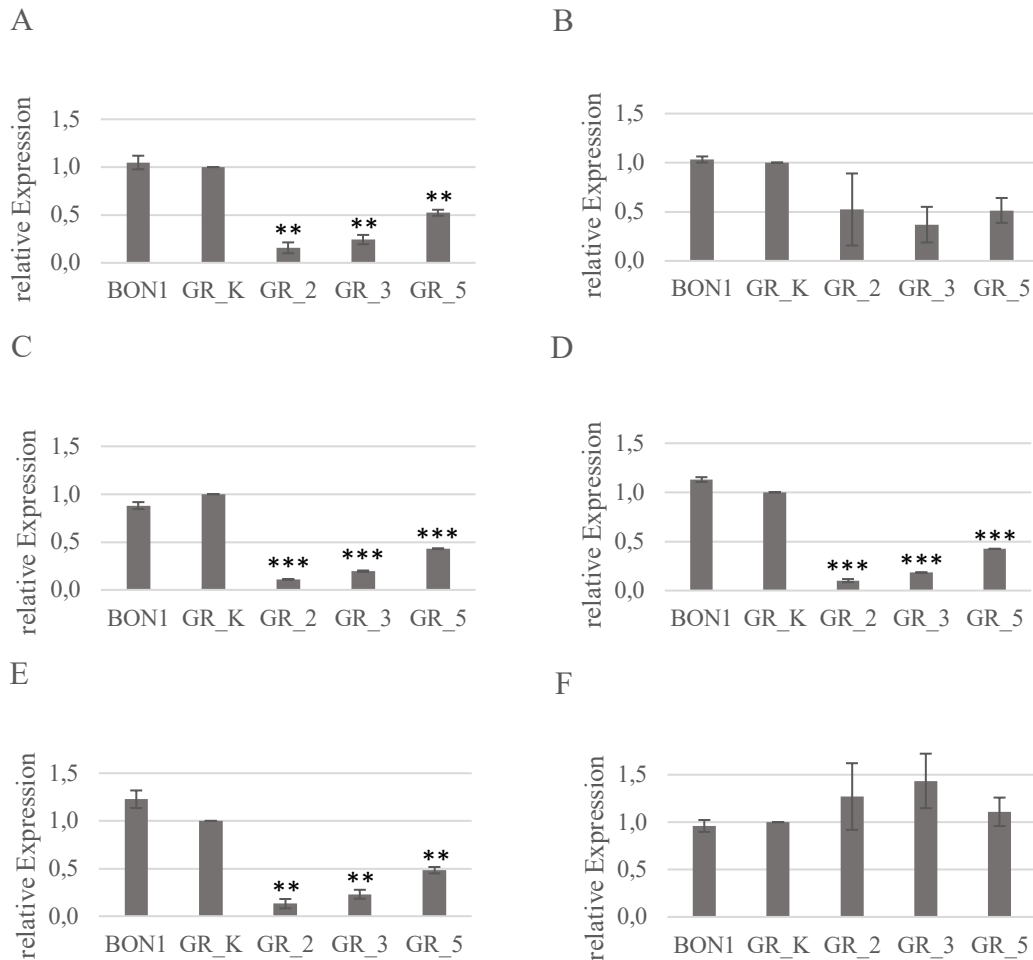


Abbildung 4: PLAC8 Knockdown auf RNA-Ebene durch Transfektion mit GapmeRs

Die relative Expression von PLAC8 und LIN54 wurde mithilfe einer RT-PCR nach Transfektion mit 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX ermittelt. Es wurden die Mittelwerte aus n = 2 Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die relative Expression bei den GR_K-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** p < 0,01, *** p < 0,001. (A) Primer 2. Teilfragment (B) Primer 3. Teilfragment (C) Primer ORF (D) Primer UTR (E) Primer PLAC8 extended (F) Primer LIN54

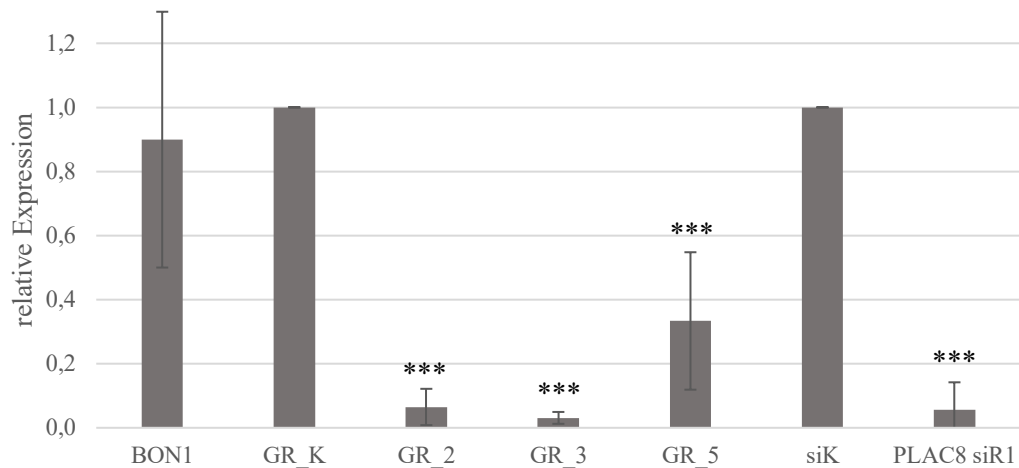
3.3 Erfolgreicher PLAC8-Knockdown auf Proteinebene

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich der auf RNA-Ebene stattfindende Knockdown auch auf der Protein-Ebene widerspiegelt. Dafür wurden Western Blots durchgeführt, im Rahmen derer zunächst der PLAC8-Knockdown untersucht wurde. Hierbei konnte, wie in Abbildung 5 anhand der Intensitätsminderung der Banden der behandelten Zellen im Vergleich zu denen der Kontrollen ersichtlich wird,

Ergebnisse

analog zu den Ergebnissen der RT-PCR konsequent ein erfolgreicher Knockdown insbesondere mit GapmeR 2 und 3 verzeichnet werden. Den Erwartungen entsprechend zeigte sich auch ein signifikanter Knockdown nach Behandlung mit einer spezifischen gegen PLAC8 gerichteten siRNA.

A



B

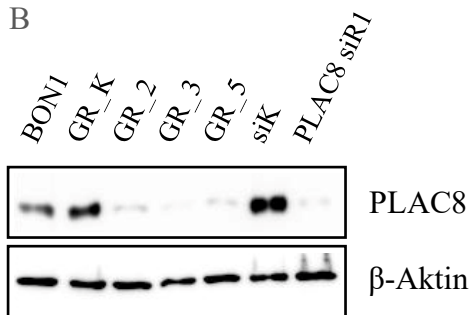


Abbildung 5: PLAC8-Knockdown auf Protein-Ebene

Die Proteinexpression von PLAC8 nach der Behandlung der BON1-Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8 wird gezeigt. Es wurden die Mittelwerte aus $n = 5$ Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Proteinexpression bei den GR_K- bzw. siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. *** $p < 0,001$. (A) Proteinexpression (B) Beispielblot

3.4 Beeinflussung von Proteinen der Zellzyklusregulation und Apoptose durch den PLAC8-Knockdown

Um Rückschlüsse darauf ziehen zu können, wie der Knockdown auf zellulärer Ebene funktioniert, wurden anschließend Proteine der Zellzyklusregulation und der Apoptose untersucht. Dafür wurden unter anderem die Proteine p21, pRPS6 und Cyclin D1 untersucht.

Ergebnisse

Bei den Western-Blot-Analysen konnte eine signifikante Hochregulation von p21 bei mit GapmeR 3 behandelten Zellen festgestellt werden, während bei mit GapmeR 2 bzw. 5 behandelten Zellen keine veränderte Expression des Proteins festzustellen war. Die kumulativen Ergebnisse der Proteinexpression sind in Abbildung 6 dargestellt.

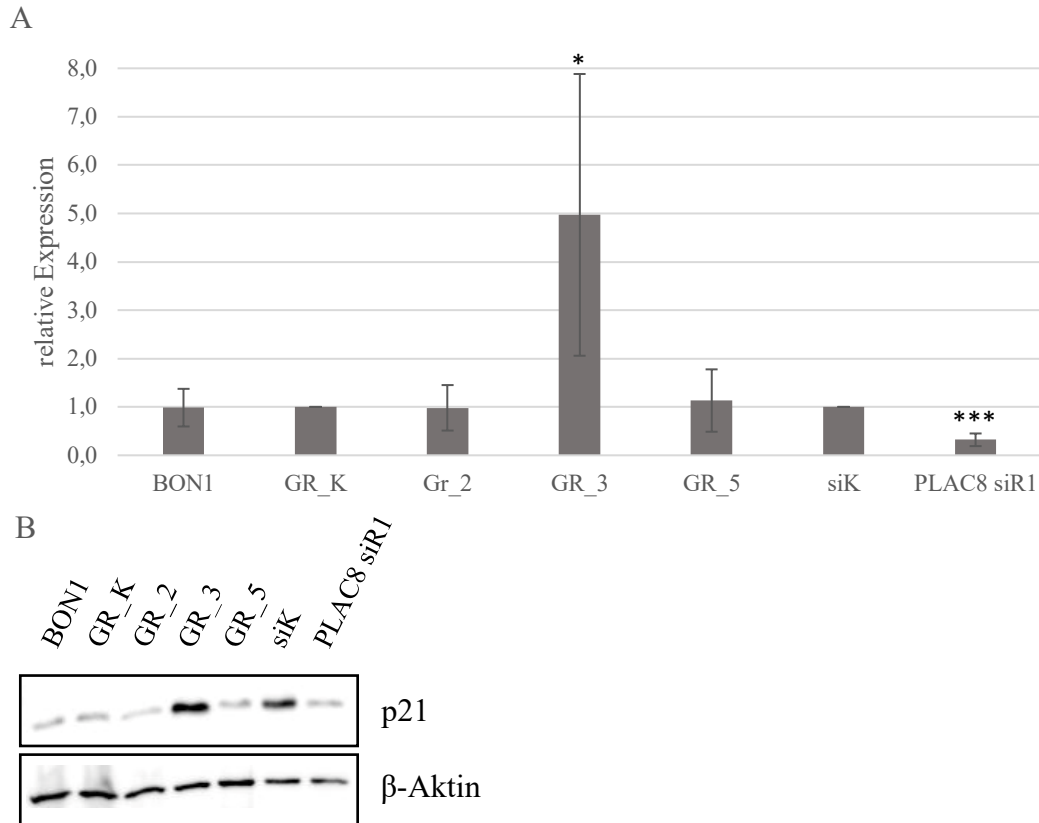


Abbildung 6: Expression des Proteins p21 nach der Behandlung von BON1-Zellen mit GapmeRs

Die Expression des Proteins p21 nach der Behandlung der BON1-Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8 wird gezeigt. Es wurden die Mittelwerte aus $n = 6$ Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Proteinexpression bei den GR_K- bzw. siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (A) Proteinexpression (B) Beispielblot

Die Positivkontrolle für p21 zeigte entgegen den Erwartungen eine Herunterregulation des Proteins. Als Positivkontrolle für eine Hochregulation von p21 und Herunterregulation von Cyclin D1 wurden Zellen verwendet, die mit einer PLAC8-spezifischen siRNA behandelt worden waren, da in früheren Untersuchungen bereits eine Hochregulation von p21 bzw. eine Herunterregulation von Cyclin D1 nach Transfektion der Zellen mit PLAC8-spezifischen siRNAs nachgewiesen werden konnte (Tatura et al., 2020). Ebendiese Herunterregulation des Proteins Cyclin D1 durch die Behandlung mit einer gegen PLAC8 gerichteten siRNA konnte in allen durchgeführten Versuchen mit hoher Signifikanz bestätigt werden.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Expression des Proteins bei mit GapmeRs gegen PLAC8 behandelten Zellen zeigte sich, wie in Abbildung 7 deutlich wird, eine signifikante Herunterregulation von Cyclin D1 nur bei mit GapmeR 2 und 5 transfizierten Zellen. Dem gegenüber war bei mit GapmeR 3 behandelten Zellen je nach Versuch keine veränderte Expression des Proteins ersichtlich, wobei sich dieses jedoch teilweise auch hoch- oder herunterreguliert zeigte.

Weiterhin wurde das Protein pRPS6 untersucht. Allerdings ist es schwierig, Western Blots, für die ein Antikörper gegen pRPS6 verwendet wurde, auszuwerten, da die verwendeten Antikörper dazu neigen zu verschmieren, was auch in Abbildung 7 deutlich wird. Somit lässt sich nur schwer eine Aussage zu einer veränderten Expression des Proteins treffen.

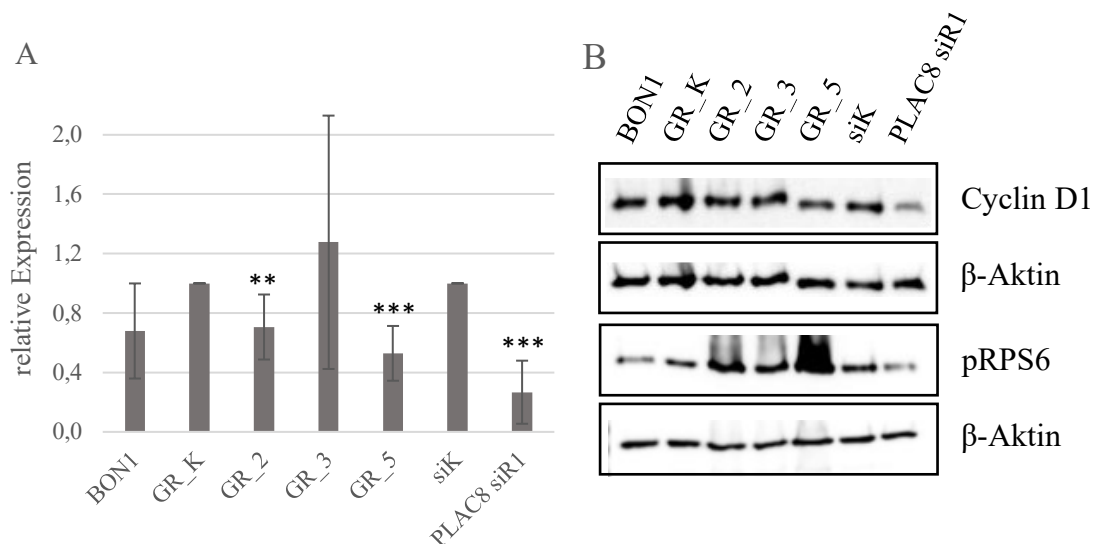


Abbildung 7: Weitere Zellzyklus-Proteine im Western Blot

Die Expression des Proteins Cyclin D1 und pRPS6 nach der Behandlung der BON1-Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8 wird gezeigt. Es wurden die Mittelwerte aus $n = 6$ Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Proteinexpression bei den GR_K bzw. siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (A) Proteinexpression von Cyclin D1 (B) Beispielblot für Cyclin D1 und pRPS6

Als Apoptosemarker wurden die Proteine Caspase 3 + Cleaved Caspase 3 und PARP untersucht. Im Falle einer stattfindenden Apoptose wäre eine Spaltung des jeweiligen Proteins auf der Membran sichtbar. Zur Sicherstellung eines grundsätzlich funktionierenden Versuchsablaufs wurde deshalb in eine Tasche des Gels eine Positivkontrolle appliziert, die ebendiese Spaltung aufwies, was in Abbildung 8 deutlich wird. Allerdings konnte bei den mit GapmeRs behandelten Zellen keine derartige

Ergebnisse

Spaltung der Apoptosemarker nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die verminderte Zellviabilität nicht auf einen apoptotischen Prozess zurückzuführen ist.

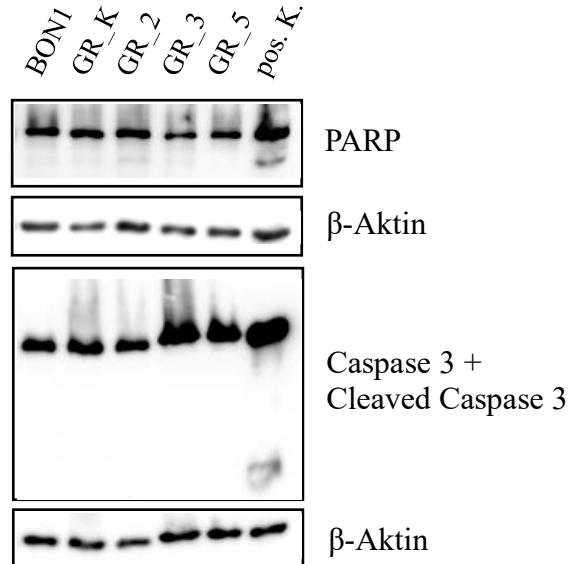


Abbildung 8: Keine ersichtliche Apoptose im Western Blot

Die Abbildung zeigt einen beispielhaften Western Blot zur Expression der Apoptosemarker PARP und Caspase 3 + Cleaved Caspase 3 nach der Transfektion der Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8.

Zur weiteren Untersuchung der eingangs formulierten Hypothese, wonach das downstream von PLAC8 lokalisierte LIN54 als Mediator der PLAC8-vermittelten Effekte fungieren und ein möglicher Feedback-Loop zwischen LIN54 und PLAC8 bestehen könnte, wurde auch die Expression von LIN54 nach Behandlung der Zellen mit gegen PLAC8 gerichteten GapmeRs analysiert.

Wie Abbildung 9 zeigt, konnte im Rahmen dessen keine signifikante Veränderung der Expression von LIN54 festgestellt werden.

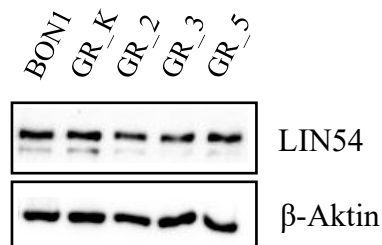


Abbildung 9: Keine signifikante Veränderung der Expression von LIN54 im Western Blot

Die Abbildung zeigt einen beispielhaften Western Blot zur Expression des Proteins LIN54 nach der Transfektion der Zellen mit GapmeRs gegen PLAC8.

3.5 Vermehrte Ansammlung der Zellen in der S-Phase bei Durchführung einer Durchflusszytometrie des Zellzyklus

Abgesehen von der Untersuchung der Proteine der Zellzyklusregulation im Rahmen einer Western-Blot-Analyse sollte die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen mithilfe einer Durchflusszytometrie quantifiziert werden.

Dabei konnte eine vermehrte Ansammlung der Zellen in der S-Phase nachgewiesen werden. Bei den mit GapmeR 2 behandelten Zellen befanden sich im Mittel um bis zu 10 % mehr Zellen in der S-Phase als bei den entsprechenden Kontrollen. Diese Umverteilung der Zellen schien insbesondere auf Kosten der Zellzahl in der G₁-Phase stattzufinden, da diese im Vergleich zu den Kontrollen bei mit GapmeR 2 und GapmeR 3 behandelten Zellen eine signifikante Reduktion aufwies. Außerdem konnte eine leichte Zunahme der Zellzahl in der G₂-Phase festgestellt werden. Die beschriebenen Beobachtungen waren, wie Abbildung 10 zeigt, in absteigender Reihenfolge am stärksten bei mit GapmeR 2 und nachfolgend bei mit GapmeR 3 bzw. 5 behandelten Zellen ersichtlich.

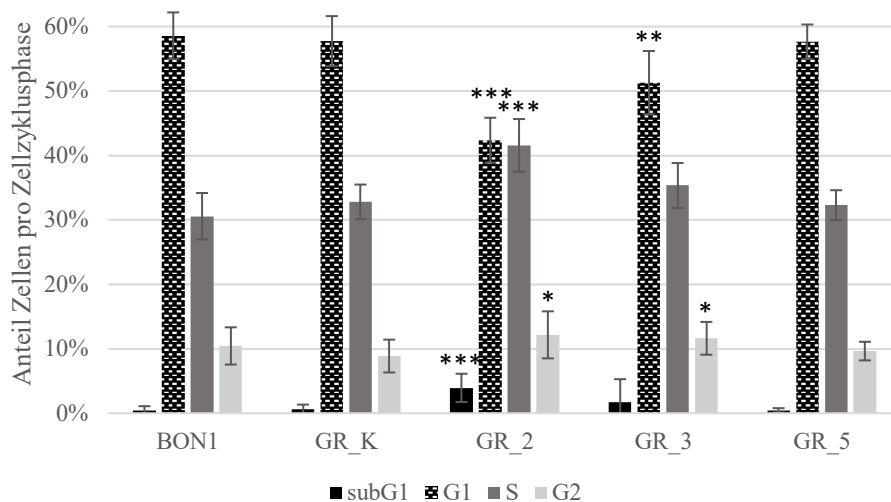


Abbildung 10: Durchflusszytometrie Zellzyklus 72 h nach der Transfektion

Die Darstellung der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen erfolgte durch eine Durchflusszytometrie 72 h nach Transfektion der Zellen mit 6 μ l GapmeRs und 4 μ l RNAiMAX. Die Werte wurden aus n = 10 Versuchen zusammengefasst. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt, bei dem die Proben mit der GR_K verglichen wurden. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Zur besseren Interpretation dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen zusätzlich für 24 Stunden mit Nocodazol behandelt wurden. Dieses führt zu einem Arrest der Zellen in der G₂-Phase. Die entsprechenden Versuchsreihen bestanden aus zwei parallel durchgeführten Experimenten, die aus derselben

Ergebnisse

Zellkulturpassage stammten. In einem Ansatz erfolgte die Transfektion der Zellen wie gewohnt 48 Stunden nach der Aussaat, gefolgt von der Ernte der Proben 72 Stunden später.

Im parallelen Vergleichsansatz wurden die Zellen ebenfalls 48 Stunden nach der Aussaat transfiziert. 24 Stunden vor der geplanten Ernte, also insgesamt 48 Stunden nach der Transfektion, wurden den Zellen 2 µl Nocodazol pro Well zugegeben. Die Proben wurden auch in diesem Ansatz 72 Stunden nach der Transfektion geerntet. Die anschließende Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie erfolgte gemäß dem in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Standardprotokoll.

Da der Versuch ohne Nocodazol im Rahmen dieses Versuchsansatzes nur zweimal durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse in Abbildung 11A weniger signifikant als bei dem ansonsten identischen Versuchsansatz in Abbildung 10, bei dem die Ergebnisse aus $n = 10$ Versuchen zusammengefasst wurden. Insgesamt zeigen jedoch beide Abbildungen übereinstimmende Resultate mit einer ähnlichen Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen.

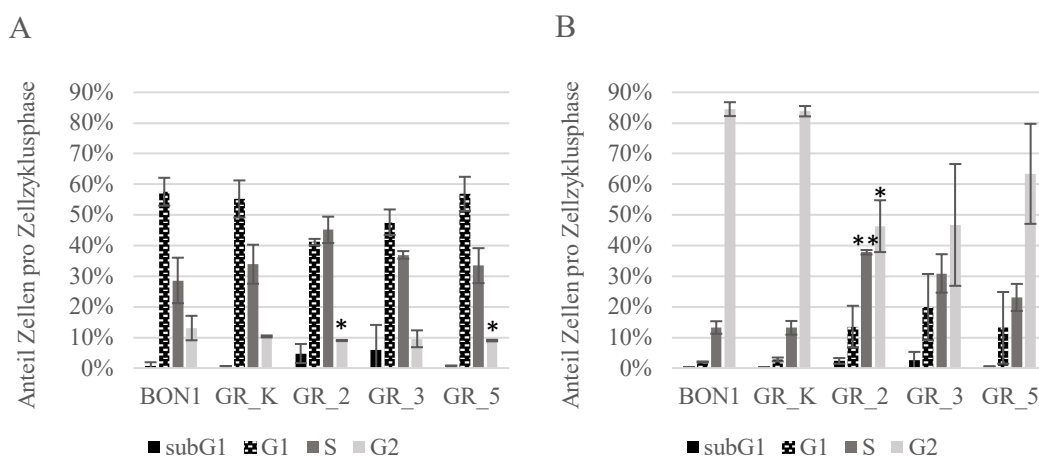


Abbildung 11: Durchflusszytometrie Zellzyklus ohne und mit Verwendung von Nocodazol im Vergleich

Zur besseren Interpretation der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen erfolgte zusätzlich eine Durchflusszytometrie zweier parallel ablaufender Vergleichsansätze mit und ohne Nocodazol. Die Messung fand bei beiden Versuchsansätzen 72 h nach der Transfektion der Zellen mit 6 µl GapmeRs und 4 µl RNAiMAX statt. Die Werte wurden aus $n = 2$ Versuchen zusammengefasst. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt, bei dem die Proben mit der GR_K verglichen wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (A) Durchflusszytometrie Zellzyklus 72 h nach Transfektion ohne Nocodazol (B) Durchflusszytometrie Zellzyklus 72 h nach Transfektion mit Zugabe von 2 µl Nocodazol pro Well jeweils 48 h nach der Transfektion.

Nach der Zugabe von Nocodazol befanden sich bei den beiden Kontrollen im Mittel über 80 % der Zellen in der G₂-Phase, was in Abbildung 11 dargestellt wird. Dies spricht dafür, dass die Zugabe von Nocodazol den erwarteten Effekt erzielen konnte. Die Zellen, die zuvor zusätzlich einer Behandlung mit GapmeR 2 oder 3 unterzogen worden waren,

Ergebnisse

befanden sich im Mittel nur zu knapp über 46 % in der G₂-Phase. Wie auch im Rahmen der anderen Versuchsmethoden bereits festgestellt, waren die geringsten Effekte bei mit GapmeR 5 transfizierten Zellen zu verzeichnen, sodass sich hier im Durchschnitt etwa 63 % der Zellen in der G₂-Phase befanden.

Die Zellen, denen ein vollständiges Durchlaufen des Zellzyklus bis zum Erreichen der G₂-Phase offenbar nicht gelungen ist, haben sich augenscheinlich insbesondere in der S-Phase gesammelt. Einem geringen Anteil der Zellen war es den Ergebnissen zufolge bis zum Zeitpunkt der Messung nicht gelungen, die S-Phase zu erreichen, sodass diese sich noch in der G₁-Phase befanden. Dies unterstützt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Untersuchungen ohne die Verwendung von Nocodazol.

Dieser angedeutete S-Phase-Arrest legte eine genauere Untersuchung der S-Phase nahe. Mithilfe eines BrdU-Assays, bei dem Bromdesoxyuridin als Thymidin-Analogon in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut wird, sollte der Anteil aktiv proliferierender Zellen an der Zellpopulation beurteilt werden. Insgesamt konnte bei den transfizierten BON1-Zellen eine verringerte Proliferationsrate festgestellt werden. Diese lag bei mit GapmeR 2 behandelten Zellen im Durchschnitt um 24 Prozentpunkte und bei mit GapmeR 3 und 5 transfizierten Zellen im Mittel ungefähr 12 Prozentpunkte niedriger als bei den mit der GapmeR-Kontrolle behandelten Zellen. Statistisch signifikant war hierbei jedoch lediglich die durch Transfektion mit GapmeR 2 und 5 ausgelöste Proliferationsverminderung.

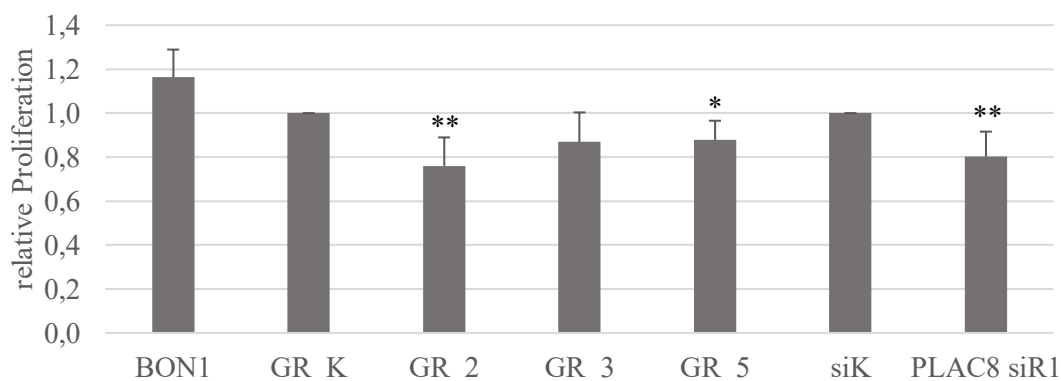


Abbildung 12: BrdU-Assay 72 h nach Transfektion

Über eine indirekte Messung der DNA-Synthese mit einem BrdU-Assay wurde die Proliferation der Zellen beurteilt. Das BrdU-Assay wurde dabei 72 h nach der Transfektion der Zellen mit 3 µl GapmeRs und 2 µl RNAiMAX bzw. 2 µl siRNAs und 1,5 µl RNAiMAX durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte aus n = 5 Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Proliferation der GR_K- bzw. siK-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Ergebnisse

In vorausgegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe konnte bereits eine Proliferationshemmung der Zellen durch Behandlung mit PLAC8-spezifischen siRNAs festgestellt werden, die hierbei als Positivkontrolle genutzt wurden. Diese verminderte aktive DNA-Synthese lag in einer ähnlichen Größenordnung wie die nun nachgewiesene Proliferationshemmung durch Behandlung mit GapmeRs, was durch Abbildung 12 dargestellt wird.

3.6 DNA-Damage als möglicher Effekt der Transfektion mit GapmeRs gegen PLAC8

Die Vermutung, dass eine Proliferationshemmung der Zellen als zentraler, durch GapmeRs hervorgerufener Effekt betrachtet werden könnte, war ausschlaggebend für die Durchführung eines γ -H2AX-Foci-Stainings. Dieses dient der bildlichen Darstellung von DNA-Schäden durch eine immunhistochemische Reaktion, wodurch Doppelstrangbrüche sichtbar gemacht werden können. Zellkerne stellen sich in den Abbildungen blau dar, während die DNA-Schäden als grüne Punkte erkennbar sind. Als Positivkontrolle wurde Mitomycin C verwendet, das zu DNA-Strangbrüchen in den Zellen führt. Die optimale Mitomycin-Konzentration pro Well wurde mithilfe eines Killing-Assays bestimmt. Dazu wurden 48 Stunden nach der Aussaat der Zellen verschiedene Mitomycin-Konzentrationen zwischen 100 nM und 600 nM direkt in das Medium der einzelnen Wells pipettiert. 72 Stunden später wurde diejenige Mitomycin-Konzentration, bei der die Zellviabilität auf unter 50 % gesunken war, mithilfe eines MTT-Assays ermittelt.

Bei den Experimenten wurden abgesehen von den beiden Kontrollen sowie den mit Mitomycin C behandelten Zellen nur die Zellen untersucht, die mit GapmeR 2 transfiziert worden waren, da bei den vorausgegangenen Versuchen für diesen GapmeR in der Regel die stärksten Effekte beobachtet worden waren.

Nachdem in anfänglichen Versuchen bereits ein vermehrtes Auftreten von Foci in transfizierten Zellen festgestellt werden konnte, sollte durch das Durchführen des Stainings zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion nun der Zeitpunkt des maximalen DNA-Schadens bestimmt werden.

Abbildung 13 dient zur Veranschaulichung der Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche bei mit GapmeR 2 behandelten Zellen in Abhängigkeit von der vergangenen Zeit nach der Transfektion.

Ergebnisse

Abbildung 13A verdeutlicht dabei den Unterschied in der zunehmenden Anzahl der Doppelstrangbrüche zwischen transfizierten Zellen und den mit der GapmeR-Kontrolle behandelten bzw. unbehandelten Zellen. Vier Stunden nach der Transfektion waren bei den behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen keine vermehrten Foci zu erkennen. Ab 12 Stunden nach der Transfektion waren die ersten signifikanten Effekte zu verzeichnen, wobei bei den behandelten Zellen rund 14 % der Zellen bereits mehr als 10 Foci pro Zellkern aufwiesen, während der Anteil bei den Kontrollen bei lediglich knapp 2–3 % lag. Maximal stieg der Anteil der Zellen mit mehr als 10 Foci pro Nukleus auf knapp über 20 %, was insbesondere im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden der Fall zu sein schien. Im Mittel lag der Anteil der Zellen mit über 10 Foci pro Nukleus bei 24 Stunden sowie bei 48 Stunden nach der Transfektion etwa bei 16 %. Bei einem weiter verlängerten Zeitintervall zwischen der Transfektion und der Durchführung des Stainings schien es zu keiner maßgeblichen weiteren Zunahme der Doppelstrangbrüche zu kommen. Somit lässt sich vermuten, dass der maximale DNA-Schaden etwa 24 Stunden nach der Transfektion auftritt.

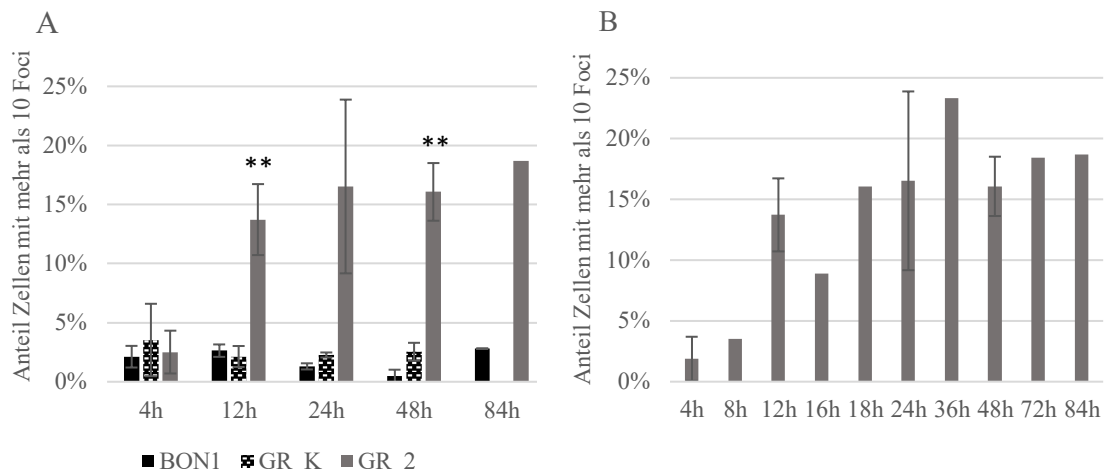


Abbildung 13: Zeitreihe γ -H2AX-Foci-Staining nach GapmeR-Transfektion

Die Abbildungen repräsentieren die Zunahme des DNA-Schadens in Abhängigkeit von der vergangenen Zeit nach der Transfektion. Die Werte wurden aus einer unterschiedlichen Anzahl von Versuchen zusammengefasst: 4 h (n = 3), 8 h (n = 1), 12 h (n = 4), 16 h (n = 1), 18 h (n = 1), 24 h (n = 4), 36 h (n = 1), 48 h (n = 3), 72 h (n = 1), 84 h (n = 1). Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt, bei dem die Proben mit der GR_K verglichen wurden. ** $p < 0,01$. (A) Zeitreihe von 4 h – 84 h mit Gegenüberstellung der mit GapmeR 2 transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten bzw. mit GapmeR Kontrolle behandelten Zellen. (B) Zeitreihe von 4 h bis 84 h bei mit GapmeR 2 behandelten Zellen.

Zur beispielhaften Darstellung der Foci sind in Abbildung 14A und C jeweils die unbehandelten BON1-Zellen sowie die mit der GapmeR-Kontrolle behandelten Zellen 24 Stunden nach der Transfektion zu erkennen. Hierbei lässt sich feststellen, dass kein

Ergebnisse

Zellkern mehr als 10 Foci aufweist. Demgegenüber stehen die in Abbildung 14B dargestellten, 24 Stunden nach der Transfektion mit GapmeR 2 behandelten Zellen, bei denen mehrere Zellkerne mit über 10 Foci erkennbar sind. Die als Positivkontrolle dienenden, mit Mitomycin C behandelten Zellen sind in Abbildung 14D ersichtlich und weisen teilweise zahlreiche Foci pro Nukleus auf.

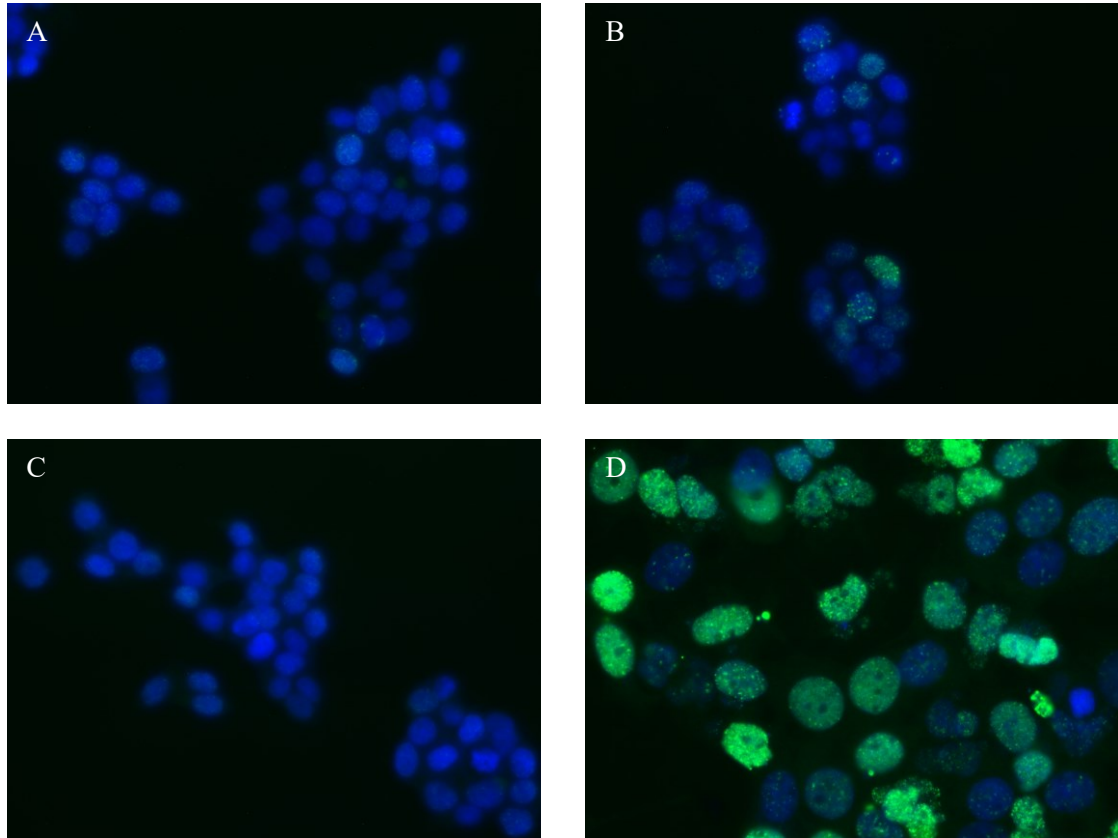


Abbildung 14: γ -H2AX-Foci-Staining 24 h nach Transfektion und Mitomycin-Positivkontrolle

DNA-Doppelstrangbrüche wurden mithilfe eines γ -H2AX-Foci-Staining dargestellt. Grün fluoreszierende Signalpunkte, sogenannte Foci, spiegeln Doppelstrangbrüche wider. (A) unbehandelte BON1-Zellen 24 h nach der Transfektion. (B) BON1-Zellen 24 h nach der Transfektion mit GapmeR 2. (C) BON1-Zellen 24 h nach der Transfektion mit der GapmeR-Kontrolle. (D) BON1-Zellen nach der Behandlung mit Mitomycin als Positivkontrolle.

Zur weiteren Interpretation dieser Ergebnisse wurden erneut Western-Blot-Versuche durchgeführt. Hierbei sollte die Expression von Proteinen, die zentrale Rollen in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden spielen, genauer betrachtet werden. Dabei wurde die Expression der ATPase RAD51, von CHK1 und pCHK1 sowie ATR und pATM untersucht. Als Positivkontrolle wurde bei allen fünf Proteinen Mitomycin C eingesetzt. Bei RAD51 ließ sich eine Abnahme der Expression des Proteins bei mit GapmeR 2 behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen feststellen, wie in Abbildung 15 dargestellt ist.

Ergebnisse

Die Darstellung der Proteinkinasen CHK1 und pCHK1 mittels Western Blot gestaltete sich als schwierig, weshalb verschiedene Versuchsbedingungen getestet wurden.

Es ließ sich feststellen, dass CHK1 im Vergleich zu den Kontrollen in mit Gapmer 2 transfizierten Zellen weniger stark exprimiert wurde. Demgegenüber konnte keine Veränderung der Expression von pCHK1 bei behandelten Zellen gezeigt werden.

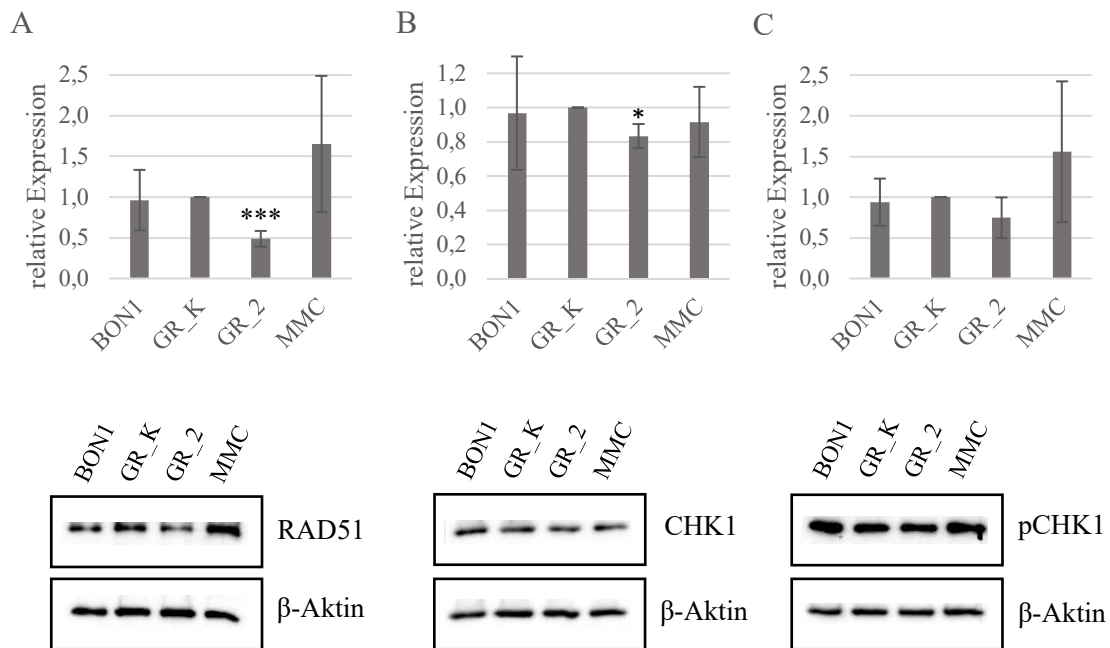


Abbildung 15: DNA-Damage-Response Marker im Western Blot

Die Expression der DNA-Damage Marker RAD51, CHK1 und pCHK1 nach der Behandlung der BON1-Zellen mit Gapmer 2 gegen PLAC8 sowie jeweils ein beispielhafter Western Blot werden gezeigt. Die Werte für das Protein RAD51 wurden aus $n = 5$, für das Protein CHK1 aus $n = 3$ und für das Protein pCHK1 aus $n = 4$ Versuchen zusammengefasst. Es wurden die Mittelwerte aus den Versuchen gebildet und die untersuchten Proben auf die Proteinexpression bei den GR_K-behandelten Zellen normiert. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte, während die Whisker die Standardabweichungen der jeweiligen Messwerte darstellen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (A) Proteinexpression von RAD51 (B) Proteinexpression von CHK1 (C) Proteinexpression von pCHK1

Bei dem 300 kDa großen Protein ATR und 350 kDa großen Protein pATM manifestierte sich das Problem, dass trotz langer Laufzeit der Gelelektrophorese und Blottingzeiten von bis zu 3,5 Stunden bei variierender Verwendung von Membranen, Block- und Verdünnungsmedien sowie Antikörperkonzentrationen keine Banden auf den Membranen sichtbar gemacht werden konnten. Gleichzeitig funktionierte die Darstellung der Ladekontrolle β -Aktin konsequent, sodass die Überlegung nahe liegt, dass der Transfer dieser großen Proteine auf die Membranen nicht gelungen ist.

4 Diskussion

Wie zu Beginn der Arbeit dargestellt wurde, handelt es sich bei PLAC8 um ein Gen, das im Zusammenhang mit zahlreichen Tumorerkrankungen in Erscheinung tritt. Dabei fungiert es kontextabhängig als Onkogen oder Tumorsuppressor und ist insbesondere aufgrund seiner proliferationsfördernden Wirkung von großer Bedeutung. Zudem kann es zu einem verminderten Therapieansprechen beitragen.

Die Überexpression von PLAC8 in pankreatischen duktalem Adenokarzinomen aber auch in neuroendokrinen Tumoren des Pankreas wurde bereits beschrieben (Kaistha et al., 2016; Tatura et al., 2020). Darüber hinaus konnte in der Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass zwar ein Knockout von PLAC8 auf Protein-, jedoch nicht auf RNA-Ebene möglich ist, was die Vermutung nahelegte, dass PLAC8 in Form einer lncRNA wirken könnte (Stark, 2022).

Ziel der Arbeit war es, den potenziellen Zusammenhang zwischen PLAC8 und dem als möglichen Mediator identifizierten LIN54 zu untersuchen. Dabei kamen MTT-Assays und RT-PCR-Analysen zum Einsatz, um die funktionelle Bedeutung von LIN54 im Kontext der PLAC8-vermittelten Effekte näher zu betrachten. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Analyse der Auswirkungen einer Transfektion mit gegen PLAC8 gerichteten GapmeRs. Im Rahmen dieser Experimente wurden insbesondere die Auswirkungen auf die Zellviabilität, die Expression der PLAC8-RNA sowie der Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose mithilfe von Western Blot und Durchflusszytometrie analysiert. Darüber hinaus wurden die Proliferationsrate der Zellen und das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht.

4.1 Wachstumsverhalten der BON1-Zellen als möglicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse

Das Wachstumsverhalten der BON1-Zellen erwies sich in den durchgeführten Experimenten als wesentlicher Einflussfaktor.

Insbesondere bei den anfänglichen Versuchen zur Zellviabilität, bei denen die optische Dichte des Reaktionsgemisches mithilfe eines MTT-Assays bestimmt wurde, fiel auf, dass die Effekte der Transfektion mit GapmeRs bei BON1-Zellen im Vergleich zu Versuchen der Arbeitsgruppe mit S2-007- oder G2#1-Zellen deutlich geringer ausfielen. Auch in der Literatur werden Unterschiede in der Reduktion des MTT-Reagenz in Abhängigkeit von der Zelllinie beschrieben (Vistica et al., 1991). Bei der Beobachtung

Diskussion

des Zellwachstums unter einem optischen Mikroskop wurde deutlich, dass sich BON1-Zellen durch ein Wachstum in Zellhaufen auszeichnen und zur Verklumpung neigen. Dies könnte bewirken, dass der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid nur eingeschränkt in die Zellen gelangen kann und somit die Reduktion zu dem blau-violetten Farbstoff Formazan nicht in vollem Maße stattfinden kann. Für die Zelllinien S2-007 und PaTu8988T (Kaistha et al., 2016) werden in der Literatur ebenfalls stärkere Effekte im MTT-Assay nach PLAC8-Knockdown durch siRNAs beschrieben als für BON1-Zellen (Tatura et al., 2020).

Eine ähnliche Problematik und weniger starke Effekte im Vergleich zu anderen Zelllinien manifestierten sich bei der Durchführung der BrdU-Assays, bei denen das klumpige Zellwachstum zu einer verminderten Einlagerung des Bromdesoxyuridin in die DNA geführt haben könnte.

Die Zellzyklusanalyse mithilfe der Durchflusszytometrie machte dieses Wachstumsphänomen der BON1-Zellen ebenfalls ersichtlich. Bei der Auswertung der Ergebnisse mit der Software FlowJo wurde bei den ersten Versuchen ein großer Anteil der untersuchten Zellen als Dubletten identifiziert. Deshalb wurde eine Anpassung der Methodik vorgenommen, indem die Zellen vor der Messung zunächst mithilfe einer Pipette resuspendiert und damit vereinzelt wurden, wodurch das zuvor aufgetretene Problem wesentlich minimiert werden konnte.

Auch bei dem γ -H2AX-Foci-Staining erschwerte das haufenartige Wachstum der Zellen die Auswertung der Foci mit dem Programm ImageJ, da die Zellgrenzen teilweise nicht eindeutig voneinander abzugrenzen waren. Zudem wuchsen die Zellen teilweise in so großen Haufen und auch übereinander, dass eine Begutachtung der Zellen und vorhandener Foci kaum möglich war. Um einen Bias durch willkürliches Auswählen der Gesichtsfelder, die zum Auszählen der Zellen verwendet wurden, zu vermeiden, wurde zunächst mithilfe der Mikroskop-Kreuztisch-Steuerung eine zufällige Region auf dem Objektträger eingestellt und anschließend in einem begrenzten Gebiet solche Gesichtsfelder ausgewählt, in denen die Zellen größtenteils vereinzelt vorlagen.

In einer Studie von Monazzam et al. wird ebenfalls die ausgeprägte Heterogenität von BON1-Zellen hinsichtlich ihrer Zellform sowie die Tendenz zum clusterförmigen Wachstum nach Knockdown von MEN1 beschrieben (Monazzam et al., 2020). Zusammenfassend verdeutlichen diese Beobachtungen, dass die Wachstumsbesonderheiten der BON1-Zellen die Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussen könnten und diese daher kritisch interpretiert werden sollten.

4.2 Relevanz von PLAC8 für ein Überleben und die Proliferation von BON1-Zellen

Wie bereits in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe festgestellt werden konnte, spielt PLAC8 eine wesentliche Rolle für das Überleben und die Proliferation verschiedener pankreatischer Tumorzelllinien.

Frühere Publikationen belegen, dass ein PLAC8-Knockdown mit einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität einhergeht. Dabei gelang durch Behandlung der Zellen mit gegen PLAC8 gerichteten siRNAs eine Verminderung der Zellviabilität im MTT-Assay auf etwa 50–70 % bei BON1-Zellen (Tatura et al., 2020), auf etwa 50 % bei S2-007-Zellen und auf rund 30 % bei PaTu8988T-Zellen (Kaistha et al., 2016). Auch in Tumorzellen anderer Entitäten, wie beispielsweise beim klarzelligem Nierenkarzinom, konnten ähnliche Effekte nach der Transfektion mit PLAC8-spezifischen siRNAs beobachtet werden (Shi et al., 2017). Weiterhin zeigte eine Publikation zu durch Cadmium-Exposition ausgelösten Prostatakarzinomen eine Überexpression von PLAC8. Auch hier führte die Transfektion der Zellen mit spezifischen siRNAs gegen PLAC8 zu einer verminderten Viabilität der Zellen (Kolluru et al., 2017). In einer Studie von Mao et al. konnte anhand von Mammakarzinom-Zellen nicht nur eine Verminderung der Zellviabilität durch siRNA-vermittelten PLAC8-Knockdown, sondern zusätzlich eine durch den Knockdown gesteigerte Sensitivität der Krebszellen gegenüber Tamoxifen erreicht werden (Mao et al., 2021).

Insgesamt bestätigen diese Beobachtungen aus der Literatur die Ergebnisse der MTT-Assays der vorliegenden Arbeit. In BON1-Zellen reduzierte sowohl der siRNA- als auch der GapmeR-vermittelte Knockdown von PLAC8 die Zellviabilität signifikant, wobei der Effekt bei den GapmeRs stärker ausgeprägt war.

Diese Daten untermauern die in der Literatur beschriebenen Effekte eines PLAC8-Knockdowns und verdeutlichen somit erneut, dass das Gen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und dem Überleben der Zellen einnimmt. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Auftreten dieser Effekte zunächst unabhängig von der Art der Transfektion zu sein scheint, durch die der Knockdown induziert wird. Allerdings weist die höhere Effizienz der GapmeR-Transfektion darauf hin, dass diese aufgrund ihrer spezifischeren Wirkungsweise, die sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern erfolgt, wirksamer ist als die Transfektion mit siRNAs.

4.3 Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs zwischen den Proteinen PLAC8 und LIN54

Aufgrund der Tatsache, dass ein vollständiger Knockout von PLAC8 auf RNA-Ebene nicht erzielbar ist, bestand die Vermutung, dass das PLAC8-Transkript möglicherweise als lncRNA fungieren könnte (Stark, 2022). Nachdem LIN54 als potenzieller Mediator der PLAC8-vermittelten Effekte identifiziert worden war, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den Proteinen untersucht werden, der jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Im Rahmen von MTT-Assays konnte keine Verminderung der Zellviabilität nach der Transfektion der Zellen mit siRNAs gegen LIN54 beobachtet werden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben wird. Eine leicht verringerte Zellviabilität in der siRNA-Kontrollgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wie Abbildung 1 zeigt, könnte transfektionsbedingt sein. Eine dosisabhängige Zytotoxizität von siRNAs ist bereits in der Literatur beschrieben (Grimm, 2011). Diesem Effekt wird jedoch keine wesentliche Bedeutung beigemessen.

Trotz erfolgreichen Knockdowns von LIN54 auf RNA-Ebene nach Transfektion mit LIN54-spezifischen siRNAs zeigte sich keine verminderte Expression von PLAC8 auf RNA-Ebene. Auch bei den mit siRNAs gegen PLAC8 behandelten Zellen konnte zwar ein erfolgreicher PLAC8-Knockdown auf RNA-Ebene gelingen, jedoch kein Effekt auf die LIN54-RNA herausgestellt werden. Im Western Blot konnte keine Veränderung der Expression des Proteins LIN54 gezeigt werden, nachdem die BON1-Zellen einer Behandlung mit PLAC8-spezifischen GapmeRs unterzogen worden waren. In Zusammenschau der Ergebnisse wurde somit zunächst Abstand von der Hypothese genommen, dass ein Feedback-Loop zwischen PLAC8 und LIN54 besteht.

In einer Publikation von Chen et al. wurde die lncRNA HOXD-AS1 untersucht, die bereits als onkogene lncRNA in einigen Tumorarten beschrieben wurde. Hierbei konnte eine Hochregulation dieser lncRNA in Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden. HOXD-AS1 bindet die tumorunterdrückende microRNA miR-664b-3p, wodurch deren hemmende Wirkung auf PLAC8 aufgehoben wird. Dies resultiert in einer Hochregulation von PLAC8, was mit einer gesteigerten Proliferation der Zellen einhergeht (Chen et al., 2022). Auch die lncRNA EPIC1 wird bei Pankreaskarzinomen vermehrt exprimiert und korreliert unter anderem mit der Tumorgröße. Durch gezielte Behandlung der Zellen mit spezifischen siRNAs konnte es gelingen, das Zellwachstum einzuschränken (Xia et al., 2020). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass PLAC8 in ein lncRNA-gesteuertes Netzwerk

eingebunden sein könnte und liefern somit einen weiteren Hinweis darauf, dass PLAC8 selbst potenziell lncRNA-ähnliche Funktionen ausüben könnte. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe an S2-007-Zellen wurde ebenfalls bereits die potenzielle lncRNA-Wirkung von PLAC8 untersucht. Dabei konnte für die Gene E2F1, E2F2, E2F5, HYOU1, CHPT1, TGOLN2 sowie B3GALT5 bisher kein funktioneller Zusammenhang festgestellt werden (Stark, 2022).

Dass LIN54 jedoch grundsätzlich ein potenzieller Angriffspunkt im Rahmen onkologischer Therapien sein könnte, zeigten Daten aus einer Studie zu gastrointestinalen Stromatumoren. LIN54 ist Bestandteil des DREAM-Komplexes, der eine zentrale Rolle beim Übergang der Zellen in die G₀-Phase spielt (Hwang & Kim, 2025). Ein gezielter Knockdown von LIN54 allein führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate nach Imatinib-Behandlung. In Kombination mit einem Knockdown von E2F4, einem weiteren DREAM-Komplex-Protein, konnte unter Imatinib-Behandlung jedoch eine signifikante Zunahme der Apoptose festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Zellen ohne funktionierenden DREAM-Komplex infolge eines LIN54/E2F4-Knockdowns nicht mehr in die G₀-Phase übergehen, sondern im Zellzyklus verbleiben und dadurch wieder empfänglich für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib werden (Boichuk et al., 2013). In der Literatur finden sich zudem Hinweise auf eine bestehende Sensitivität von BON1-Zellen gegenüber einer Imatinib-Behandlung. So konnte in einer in-vitro-Studie bei der Durchführung von MTT-Assays eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung von Imatinib auf BON1-Zellen gezeigt werden (Yao et al., 2007).

Im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit konnte durch MTT-Assays gezeigt werden, dass ein siRNA-vermittelter Knockdown von LIN54 in BON1-Zellen keine reduzierte Zellviabilität zur Folge hat. Dies spricht dafür, dass der alleinige Verlust von LIN54 in BON1-Zellen nicht ausreicht, um eine zytotoxische Wirkung hervorzurufen.

Vor dem Hintergrund dieser Befunde stellt sich die Frage, ob ein kombinierter Knockdown mehrerer DREAM-Komplex-Komponenten, wie in der Studie von Boichuk et al., auch in BON1-Zellen eine verstärkte Wirkung entfalten könnte. Es erscheint denkbar, dass durch die gezielte Störung des gesamten Komplexes die von Yao et al. beschriebene Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Imatinib weiter erhöht werden könnte. Daraus ergibt sich ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige funktionelle Untersuchungen, um die therapeutische Relevanz einer Zellzyklusmodulation im Kontext der Tyrosinkinaseinhibition bei neuroendokrinen Tumoren weiter zu evaluieren.

4.4 Wirkungsweise spezifischer siRNAs im Vergleich zu spezifischen GapmeRs

Da sich siRNAs und GapmeRs hinsichtlich ihres Wirkmechanismus unterscheiden, wurde im Folgenden untersucht, wie sich diese Unterschiede auf die Effizienz eines Knockdowns und die resultierenden zellulären Effekte auswirken.

Ein wichtiger Unterschied in der Wirkungsweise von GapmeRs im Vergleich zu siRNAs besteht darin, dass erstere ihre Wirkung häufig im Zellkern entfalten, während siRNAs im Zytoplasma aktiv sind (Abewe et al., 2020). Bei siRNAs handelt es sich um doppelsträngige RNA-Moleküle, die mithilfe des RISC bei perfekter Komplementarität zur Ziel-mRNA den Abbau dieser herbeiführen können (Kim & Rossi, 2007). GapmeRs hingegen sind einzelsträngige, chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide, die den Abbau der Ziel-mRNA durch Bildung eines RNA/DNA-Hybrids herbeiführen (Migawa et al., 2019).

Zur Gegenüberstellung von siRNAs und GapmeRs wurden in einer Studie von Lennox & Behlke verschiedene lncRNAs untersucht, die entweder bevorzugt im Zellkern, im Zytoplasma oder in beiden Kompartimenten lokalisiert sind. Die Ergebnisse zeigten, dass Antisense-Oligonukleotide insbesondere bei nukleär lokalisierten lncRNAs eine hohe Knockdown-Effizienz aufwiesen, während siRNAs vor allem bei zytoplasmatisch lokalisierten lncRNAs wirksam waren. Durch eine Kombination beider Verfahren konnte die Knockdown-Effizienz weiter verbessert werden (Lennox & Behlke, 2016). Amodio et al. untersuchten die Rolle der onkogenen lncRNA MALAT1 im multiplen Myelom. Hierbei kamen ebenfalls GapmeRs zum Einsatz, deren Anwendung in einer verringerten Lebensfähigkeit der Tumorzellen resultierte. Auffällig war, dass die Effekte stärker waren als bei den im Rahmen der Studie eingesetzten siRNAs gegen MALAT1 (Amodio et al., 2018).

Auch bei der Transfektion der BON1-Zellen mit gegen PLAC8 gerichteten siRNAs bzw. GapmeRs zeigten sich bereits im MTT-Assay Unterschiede. Während die Transfektion mit siRNAs lediglich zu einer Reduktion der Zellviabilität auf etwa 73 % führte, konnte durch die Behandlung mit GapmeRs in Abhängigkeit vom verwendeten Oligonukleotid eine deutlich stärkere Abnahme auf durchschnittlich 50–70 % erreicht werden.

Obwohl das PLAC8-Protein in pankreatischen Tumorzellen an der inneren Plasmamembran lokalisiert ist (Kaistha et al., 2016), erlaubt dies keine eindeutige Aussage über die intrazelluläre Lokalisation der PLAC8-mRNA. Für proteinkodierende mRNAs gilt allgemein, dass sie nach der Transkription im Zellkern in der Regel in das Zytoplasma exportiert und dort translatiert werden. Dennoch ist es möglich, dass ein Teil

der Transkripte vorübergehend oder anteilig im Zellkern verbleibt (Wegener & Müller-McNicoll, 2018). Ein solcher nukleärer Verbleib der PLAC8-Transkripte könnte erklären, warum GapmeRs im Vergleich zu siRNAs eine stärkere Wirkung zeigen, da sie bereits im Zellkern aktiv werden können. In Anlehnung an die Ergebnisse der beschriebenen Arbeit von Lennox & Behlke erscheint es daher denkbar, dass eine kombinierte Transfektion mit siRNAs sowie GapmeRs die Knockdown-Effizienz von PLAC8 weiter steigern könnte. Dies könnte in zukünftigen Experimenten gezielt untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, auch Effekte der Transfektion auf Zellzyklusregulatoren festgestellt werden, die im Einklang mit der Literatur stehen. In einer Studie zum nasopharyngealen Karzinom konnten verminderte Proteinkonzentrationen von Cyclin D1 nach einem CRISPR/Cas-vermittelten Knockout von PLAC8 festgestellt werden (Yang et al., 2018). Im Gegensatz dazu war in einer Studie zu oralen Plattenepithelkarzinomen von Wu et al. ein siRNA-vermittelter Knockdown von PLAC8 mit einer erhöhten Cyclin D1-Expression und gesteigerter Zellproliferation assoziiert. Umgekehrt führte die Überexpression von PLAC8 zu einer signifikanten Reduktion von Cyclin D1 und einer verminderten Proliferation. In Zusammenschau der Ergebnisse wurden die Effekte vermutlich über die PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Signalwege durch eine Herunterregulation der β -Catenin-Expression vermittelt (Wu et al., 2020). Allerdings konnte in früheren Arbeiten zu Pankreaskarzinomen festgestellt werden, dass ein erfolgreicher Knockdown von PLAC8 durch siRNAs in S2-007-Zellen auch in einer Herunterregulation des Zellzyklusproteins Cyclin D1 resultierte. Diese Veränderung der Expression war dabei nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern zusätzlich auf Proteinebene sichtbar (Kaistha et al., 2016). Auch bei gleichermaßen behandelten BON1-Zellen wurde bereits eine Herunterregulation des Cyclin D1-Proteins im Western Blot beschrieben (Tatura et al., 2020). Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurden mit siRNAs transfizierte BON1-Zellen als Positivkontrolle bei den Western Blots zu Cyclin D1 verwendet.

Eine verringerte Expression von Cyclin D1 würde der Wirkungsweise von Cyclin D1 entsprechend mit einer verminderten Progression der Zellen von der G₁- in die S-Phase einhergehen. Indem Cyclin D1 entweder an CDK4 oder CDK6 bindet, kann das Retinoblastom-Protein phosphoryliert werden, wodurch wiederum die Transkription von Genen für die DNA-Synthese und ein Eintritt in die S-Phase ermöglicht werden (Qie & Diehl, 2016).

Während die Positivkontrolle der mit siRNAs behandelten Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine signifikante Herunterregulation von Cyclin D1 zeigte, konnte in GapmeR-3-behandelten Zellen keine eindeutige Veränderung der Expression dieses Zellzyklusproteins nachgewiesen werden. Dagegen ließ sich in BON1-Zellen, die mit GapmeR 2 oder 5 transfiziert wurden, ebenfalls eine Reduktion der Cyclin-D1-Expression beobachten. Obwohl diese Abnahme nicht das Ausmaß der siRNA-Kontrolle erreichte, war sie dennoch statistisch signifikant. Insgesamt werden somit die vorliegenden Ergebnisse durch die Beobachtungen der beschriebenen Literatur gestützt. Auch bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen führte der Knockout von PLAC8 zu einer erniedrigten Expression von Cyclin D1 und zudem zu einer erhöhten Expression von p21 im Western Blot (Ma et al., 2024). Bei Pankreaskarzinom-Zellen konnte durch einen PLAC8-Knockdown mithilfe von siRNAs ebenfalls eine stärkere Expression des Proteins p21 im Western Blot bei S2-007-Zellen festgestellt werden (Kaistha et al., 2016). Derartige Beobachtungen konnten außerdem bereits für mit siRNAs gegen PLAC8 behandelte BON1-Zellen gemacht werden (Tatura et al., 2020). Diese Hochregulation von p21 geht mit einer verstärkten Inhibierung der CDKs und letztlich mit einem verringerten Übergang der Zellen von der G₁- in die S-Phase einher, was eine unkontrollierte Zellteilung verhindert (Abbas & Dutta, 2009).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Expression des Zellzyklusinhibitors p21 zeigte die Positivkontrolle mit siRNA entgegen den Erwartungen keine signifikante Hochregulation, jedoch eine signifikante Herunterregulation des Proteins. Nach Transfektion mit GapmeR 2 oder 5 konnte keine statistisch signifikante Veränderung der p21-Proteinexpression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit GapmeR 3 zu einer signifikanten Hochregulation von p21.

Das phosphorylierte ribosomale Protein S6, kurz pRPS6, wurde ebenfalls zur Analyse zellulärer Wachstums- und Proliferationsprozesse verwendet. Dieses kann als Marker für die Translation betrachtet werden, da die Phosphorylierung des Proteins RPS6 mit einem Anstieg der Translation von mRNA korreliert (Bohlen et al., 2021). Die dazu durchgeführten Versuche konnten jedoch nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da die verwendeten Antikörper dazu neigten, zu verschmieren und unspezifische Signale zu erzeugen. Dadurch konnte keine verlässliche Quantifizierung der Proteinbanden erreicht werden. Tatura et al. berichten jedoch von einer Herunterregulation des Proteins in Western Blots bei BON1-Zellen, die einer Transfektion mit siRNAs gegen PLAC8 unterzogen worden waren (Tatura et al., 2020).

Diskussion

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung und der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Proliferationsminderung (s. Abbildung 12) wäre auch hier eine reduzierte Phosphorylierung von RPS6 zu erwarten. Mögliche Ursachen für die unzureichende Qualität der pRPS6-Western-Blots könnten in einer zu großen Probenmenge im Gel, falschen Laufbedingungen oder falschen Antikörperkonzentrationen gesehen werden.

In einer Studie von Mao et al. zum Mammakarzinom, in der die Effekte eines siRNA-vermittelten PLAC8-Knockdowns untersucht wurden, zeigte der Western Blot eine erhöhte Expression der aktivierten (cleaved) Caspase 3, was auf eine Induktion der Apoptose hinweist (Mao et al., 2019). Auch in Untersuchungen zum nasopharyngealen Karzinom konnte eine gesteigerte Apoptose durch einen PLAC8-Knockout nachgewiesen werden (Huang et al., 2020). Demgegenüber wurde in der Literatur zu Pankreaskarzinomen bereits gezeigt, dass ein PLAC8-Knockdown bei S2-007-Zellen sowie PaTu8988T-Zellen mithilfe spezifischer siRNAs gegen PLAC8 keine Hinweise auf erhöhte Apoptoseraten ergab, was anhand der Spaltung von PARP und Caspase im Western Blot analysiert wurde (Kaistha et al., 2016). Auch Versuche mit BON1-Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen PLAC8 transfiziert worden waren, zeigten keine Spaltung von PARP oder Caspase (Tatura et al., 2020).

Im Zuge der Apoptose aktivieren Initiator-Caspasen Ausführungscaspasen, zu denen auch die Caspase 3 gehört, die anschließend wichtige Strukturproteine zerstören, was letztlich zur Fragmentierung der DNA und zur Membranblasenbildung führt (McIlwain et al., 2013). Das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, kurz PARP, wird im Verlauf der Apoptose durch Caspasen gespalten und ist somit ein wichtiger Marker dieses Prozesses (Germain et al., 1999). Ebendiese Proteine wurden auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit als Marker für die Apoptose eingesetzt. Wie Abbildung 8 zeigt, konnte keine Veränderung im Western Blot dargestellt werden, die ein verstärktes Zugrundegehen der Zellen durch Apoptose annehmen ließe. Dies legt nahe, dass die beobachteten Effekte auf die Zellviabilität in erster Linie auf eine reduzierte Proliferation und nicht auf apoptotische Prozesse zurückzuführen sind.

Ein weiterer Aspekt, der im Rahmen der Arbeit vor allem aufgrund des fehlenden Nachweises von Apoptose berücksichtigt werden kann, ist die Frage, ob es sich bei den Auswirkungen des PLAC8-Knockdowns eher um eine Verlangsamung zellulärer Prozesse als um einen direkten Zelltod handelt. Hierfür könnte eine mögliche Erklärung

die Einleitung einer Art Seneszenz sein. Dies ist ein zellulärer Zustand, der als Antwort auf Stress entstehen kann. Dabei kommt es typischerweise zu einem Arrest im Zellzyklus begleitet von der Hochregulation von Zellzyklusinhibitoren wie p21 oder p16 sowie der Expression von Seneszenzmarkern wie SA- β -gal (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Ein derart typischer Marker wurde zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, allerdings könnten die Beobachtungen wie die Proliferationsminderung im BrdU-Assay, der angedeutete S-Phasen-Arrest in der Durchflusszytometrie sowie die erhöhte p21-Expression auf einen seneszenzähnlichen Zustand hinweisen.

Neben einer reinen Zellzyklusverlangsamung, wie durch die veränderte Expression von Cyclin D1 und p21 nahegelegt, könnten auch alternative Formen des Zelltods wie die Nekrose eine Rolle spielen. Da Nekrose meist mit einer frühen Membranschädigung und dem Austritt zytoplasmatischer Bestandteile einhergeht, wären begleitende Untersuchungen zur Beurteilung notwendig. Zum Nachweis nekrotischer Veränderungen eignen sich beispielsweise eine Durchflusszytometrie unter Verwendung von Propidiumiodid und Annexin V, der Nachweis einer Freisetzung des Proteins HMGB1 oder die Identifikation nekrosetypischer morphologischer Merkmale wie Membranrupturen mittels Elektronenmikroskopie (Krysko et al., 2008).

4.5 DNA-Damage als Folge eines PLAC8-Knockdowns

Aufgrund der in der Durchflusszytometrie des Zellzyklus angedeuteten Akkumulation der Zellen in der S-Phase wurden BrdU-Assays zur Untersuchung der Zellproliferation durchgeführt.

Die beobachtete verminderte Proliferationsrate der BON1-Zellen nach der Transfektion mit GapmeRs, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, steht in Übereinstimmung mit früheren Publikationen. Dort wurde eine Abnahme der Zellproliferation nach siRNA-vermitteltem Knockdown von PLAC8 für S2-007-Zellen sowie PaTu8988T-Zellen gezeigt (Kaistha et al., 2016). Auch bei schon früher durchgeführten Experimenten zur Proliferation von mit siRNAs gegen PLAC8 transfizierten BON1-Zellen konnte eine Reduktion der proliferativen Aktivität nachgewiesen werden (Tatura et al., 2020). In menschlichen embryonalen Nierenzellen führte der Knockout von PLAC8 ebenfalls zu einer verringerten Proliferationsfähigkeit (Qin et al., 2020). Huang et al. fanden in einer Studie zu nasopharyngealen Karzinomen heraus, dass die verminderte Proliferation nach einem PLAC8-Knockout durch eine Hemmung der Autophagie mittels 3-Methyladenin oder

durch den Knockdown von Beclin-1 teilweise rückgängig gemacht werden kann. Somit wurde gefolgert, dass die Zellproliferation durch eine Induktion der Autophagie infolge des PLAC8-Knockouts und einer damit einhergehenden Inaktivierung des AKT/mTOR-Signalwegs gehemmt wurde (Huang et al., 2020).

Zur Untersuchung des Ursprungs der Proliferationshemmung in BON1-Zellen wurde mittels eines γ -H2AX-Foci-Stainings das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen analysiert. Die höchste Foci-Anzahl zeigte sich 24 Stunden nach der Transfektion. Allerdings lösten sich während dieses Prozesses zahlreiche Zellen vom Boden der Wells ab, was unter einem Lichtmikroskop zu erkennen war. Bei den anderen Versuchen stellte dies kein Problem dar, da immer sowohl die Zellen auf dem Boden der Wells als auch die Zellen, die sich im Medium schwimmend befanden, untersucht werden konnten. Der Methodik des γ -H2AX-Foci-Stainings zu verschulden ist jedoch, dass diese nicht mehr anhaftenden Zellen automatisch von der Untersuchung ausgeschlossen waren. Es war nicht möglich, Zellen auf dem Deckglas zu fixieren, die nicht dort angewachsen waren. Dieser Sachverhalt lässt Interpretationsspielraum für die Ergebnisse des Stainings. So wäre es denkbar, dass sich bevorzugt Zellen mit übermäßigem DNA-Schaden vom Boden des Wells gelöst haben und somit Zellen mit starkem DNA-Schaden unterrepräsentiert sind. Diese Überlegung ist allerdings als Spekulation zu werten.

In einer Studie von Yang et al. zum nasopharyngealen Karzinom wurde die Expression des Proteins γ -H2AX mittels Western Blot bei unterschiedlich behandelten Zellgruppen untersucht. Sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Zellen führte ein PLAC8-Knockdown zu einer erhöhten γ -H2AX-Expression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen ohne Knockdown (Yang et al., 2018). Eine weitere Publikation zur gleichen Tumorentität bestätigt diese Ergebnisse (Shen et al., 2021). Diese Studien unterstützen somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich vermehrt auftretender γ -H2AX-Foci nach erfolgtem PLAC8-Knockdown.

In der Literatur finden sich bislang keine Daten zu γ -H2AX-Foci-Stainings in Zellen, die mit GapmeRs behandelt wurden. Es existieren jedoch Studien, die eine erhöhte Anzahl an γ -H2AX-Foci pro Zellkern in RNase-H-defizienten Zellen beschreiben (Hiller et al., 2012). Die Endonuklease RNase H ist essenziell für den Abbau der RNA-Komponente in RNA/DNA-Hybriden (Migawa et al., 2019). Bei einem Funktionsverlust dieser Ribonuklease kommt es zur Akkumulation solcher Hybride, was zu Replikationsstress und DNA-Doppelstrangbrüchen führen kann. Zwar könnten GapmeRs theoretisch durch die gezielte Bildung solcher Hybride ähnliche zelluläre Stressreaktionen hervorrufen,

Diskussion

doch erscheint dies angesichts der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als weniger wahrscheinlich. Naheliegender ist, dass die beobachtete Zunahme an γ -H2AX-Foci auf den Verlust von PLAC8 zurückzuführen ist, was auch im Einklang mit den Studien von Yang et al. und Shen et al. steht. Die erhöhte H2AX-Phosphorylierung nach PLAC8-Knockdown könnte demnach auf eine durch den Funktionsverlust ausgelöste DNA-Schadensantwort hinweisen.

Außerdem wurde eine erhöhte Anzahl an γ -H2AX-Foci auch nach Behandlung mit Gemcitabin, einem Standardchemotherapeutikum beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas, beschrieben. Dies wird als Hinweis auf durch die Therapie induzierte DNA-Doppelstrangbrüche gewertet (Ewald et al., 2007). Vor diesem Hintergrund könnten GapmeRs gegen PLAC8, insbesondere wenn sie in pankreatischen Tumorzellen DNA-Schäden auslösen oder deren Reparaturmechanismen beeinflussen, ein zusätzliches therapeutisches Potenzial entfalten oder zur Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen wie Gemcitabin beitragen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist zu berücksichtigen, dass GapmeRs auch Off-Target-Effekte hervorrufen können. Dies wird beispielsweise in einer Studie von Yoshida et al. deutlich, in der Off-Target-Effekte in Abhängigkeit von der Komplementarität des GapmeRs zu anderen Genen beobachtet wurden, die eine Sequenzähnlichkeit zur Ziel-mRNA aufweisen (Yoshida et al., 2019). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass diese unspezifischen Effekte mit zunehmender Länge des Oligonukleotids tendenziell abnehmen, was die Bedeutung eines sorgfältigen Designs der GapmeRs hervorhebt (Yasuhara et al., 2022). Insbesondere vor dem Hintergrund eines potenziellen therapeutischen Einsatzes von GapmeRs sollte dieser Aspekt nicht vernachlässigt werden. In einer Studie von Smith et al. wurden GapmeRs gegen die Gastrin-mRNA in pankreatischen Tumoren untersucht und ein verringertes Tumorstadium beobachtet. Zudem konnte eine Verbesserung der Tumormikroumgebung, unter anderem durch eine Abnahme von Fibrose, beobachtet werden. Der verwendete GapmeR wurde dabei so modifiziert, dass er gezielt an den Cholezystokinin-B-Rezeptor gekoppelt war, was zu einer selektiven Aufnahme des GapmeRs mit Reduktion von Off-Target-Effekten führte (Smith et al., 2025). Insgesamt wird somit deutlich, dass GapmeRs zwar potenziell Off-Target-Effekte aufweisen, diese jedoch durch gezieltes Design und spezifische Modifikationen reduziert werden können. Damit wird die vielversprechende therapeutische Option dieser Oligonukleotide bei Pankreastumoren herausgestellt.

Weiterhin wurde versucht, den DNA-Schaden auf Proteinebene mithilfe von Western Blots darzustellen. Hierfür wurden Proteine untersucht, die im Rahmen von DNA-Damage und bei der Reparatur von Strangbrüchen eine veränderte Expression aufweisen. Dabei wurde unter anderem die ATPase RAD51 untersucht, die eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen spielt, indem das Protein nach homologen DNA-Sequenzen sucht und die Anlagerung der DNA ermöglicht (Bonilla et al., 2020). Das Enzym ATR ist im Rahmen von Schädigungen wie Blockierungen von Replikationsgabeln oder Einzelstrangbrüchen aktiv, wobei die Aktivierung vermutlich durch die Verlängerung von ssDNA-Überhängen verstärkt wird (Flynn & Zou, 2011). Demgegenüber steht die Serin-Proteinkinase ATM, die insbesondere zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen notwendig ist (Maréchal & Zou, 2013).

Darüber hinaus wurden die Proteine CHK1 und pCHK1 im Western Blot genauer betrachtet. Die Serin/Threonin-Kinase CHK1 wird im Falle von DNA-Schäden durch eine Phosphorylierung zu phospho-CHK1 durch ATR an den Serinen 317 und 345 aktiviert (Zhao & Piwnicka-Worms, 2001). Dabei findet eine Konformationsänderung statt, nach der das aktive Zentrum der Proteinkinase frei zugänglich ist. CHK1 kann in der S-Phase durch Phosphorylierung von cdc25A die Aktivität der CDK2 verringern, was einen Abbruch der DNA-Replikation herbeiführt (Zhang & Hunter, 2014).

Für die Proteine RAD51, CHK1 und pCHK1 konnten keine wesentlichen Veränderungen der Expression im Western Blot gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression von RAD51 gegenüber den Kontrollen, wie in Abbildung 15 dargestellt, liefert eine Studie von Ahlskog et al. Hier wurde gezeigt, dass die Funktion von RAD51 von der Phosphorylierung des Proteins PALB2 durch die Kinasen ATM und ATR abhängig ist (Ahlskog et al., 2016). Dementsprechend könnte eine Abnahme der Expression von RAD51 darauf hinweisen, dass vorausgehende Mechanismen wie die Aktivierung von ATM oder ATR nicht ausreichend ausgelöst wurden. In einer Publikation von Li et al. konnte in Osteosarkom-Zellen durch eine pharmakologische Hemmung von ATR durch Berzosertib eine verminderte CHK1-Phosphorylierung bei gleichzeitig erhöhter γ -H2AX-Expression festgestellt werden (Li et al., 2020). Übertragen auf die Versuche der vorliegenden Arbeit könnten die nur geringen bzw. ausbleibenden Veränderungen der Expression der Proteine somit auf eine, wie anhand der Literatur beschrieben, biologische Ursache oder aber auf methodische Fehler zurückzuführen sein. So könnte beispielsweise die DNA-Schadensantwort mit dem gewählten Zeitpunkt der Proteinextraktion nicht optimal erfasst worden sein.

Diskussion

In einer Studie von Vandamme et al. zur Charakterisierung der Zelllinie BON1 konnte eine homozygote Mutation im TP53-Gen festgestellt werden, die vermutlich zu einem Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 führt (Vandamme et al., 2015). Dadurch wäre es möglich, dass wesentliche Kontrollmechanismen der DNA-Schadensantwort in BON1-Zellen von vornherein beeinträchtigt sind, was die Dynamik verschiedener Reparaturmechanismen und die vorliegenden Ergebnisse beeinflussen könnte. Dies könnte beispielsweise auch erklären, weshalb trotz nachweisbaren DNA-Schadens kein Hinweis auf eine Apoptose beobachtet werden konnte.

Bei den über 300 kDa großen Proteinen ATR und p-ATM gelang es nicht, sie auf der Membran darzustellen. Mögliche Ursachen sind eine zu kurze Laufzeit der SDS-Gelelektrophorese oder eine unzureichende Blotting-Zeit. Dagegen spricht jedoch, dass der Proteinstandard Spectra Multicolor High Range korrekt aufgetrennt und vollständig übertragen wurde, einschließlich der 300 kDa-Banden. Auch die Ponceau-S-Färbung im Anschluss an das Blotten zeigte eine vollständige Proteinübertragung. Alternativ könnte die Ursache in einer fehlerhaften Verwendung der Antikörper liegen, etwa durch eine zu starke Verdünnung, falsche Lagerung oder eine fehlende Spezifität des Sekundärantikörpers. Insgesamt lässt sich das Fehlschlagen der Darstellung der großen Proteine ATR und p-ATM vermutlich auf ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren zurückführen. Deshalb könnte eine Wiederholung entsprechender Western Blots unter Beachtung der genannten möglichen Fehlerquellen sinnvoll sein.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Knockdown von PLAC8 in BON1-Zellen DNA-Schäden auslöst. Dies weist auf die zentrale Rolle von PLAC8 in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität hin und unterstreicht dessen potenzielle Relevanz als therapeutisches Ziel.

4.6 Fazit

Im Hinblick auf die eingangs formulierten Forschungsfragen konnte kein funktioneller Zusammenhang zwischen PLAC8 und LIN54 festgestellt werden. Allerdings wird im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Ansatz zum effizienten Erreichen eines Knockdowns der PLAC8-RNA sowie des Proteins durch GapmeRs ersichtlich.

Aufgrund der signifikanten Effekte der Transfektion mit GapmeRs auf das Überleben der Zellen sowie den bereits erfolgreichen Einsatz dieser Antisense-Oligonukleotide z.B. in der Neurologie ist denkbar, dass man diese auch in der Therapie der pNETs einsetzen

Diskussion

könnte. Dabei könnte der gezielte Einsatz von GapmeRs gegen PLAC8 zum Wachstumsstopp des Tumors und somit zur Etablierung einer weiteren medikamentösen Therapiesäule beitragen. Im Rahmen dessen sollte die Bedeutung eines sorgfältigen GapmeR-Designs berücksichtigt werden. Zudem wäre es notwendig, an die bisher erfolgten Versuche weitere Experimente *in vitro* anzuschließen, sowie längerfristig die Untersuchungen *in vivo*, zunächst auf ein Tiermodell und zuletzt auf den Menschen, auszuweiten.

5 Zusammenfassung

Neuroendokrine Tumoren (NETs) sind seltene Neoplasien, die häufig im gastroenteropankreatischen System auftreten. Pankreatische NETs (pNETs) sind nach duktalem Adenokarzinom die zweithäufigste Tumorentität des Pankreas. Die chirurgische Resektion gilt derzeit als einzige potenziell kurative Therapieoption, weshalb die pNETs ein wichtiges Forschungsfeld repräsentieren.

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Proteinen PLAC8 und LIN54 sowie des Einflusses einer Transfektion mit GapmeRs gegen PLAC8 auf BON1-Zellen.

Ein gezielter Knockdown von PLAC8 führte in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten zu einer signifikant verminderten Zellviabilität bei BON1-Zellen, was die zentrale Rolle dieses Proteins für das Zellüberleben und Proliferation stützt. Die Effekte waren sowohl mit siRNAs als auch mit GapmeRs reproduzierbar, wobei letztere aufgrund ihrer höheren Spezifität tendenziell effektiver wirkten. Auch auf RNA-Ebene konnte ein Knockdown erzielt werden. Im Gegensatz dazu zeigte ein Knockdown von LIN54 keinen Einfluss auf die Zellviabilität, was gegen einen funktionellen Zusammenhang zwischen PLAC8 und LIN54 spricht.

Bezüglich der Wirkung auf Zellzyklusproteine ließ sich nach PLAC8-Knockdown mit GapmeRs in Abhängigkeit vom verwendeten Oligonukleotid eine signifikante Herunterregulation von Cyclin D1 und eine Hochregulation von p21 feststellen. Eine Beteiligung apoptotischer Prozesse konnte über die Marker PARP und Caspase jedoch ausgeschlossen werden. Aufgrund eines in der Durchflusszytometrie angedeuteten S-Phase-Arrests erfolgte die weitere Untersuchung der S-Phase durch ein BrdU-Assay, das eine verminderte Proliferationsrate zeigte. Mittels eines γ -H2AX-Foci-Stainings konnten DNA-Doppelstrangbrüche in transfizierten Zellen sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse mit einem Maximum an DNA-Schäden zwischen 24 und 48 Stunden nach der Transfektion deuten auf einen zeitlich verzögerten, durch GapmeRs induzierten Effekt hin.

Insgesamt stützen die Ergebnisse die Hypothese, dass PLAC8 essenziell für das Überleben und die Proliferation pankreatischer neuroendokriner Tumorzellen ist und somit als Angriffspunkt für Therapien bei pNETs genutzt werden könnte. Dabei scheinen GapmeRs gegen PLAC8 vor allem über Mechanismen der Zellzyklusregulation und die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu wirken.

6 Summary

Neuroendocrine tumors (NETs) are rare neoplasms that frequently occur in the gastroenteropancreatic system. Pancreatic NETs (pNETs) are the second most common tumor entity of the pancreas after ductal adenocarcinomas. Surgical resection is currently considered the only potentially curative option, which makes pNETs an important field of research.

The aim of this study is to investigate a possible relationship between the proteins PLAC8 and LIN54, as well as the effects of transfection with GapmeRs targeting PLAC8 on BON1 cells.

A targeted knockdown of PLAC8 led, consistent with previous studies, to a significant reduction in cell viability in BON1 cells, supporting the central role of this protein in cell survival and proliferation. The effects were reproducible using both siRNAs and GapmeRs, with the latter tending to be more effective due to their higher specificity. Knockdown was also achieved at the RNA level. In contrast, knockdown of LIN54 had no effect on cell viability, arguing against a functional connection between PLAC8 and LIN54.

Regarding the impact on cell cycle proteins, PLAC8 knockdown using GapmeRs resulted - depending on the GapmeR used - in a significant downregulation of Cyclin D1 and an upregulation of p21. Involvement of apoptosis could be excluded based on markers such as PARP and Caspase. Due to indications of an S-phase arrest observed in flow cytometry, further investigation of the S-phase was carried out using a BrdU assay, which showed a reduced proliferation rate. DNA double-strand breaks in transfected cells were visualized by γ -H2AX foci staining. The results, showing maximal DNA damage between 24 and 48 hours post-transfection, suggest a temporally delayed, GapmeR-induced DNA damage.

Overall, the results support the assumption that PLAC8 is essential for the survival and proliferation of pancreatic neuroendocrine tumor cells and could therefore serve as a therapeutic target for pNETs. GapmeRs against PLAC8 appear to exert their effects primarily through mechanisms involving cell cycle regulation and the induction of DNA double-strand breaks.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), S. 400-414. DOI: 10.1038/nrc2657.
- Abewe, H., Savitha, D., Mukim, A., & Beliakova-Bethell, N. (2020). Use of GapmeRs for gene expression knockdowns in human primary resting CD4+ T cells. *Journal of immunological methods*, 476, S. 1-13. DOI: 10.1016/j.jim.2019.112674.
- Ahlskog, J. K., Larsen, B. D., Achanta, K., & Sørensen, C. S. (2016). ATM/ATR-mediated phosphorylation of PALB2 promotes RAD51 function. *EMBO reports*, 17(5), S. 671-681. DOI: 10.15252/embr.201541455.
- Amodio, N., Stamato, M. A., Juli, G., Morelli, E., Fulciniti, M., Manzoni, M., Taiana, E., Agnelli, L., Gallo Cantafio, M. E., Romeo, E., Raimondi, L., Caracciolo, D., Zuccalà, V., Rossi, M., Neri, A., Munshi, N. C., Tagliaferri, P., Tassone, P. (2018). Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia*, 32(9), S. 1948-1957. DOI: 10.1038/s41375-018-0067-3.
- Bohlen, J., Roiuk, M., & Teleman, A. (2021). Phosphorylation of ribosomal protein S6 differentially affects mRNA translation based on ORF length. *Nucleic acids research*, 49(22), S. 13062-13074. DOI: 10.1093/nar/gkab1157.
- Boichuk, S., Parry, J. A., Makielski, K. R., Litovchick, L., Baron, J. L., Zewe, J. P., Wozniak, A., Mehalek, K. R., Korzeniewski, N., Seneviratne, D. S., Schoffski, P., Debiec-Rychter, M., DeCaprio, J. A., Duensing, A. (2013). The DREAM Complex Mediates GIST Cell Quiescence and Is a Novel Therapeutic Target to Enhance Imatinib-Induced Apoptosis. *Cancer research*, 73(16), S. 5120-5129. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0579.
- Bonilla, B., Hengel, S., Grundy, M., & Bernstein, K. (2020). RAD51 Gene Family Structure and Function. *Annual review of genetics*, 54(1), S. 25-46. DOI: 10.1146/annurev-genet-021920-092410.
- Bridges, M. C., Daulagala, A., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, 220(2), S. 1-17. DOI: 10.1083/jcb.202009045.
- Buchholz, M., Braun, M., Heidenblut, A., Kestler, H., Klöppel, G., Schmiegel, W., Hahn, S. A., Lüttges, J., Gress, T. (2005). Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene*, 24(44), S. 6626-6636. DOI: 10.1038/sj.onc.1208804.
- Burbano, L. E., Li, M., Jancovski, N., Jafar-Nejad, P., Richards, K., Sedo, A., Soriano, A., Rollo, B., Jia, L., Gazina, E. V., Piltz, S., Adikusuma, F., Thomas, P. Q., Kopsidas, H., Rigo, F., Reid, C. A., Maljevic, S., Petrou, S. (2022). Antisense oligonucleotide therapy for KCNT1 encephalopathy. *JCI insight*, 7(23), S. 1-19. DOI: 10.1172/jci.insight.146090.

- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), S. 729-740. DOI: 10.1038/nrm2233.
- Chen, L., Niu, W., Zhu, D., Shao, W., & Qian, Y. (2022). Long noncoding RNA HOXD-AS1 promotes the progression of pancreatic cancer through miR-664b-3p/PLAC8 axis. *Pathology-Research and Practice*, 232, S. 1-12. DOI: 10.1016/j.prp.2022.153836.
- Chen, W., Wu, J., Wang, W., Yu, L., & Xu, X. (2022). PLAC8 Overexpression Promotes Lung Cancer Cell Growth via Wnt/ β -Catenin Signaling. *Journal of immunology research*, 2022, S. 1-11. DOI: doi.org/10.1155/2022/8854196.
- Chen, Y., Jia, Y., Mao, M., Gu, Y., Xu, C., Yang, J., Hu, W., Shen, J., Hu, D., Chen, C., Li, Z., Chen, L., Ruan, J., Shen, P., Zhou, J., Wie, Q., Wang, L. (2021). PLAC8 promotes adriamycin resistance via blocking autophagy in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(14), S. 6948-6962. DOI: 10.1111/jcmm.16706.
- Cives, M., & Strosberg, J. R. (2017). Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *The American Cancer Society's Oncology in Practice: Clinical Management*, 68(6), S. 471-487. DOI: 10.3322/caac.21493.
- Clift, A. K., Kidd, M., Bodei, L., Toumpanakis, C., Baum, R. P., Oberg, K., Modlin, I. M., Frilling, A. (2020). Neuroendocrine neoplasms of the small bowel and pancreas. *Neuroendocrinology*, 110(6), S. 444-476. DOI: 10.1159/000503721.
- Crooke, S. T., Baker, B. F., Crooke, R. M., & Liang, X.-h. (2021). Antisense technology: an overview and prospectus. *Nature reviews Drug discovery*, 20(6), S. 427-453. DOI: 10.1038/s41573-021-00162-z.
- Deguelte, S., de Mestier, L., Hentic, O., Cros, J., Lebtahi, R., Hammel, P., & Kianmanesh, R. (2018). Sporadic pancreatic neuroendocrine tumor: Surgery of the primary tumor. *Journal of visceral surgery*, 155(6), S. 483-492. DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2018.08.010.
- Ewald, B., Sampath, D., & Plunkett, W. (2007). H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. *Molecular cancer therapeutics*, 6(4), S. 1239-1248. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0633.
- Ferrari, M., Sun, T., & Shen, H. (2012). Nanovector Delivery of siRNA for Cancer Therapy. *Cancer gene therapy*, 19(6), S. 367-373. DOI: 10.1038/cgt.2012.22.
- Flynn, R. L., & Zou, L. (2011). ATR: a Master Conductor of Cellular Responses to DNA Replication Stress. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(3), S. 133-140. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.09.005.
- Friedrich, M., & Aigner, A. (2022). Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs*, 36(5), S. 549-571. DOI: 10.1007/s40259-022-00549-3.

Literaturverzeichnis

- Galaviz-Hernandez, C., Stagg, C., de Ridder, G., Tanaka, T. S., Ko, M. S., Schlessinger, D., & Nagaraja, R. (2003). Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene*, *309*(2), S. 81-89. DOI: 10.1016/S0378-1119(03)00508-0.
- Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G., & Poirier, G. (1999). Cleavage of Automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase during Apoptosis: evidence for involvement of caspase-7. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(40), S. 28379-28384. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28379.
- Gil, N., & Ulitsky, I. (2020). Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics*, *21*(2), S. 102-117. DOI:10.1038/s41576-019-0184-5.
- Glazier, D. A., Liao, J., Roberts, B. L., Li, X., Yang, K., Stevens, C. M., & Tang, W. (2020). Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry*, *31*(5), S. 1213-1233. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00060.
- Grimm, D. (2011). The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression. *Silence*, *2*(1), S. 1-6. DOI: 10.1186/1758-907X-2-8.
- Grozinsky-Glasberg, S., Shimon, I., & Rubinfeld, H. (2012). The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, *96*(3), S. 173-187. DOI: 10.1159/000338793.
- Hagedorn, P. H., Persson, R., Funder, E. D., Albæk, N., Diemer, S. L., Hansen, D. J., Møller, M. R., Papargyri, N., Christiansen, H., Hansen, B. R., Hansen, H. F., Jensen, M. A., Koch, T. (2018). Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discovery Today*, *23*(1), S. 101-114. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.09.018.
- Halfdanarson, T. R., Rabe, K. G., Rubin, J., & Petersen, G. M. (2008). Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Annals of oncology*, *19*(10), S. 1727-1733. DOI: 10.1093/annonc/mdn351.
- Hill, J. S., McPhee, J. T., McDade, T. P., Zhou, Z., Sullivan, M. E., Whalen, G. F., & Tseng, J. F. (2009). Pancreatic neuroendocrine tumors: the impact of surgical resection on survival. *Cancer*, *115*(4), S. 741-751. DOI: 10.1002/cncr.24065.
- Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R., & Roers, A. (2012). Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(8), S. 1419-1426. DOI: 10.1084/jem.20120876.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X.-J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), S. 1-25. DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x.

Literaturverzeichnis

- Huang, M.-L., Qi, C.-L., Sheng, J.-F., Kong, Y.-G., Zou, Y., Yang, R., Jiang, Y., Sheng, J.-F., Kong, Y.-G., Tao, Z.-Z., Chen, S.-M. (2020). Plac8-mediated autophagy regulates nasopharyngeal carcinoma cell function via AKT/mTOR pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(14), S. 7778-7788. DOI: 10.1111/jcmm.15409.
- Hung, C.-S., Wang, Y.-C., Guo, J.-W., Yang, R.-N., Lee, C.-L., Shen, M.-H., Huang, C.-C., Huang, C.-J., Yang, J.-Y., Liu, C.-Y. (2020). Expression pattern of placenta specific 8 and keratin 20 in different types of gastrointestinal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 21(2), S. 659-666. DOI: 10.3892/mmr.2019.10871.
- Hwang, Y.-J., & Kim, M. (2025). Emerging Role of the DREAM Complex in Cancer and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), S. 1-20. DOI: 10.3390/ijms26010322.
- Ivashkevich, A. N., Martin, O. A., Smith, A. J., Redon, C. E., Bonner, W. M., Martin, R. F., & Lobachevsky, P. N. (2011). γ H2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis. *National Institutes of Health*, 711(1-2), S. 1-24. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.015.
- Kaistha, B. P., Lorenz, H., Schmidt, H., Sipos, B., Pawlak, M., Gierke, B., Kreider, R., Lankat-Buttgereit, B., Sauer, M., Fiedler, L., Krattenmacher, A., Geisel, B., Kraus, J. M., Frese, K. K., Kelkenberg, S., Giese, N. A., Kestler, H. A., Gress, T. M., Buchholz, M. (2016). PLAC8 Localizes to the Inner Plasma Membrane of Pancreatic Cancer Cells and Regulates Cell Growth and Disease Progression through Critical Cell- Cycle Regulatory Pathways. *Cancer research*, 76(1), S. 96-107. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0216.
- Khvorova, A., & Watts, J. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.*, 35(3), S. 238-248. DOI: 10.1038/nbt.3765.
- Kim, D. H., & Rossi, J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), S. 173-184. DOI: 10.1038/nrg2006.
- Kolluru, V., Pal, D., John, A. S., Ankem, M. K., Freedman, J. H., & Damodaran, C. (2017). Induction of Plac8 promotes pro-survival function of autophagy in Cadmium-Induced Prostate Carcinogenesis. *Cancer letters*, 408, S. 121-129. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.08.023.
- Krysko, D., Vanden Berghe, T., Parthoens, E., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Methods for Distinguishing Apoptotic from Necrotic Cells and Measuring Their Clearance. *Methods in enzymology*, 442, S. 307-341. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01416-X.
- Lennox, K., & Behlke, M. (2016). Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 44(2), S. 863-877. DOI: 10.1093/nar/gkv1206.

- Li, X., Dean, D. C., Cote, G. M., Zou, L., Hornicek, F. J., Yu, S., & Duan, Z. (2020). Inhibition of ATR-Chk1 signaling blocks DNA double-strand-break repair and induces cytoplasmic vacuolization in metastatic osteosarcoma. *Therapeutic advances in medical oncology*, *12*, S. 1-16. DOI: 10.1177/1758835920956900.
- Ma, J., Zhou, M., Xu, X., Gao, X., Wang, H., Shen, J., & Xue, L. (2024). Candidate oncogene placenta specific 8 affects cell growth and cell migration in non-small cell lung cancers. *Biocell*, *48*(2), S. 239-252. DOI: 10.32604/biocell.2023.045076.
- Maharjan, C. K., Ear, P. H., Tran, C. G., Howe, J. R., Chandrasekharan, C., & Quelle, D. E. (2021). Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Cancers*, *13*(20), S. 1-51. DOI: 10.3390/cancers13205117.
- Mao, M., Chen, Y., Jia, Y., Yang, J., Wei, Q., Li, Z., Chen, L., Chen, C., Wang, L. (2019). PLCA8 suppresses breast cancer apoptosis by activating the PI3k/AKT/NF-κB pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, *23*(10), S. 6930-6941. DOI: 10.1111/jcmm.14578.
- Mao, M., Cheng, Y., Yang, J., Chen, Y., Xu, L., Zhang, X., Li, Z., Chen, C., Ju, S., Zhou, J., Wang, L. (2021). Multifaced roles of PLAC8 in cancer. *Biomarker Research*, *9*(1), S. 1-10. DOI: 10.1186/s40364-021-00329-1.
- Mao, M., Hu, D., Yang, J., Chen, Y., Zhang, X., Shen, J., Teng, R., Zhou, J., Wang, L. (2021). Regulation of tamoxifen sensitivity by the PLAC8/MAPK pathway axis is antagonized by curcumin-induced protein stability change. *Journal of Molecular Medicine*, *99*(6), S. 845-858. DOI: 10.1007/s00109-021-02047-5.
- Maranon, D. G., & Wilusz, J. (2020). Mind the Gapmer: Implications of Co-transcriptional Cleavage by Antisense Oligonucleotides. *Molecular Cell*, *77*(5), S. 932-933. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.010.
- Marceau, A. H., Felthousen, J. G., Goetsch, P. D., Iness, A. N., Lee, H.-W., Tripathi, S. M., . . . Rubin, S. M. (2016). Structural basis for LIN54 recognition of CHR elements in cell cycle-regulated promoters. *Nature communications*, *7*(1), S. 1-11. DOI: 10.1038/ncomms12301.
- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9), S. 1-17. DOI: 10.1101/cshperspect.a012716.
- Matsuo, T., Kuramoto, H., Kumazaki, T., Mitsui, Y., & Takahashi, T. (2012). LIN54 harboring a mutation in CHC domain is localized to the cytoplasm and inhibits cell cycle progression. *Cell cycle*, *11*(17), S. 3227-3236. DOI: 10.4161/cc.21569.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), S. 1-30. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, *431*(7006), S. 343-349. DOI: 10.1038/nature02873.

- Migawa, M. T., Shen, W., Wan, W. B., Vasquez, G., Oestergaard, M. E., Low, A., De Hoyos, C. L., Gupta, R., Murray, S., Tanowitz, M., Bell, M., Nichols, J. G., Gaus, H., Liang, X.-h., Swayze, E. E., Crooke, S. T., Seth, P. (2019). Site-specific replacement of phosphorothioate with alkyl phosphonate linkages enhances the therapeutic profile of gapmer ASOs by modulating interactions with cellular proteins. *Nucleic acids research*, 47(11), S. 5465-5479. DOI: 10.1093/nar/gkz247.
- Monazzam, A., Li, S.-C., Wargelius, H.-L., Razmara, M., Bajic, D., Mi, J., Bergquist, J., Crona, J., Skogseid, B. (2020). Generation and characterization of CRISPR/Cas9-mediated MEN1 knockout BON1 cells: a human pancreatic neuroendocrine cell line. *Scientific Reports*, 10(1), S. 1-10. DOI: 10.1038/s41598-020-71516-7.
- Mpilla, G. B., Philip, P. A., El-Rayes, B., & Azmi, A. S. (2020). Pancreatic neuroendocrine tumors: Therapeutic challenges and research limitations. *World Journal of Gastroenterology*, 26(28), S. 4036-4054. DOI: 10.3748/wjg.v26.i28.4036.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2025). LIN54 lin-54 DREAM MuvB core complex component [Homo sapiens (human)] [Gene ID: 132660]. *NCBI Gene*. Online verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/132660>, letzter Zugriff: 15.10.2025.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2025). PLAC8 placenta associated 8 [Homo sapiens (human)] [Gene ID: 51316]. *NCBI Gene*. Online verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51316>, letzter Zugriff: 15.10.2025.
- Norton, J. A., Fraker, D. L., Alexander, H. R., Gibril, F., Liewehr, D. J., Venzon, D. J., & Jensen, R. T. (2006). Surgery Increases Survival in Patients With Gastrinoma. *Annals of surgery*, 244(3), S. 410-419. DOI: 10.1097/01.sla.0000234802.44320.a5.
- Ozpolat, B., Sood, A., & Lopez-Berestein, G. (2016). Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 66, S. 110-116. DOI: 10.1016/j.addr.2013.12.008.
- Pal, D., Suman, S., Kolluru, V., Sears, S., Das, T. P., Alatassi, H., Ankem, M. K., Freedman, J. H., Damodaran, C. (2017). Inhibition of autophagy prevents cadmium- induced prostate carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 117(1), S. 56-64. DOI: 10.1038/bjc.2017.143.
- Pendergraff, H. M., Krishnamurthy, P. M., Debacker, A. J., Moazami, M. P., Sharma, V. K., Niitsoo, L., Yu, Y., Tan, Y. N., Haitchi, H. M., Watts, J. K. (2017). Locked Nucleic Acid Gapmers and Conjugates Potently Silence ADAM33, an Asthma-Associated Metalloprotease with Nuclear-Localized mRNA. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 8, S. 158-168. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.06.012.
- Qie, S., & Diehl, J. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *Journal of molecular medicine*, 94(12), S. 1313-1326. DOI: 10.1007/s00109-016-1475-3.

Literaturverzeichnis

- Qin, X.-H., Wang, H.-X., Ma, L., Shen, J., Liu, Q.-H., & Xue, L. (2020). Knockout of the Placenta Specific 8 Gene Affects the Proliferation and Migration of Human Embryonic Kidney 293T Cell. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 78(1), S. 55-64. DOI: 10.1007/s12013-019-00893-2.
- Rinke, A., Wiedenmann, B., Auernhammer, C., Bartenstein, P., Bartsch, D. K., Begum, N., Faiss, S., Fottner, C., Gebauer, B., Goretzki, P., Lynen Jansen, P., Pöpperl, G., Scherübl, H., Weber, M. M., Gress, T. M., Pavel, M. (2018). S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 56(6), S. 583-681. DOI: 10.1055/a-0604-2924.
- Rogulski, K., Li, Y., Rothermund, K., Pu, L., Watkins, S., Yi, F., & Prochownik, E. V. (2005). Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt–Mdm2–p53 pathway. *Oncogene*, 24(51), S. 7524-7541. DOI: 10.1038/sj.onc.1208897.
- Salahshour, F., Taslimi, R., Moosavi, N.-S., Ayoobi Yazdi, N., & Esfandbod, M. (2021). Pancreatic Neuroendocrine Tumor presenting as a diffuse pancreatic enlargement, case report and review of literature. *Journal of Radiology Case Reports*, 15(1), S. 11-20. DOI: 10.3941/jrcr.v15i1.3822.
- Scherübl, H., Raue, F., & Frank-Raue, K. (2019). Neuroendokrine Tumoren: Klassifikation, Klinik und Bildgebung. *Der Radiologe*, 59(11), S. 952-960. DOI: 10.1007/s00117-019-0574-x.
- Schmit, F., Cremer, S., & Gaubatz, S. (2009). LIN54 is an essential core subunit of the DREAM / LINC complex that binds to the cdc2 promoter in a sequence-specific manner. *The FEBS journal*, 276(19), S. 5703-5716. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07261.x.
- Shen, L.-J., Qi, C.-L., Yang, R., Huang, M.-L., Zou, Y., Jiang, Y., Sheng, J.-F., Kong, Y.-G., Hua, Q.-Q., Chen, S.-M. (2021). PLAC8 gene knockout increases the radiosensitivity of xenograft tumors in nude mice with nasopharyngeal carcinoma by promoting apoptosis. *American Journal of Translational Research*, 13(6), S. 5985-6000. Online verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34306339/>, letzter Zugriff: 14.10.2025.
- Shi, L., Xiao, L., Heng, B., Mo, S., Chen, W., & Su, Z. (2017). Overexpression of placenta specific 8 is associated with malignant progression and poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology*, 49(7), S. 1165-1176. DOI: 10.1007/s11255-017-1578-y.
- Shin, M., Chan, I. L., Cao, Y., Gruntman, A. M., Lee, J., Sousa, J., Rodríguez, T. C., Echeverria, D., Devi, G., Debacker, A. J., Moazami, M. P., Krishnamurthy, P. M., Rembetsy-Brown, J. M., Kelly, K., Yukselen, O., Donnard, E., Parsons, T. J., Khvorova, A., Sontheimer, E. J., Maehr, R., Garber, M., Watts, J. (2022). Intratracheally administered LNA gapmer antisense oligonucleotides induce robust gene silencing in mouse lung fibroblasts. *Nucleic Acids Research*, 50(15), S. 8418-8430. DOI: 10.1093/nar/gkac630.

Literaturverzeichnis

- Smith, J. P., Shivapurkar, N., Chen, W., Chekuri, G., Dabney, A., Holmes, K., Cao, H., Kularatne, R. N., Stern, S. T. (2025). Target-Specific Locked Nucleic Acid Gapmer Decreases Growth and Metastases of Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 24(8), S. 1-12. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-24-1059.
- Stark, M. (2022). Molecular biological analysis of the role of placenta-specific 8 in the context of tumour progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*.
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L.-L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), S. 96-118. DOI: 10.1038/s41580-020-00315-9.
- Tatura, M., Schmidt, H., Haijaj, M., Stark, M., Rinke, A., Diels, R., Lawlor, R., Scarpa, A., Schrader, J., Hackert, T., Schimmack, S., Gress, T., Buchholz, M. (2020). Placenta-specific 8 is overexpressed and regulates cell proliferation in low-grade human pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 110(1-2), S. 23-34. DOI: 10.1159/000500541.
- Tseng, L.-M., Chen, J.-Y., Won, J. G.-S., Tseng, H.-S., Yang, A.-H., Wang, S.-E., & Lee, C.-H. (2007). The role of intra-arterial calcium stimulation test with hepatic venous sampling (IACS) in the management of occult insulinomas. *Annals of Surgical Oncology*, 14(7), S. 2121-2127. DOI: 10.1245/s10434-007-9398-4.
- Vandamme, T., Peeters, M., Dogan, F., Pauwels, P., Van Assche, E., Beyens, M., Mortier, G., Vandeweyer, G., de Herder, W., Van Camp, G., Hofland, L. J., Op de Beeck, K. (2015). Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *Journal of molecular endocrinology*, 54(2), S. 137-147. DOI: 10.1530/JME-14-0304.
- Verma, N. K., Fazil, M. H., Duggan, S. P., & Kelleher, D. (2020). Combination Therapy Using Inhalable GapmeR and Recombinant ACE2 for COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, S. 1-5. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00197.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*, 51(10), S. 2515-2520. Online verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2021931/>, letzter Zugriff: 14.10.2025.
- Wang, P., Zhou, Y., & Richards, A. M. (2021). Effective tools for RNA-derived therapeutics: siRNA interference or miRNA mimicry. *Theranostics*, 11(18), S. 8771-8796. DOI: 10.7150/thno.62642.
- Wegener, M., & Müller-McNicoll, M. (2018). Nuclear retention of mRNAs – quality control, gene regulation and human disease. *Seminars in cell & developmental biology*, 79, S. 131-142. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.11.001.

Literaturverzeichnis

- Wu, J., Wang, X., Shang, A., Vella, G., Sun, Z., Ji, P., Yang, D., Wan, A., Yao, Y., Li, D. (2020). PLAC8 inhibits oral squamous cell carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathways. *Oncology letters*, 20(5), S. 1-11. DOI: 10.3892/ol.2020.11989.
- Xia, P., Liu, P., Fu, Q., Liu, C., Luo, Q., Zhang, X., Cheng, L., Qin, T., Zhang, H. (2020). Long noncoding RNA EPIC1 interacts with YAP1 to regulate the cell cycle and promote the growth of pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 522(4), S. 978-985. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.11.167.
- Yang, R., Tao, Z.-Z., Huang, M.-L., Zheng, Y.-F., Dai, M.-Y., Zou, Y., & Chen, S.-M. (2018). Knockout of the placenta specific 8 gene radiosensitizes nasopharyngeal carcinoma cells by activating the PI3K/AKT/GSK3 β pathway. *American Journal of Translational Research*, 10(2), S. 455-464. Online verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29511439/>, letzter Zugriff: 14.10.2025.
- Yao, J. C., Zhang, J. X., Rashid, A., Yeung, S.-C. J., Szklaruk, J., Hess, K., Xie, K., Ellis, L., Abbruzzese, J.L., Ajani, J. A. (2007). Clinical and In vitro Studies of Imatinib in Advanced Carcinoid Tumors. *Clinical cancer research*, 13(1), S. 234-240. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1618.
- Yasuhara, H., Yoshida, T., Sasaki, K., Obika, S., & Inoue, T. (2022). Reduction of Off-Target Effects of Gapmer Antisense Oligonucleotides by Oligonucleotide Extension. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 26(1), S. 117-127. DOI: 10.1007/s40291-021-00573-z.
- Yoshida, T., Naito, Y., Yasuhara, H., Sasaki, K., Kawaji, H., Kawai, J., Naito, M., Okuda, H., Obika, S., Inoue, T. (2019). Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes to Cells*, 24(12), S. 827-835. DOI: 10.1111/gtc.12730.
- Zhang, Y., & Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International journal of cancer*, 134(5), S. 1013-1023. DOI: 10.1002/ijc.28226.
- Zhao, H., & Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Molecular and cellular biology*, 21(13), S. 4129-4139. DOI: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer:innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Aeschimann-Huhn, Bartsch, Bauer, Becker A., Becker K., Becker S., Beckmann, Bergmann, Bertoune, Besgen, Bette, Birk, Bogdan, Bonaterra, Bösner, Brandt, Brehm, Burchert, Cetin, Chung, Czubayko, Decher, de Cruppé, Denkert, Derigs, Falkenberg, Feuser, Fritz, Geisel, Geisthoff, Geks, Geraedts, Gerstner, Ghazy, Göbel, Gress, Gschnell, Habermehl, Halaszovich, Hantschel, Hertl, Hey, Hildebrand, Hoch, Hoyer, Huber, Jacob, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Keber, Keil, Kemmling, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kluge, Knake, Knorrenschild, Köhler, Kruse, Kühnert, Laakmann, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisner, Mand, Markus, Meißner, Menzler, Metzelder, Michel, Möller, Mühlenbein, Müller, Nenadić, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Paul, Pedrosa, Pfützner, Plant, Pojskic, Pöttgen, Preisig-Müller, Rastan, Renigunta, Renz, Rost, Ruchholtz, Rupa, Rust, Saß, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schröder, Schu, Schulze, Schumacher, Schütz, Schwab, Seifart, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Simon, Sommer, Stahl, Steiniger, Stöckmann, Stuck, Swaid, Thieme, Timmermann, Vogelmeier, Vojnar, Volberg, Vorwerk, Wagner, Weber, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wilhelmi, Wrocklage und Wulf.

8.2 Danksagung

Ich möchte hiermit allen Personen danken, die mich auf dem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Malte Buchholz für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für die wertvolle wissenschaftliche Betreuung und die konstruktiven Anregungen. Deine Denkanstöße und stetige Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen und mir stets das Gefühl gegeben, bestens betreut zu sein.

Ich danke auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die fachlichen Diskussionen und die vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Besonders hervorheben möchte ich Harald Schmidt und Ramona Diels, deren Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Austausch für mich von großer Bedeutung waren. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Louisa Ebert aussprechen, durch die die Arbeit im Labor immer mit viel Spaß verbunden war.

Abschließend gilt mein Dank meinem persönlichen Umfeld und meiner Familie für ihre emotionale Unterstützung, ihre aufmunternden Worte und ihr stets offenes Ohr.