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

Der Einfluss der Zielgene *PLAC8* und *CIP2A* auf die Tumorprogression von malignen Pankreastumoren

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Malena Kogelheide
aus Duisburg

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 20.11.2024
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner
Referent: Herr Prof. Dr. M. Buchholz
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Bartsch

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis....1
Abbildungsverzeichnis....3
Tabellenverzeichnis....4
1. Einleitung....5
1.1 Das Pankreaskarzinom....5
1.1.1 Neuroendokrine Pankreastumoren....5
1.1.2 Pankreatisch duktale Adenokarzinome....7
1.2 Das Zielgen *PLAC8*....9
1.3 Das Zielgen *CIP2A*....11
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit....13
2. Material und Methoden....14
2.1 Material....14
2.1.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterial....14
2.1.2 Laborgeräte....15
2.1.3 Chemikalien....16
2.1.4 Puffer und Lösungen....19
2.1.5 Kit-Systeme....21
2.1.6 Zelllinien....22
2.1.7 Primer....22
2.1.8 Antikörper....23
2.1.9 Plasmide....26
2.1.10 Software....27
2.2 Methoden....28
2.2.1 Zellbiologische Methoden....28
2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien....28
2.2.1.2 Zellzählung mittels Zählkammer nach Neubauer und Aussaat von Zellen....28
2.2.1.3 Probengewinnung....28
2.2.2 Gewinnung von Klonen mit *PLAC8*-Knockout....29
2.2.2.1 Transfektion via PEI....29
2.2.2.2 CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung....30
2.2.2.3 Gewinnung von Proben der Klone....31
2.2.3 Molekularbiologische Methoden....32
2.2.3.1 RNA-Isolation....32
2.2.3.2 cDNA-Synthese....32
2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion....33

2.2.3.4 quantitative Polymerasekettenreaktion 34
2.2.3.5 Restriktionsverdau 35
2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese 35
2.2.3.7 Isolation genomischer DNA 36
2.2.4 Proteinanalytische Methoden 37
2.2.4.1 Proteinextraktion 37
2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford 37
2.2.4.3 Western Blot 38
2.2.5 MTT-Assay 39
2.2.6 Etablierung der *CIP2A*-Inhibition mit TD52 40
2.2.7 Statistische Auswertung der Daten 41
3. Ergebnisse 42
3.1 *PLAC8*-Knockout und Integration von E1Δ2 und E2Δ2 42
3.1.1 Rescue-Versuch mit E1Δ2 und E2Δ2 42
3.1.2 Die Klone E1Δ2 und E2Δ2 enthalten weiterhin endogenes *PLAC8* 43
3.1.3 Überprüfung auf Störungen der Zielsequenzen der Guide-RNA 45
3.1.4 Erneuter *PLAC8*-Knockout nach Integration der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 46
3.1.5 E1Δ2 oder E1Δ2 können *PLAC8* nicht ersetzen 47
3.1.6 Das Blasticidinresistenzgen wurde erfolgreich ins Genom integriert 48
3.2 *PLAC8*-Knockout und Integration von E1Nae und E2Nae 49
3.2.1 Rescue-Versuch mit E1Nae und E2Nae 49
3.2.2 Die Klone E1Nae und E2Nae enthalten weiterhin die *PLAC8*-Sequenz 50
3.2.3 Erneuter *PLAC8*-Knockout nach Integration von E1Nae oder E2Nae 54
3.2.4 E1Nae oder E2Nae können *PLAC8* nicht ersetzen 54
3.2.5 Die Selektion mit Blasticidin war erfolgreich 56
3.2.6 Zwischenfazit 57
3.3 Das Kandidatengen *CIP2A* 58
3.3.1 Herunterregulation von *CIP2A* mittels TD52 58
3.3.2 Das Zielgen CIP2A und der Signalweg über PP2A und AKT 59
3.3.3 RPS6 und p-RPS6 63
3.3.4 Cyclin D1 und Cyclin E 64
3.3.5 Die Zellzyklusinhibitoren p18, p21 und p27 66
3.3.6 Claudin-4 als Repräsentant der Tight junctions 70
3.3.7 GLI1 als Teil des Hedgehog-Signalwegs 71
3.3.8 Zwischenfazit 72
4. Diskussion 73

4.1 Rekombinante ΔExon 2-Varianten können endogenes *PLAC8* nicht ersetzen 73
4.2 Die Schnittstelle XhoI hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität.....77
4.3 CIP2A beeinflusst verschiedene Zellzyklusmodulatoren 77
4.3.1 Der CIP2A/ PP2A/ AKT-Signalweg.....78
4.3.2 RPS6 und p-RPS6.....80
4.3.3 Cyclin D1 und Cyclin E 82
4.3.4 Die Zellzyklusinhibitoren p18, p21 und p27 82
4.3.5 Claudin-4 als Repräsentant der Tight junctions 83
4.3.6 GLI1 als Teil des Hedgehog-Signalwegs 83
4.3.7 Fazit.....84
5. Zusammenfassung 85
6. Summary.....86
7. Literaturverzeichnis.....87
8. Anhang.....
8.1 Sequenz des Volllängenkonstrukts *PLAC8* .....
8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer:innen .....
8.3 Danksagung.....

Abkürzungsverzeichnis

3. TF	3. Teilfragment
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar, base pair
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP2A	Cancerous/ cellular inhibitor of protein phosphatase 2A
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Ct-Wert	Cycle threshold-Wert
DAXX/ATRX	death-domain-associated protein/ alpha alassemia/mental retardation syndrome X-linked
DMEM	Dulbecco‘s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E1Δ2	Ende 1 delta Exon 2
E1Nae	Ende 1 Nae
E2Δ2	Ende 2 delta Exon 2
E2Nae	Ende 2 Nae
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated kinase
EXT	extended
FBS, FCS	Fetales Kälberserum, fetal calf serum
Flc	Full lenght clone, Volllängenkonstrukt
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LHA	Linker homologer Arm
LncRNA	Long non-coding RNA
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie 1
mTOR	mammalian target of rapamycin

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ORF	Open reading frame
p-	phosphoryliert (z.B. p-RPS6: phosphoryliertes ribosomales Protein S6)
PanIN	pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDAC	pankreatisch duktales Adenokarzinom
PEI	Polyethylenimin
PLAC8	Placenta-specific 8
pNEC	Pankreatisch neuroendokrines Karzinom
pNEN	Pankreatisch neuroendokrine Neoplasie
pNET	Pankreatisch neuroendokriner Tumor
PP2A	Protein phosphatase 2A
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RB1	Retinoblastoma 1
RHA	Rechter homologer Arm
RNA, RNS	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RPS6	Ribosomales Protein S6
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD4	Small mothers against decapentaplegic homolog 4
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline, TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS with Tween20, TBS mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TP53, p53	Tumorprotein 53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	Untranslated region, untranslatierte Region

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 durch homologe Rekombination (eigene Abbildung) 30
Abbildung 2: Schematische Darstellung der in BON1-Zellen transfizierten Konstrukte E1Δ2 und E2Δ2 (eigene Abbildung) 43
Abbildung 3: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Integration der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 bei ausgewählten Klonen 45
Abbildung 4: Überprüfung der Zielsequenzen für die Guide-RNA 1 und 2 46
Abbildung 5: Überprüfung des zweiten *PLAC8*-Knockout-Versuchs 48
Abbildung 6: Überprüfung der erfolgreichen Integration der Blasticidinresistenz 49
Abbildung 7: Schematische Darstellung der in BON1-Zellen exprimierten Genabschnitte E1Nae und E2Nae (eigene Abbildung) 50
Abbildung 8: Überprüfung der Integration der Konstrukte E1Nae oder E2Nae 52
Abbildung 9: Überprüfung der Expression von *PLAC8* mittels qPCR 54
Abbildung 10: Überprüfung des *PLAC8*-Knockouts nach der zweiten Transfektion 55
Abbildung 11: Überprüfung der Expression des endogenen *PLAC8s* mittels qPCR 56
Abbildung 12: Überprüfung der erfolgreichen Integration der Blasticidin-Resistenz 57
Abbildung 13: Viabilität BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 59
Abbildung 14: Expression der RNA *CIP2A* und des Proteins CIP2A in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 60
Abbildung 15: Expression der RNA *PP2A* und des Proteins PP2A in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 61
Abbildung 16: Expression des Proteins AKT in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 62
Abbildung 17: Expression des Proteins p-AKT in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 63
Abbildung 18: Expression der Proteine RPS6 und p-RPS6 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 64
Abbildung 19: Expression der RNA *Cyclin D1* und des Proteins Cyclin D1 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 65
Abbildung 20: Expression des Proteins Cyclin E in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 66
Abbildung 21: Expression der RNA *p18* in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 67
Abbildung 22: Expression der RNA *p21* in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 68
Abbildung 23: Expression des Proteins p21 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 69
Abbildung 24: Expression der RNA *p27* und des Proteins p27 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 70
Abbildung 25: Expression der RNA *Claudin-4* und des Proteins Claudin-4 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 71
Abbildung 26: Expression des Proteins GLI1 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeits- und Verbrauchsmaterial 14
Tabelle 2: Laborgeräte 15
Tabelle 3: Chemikalien 16
Tabelle 4: Puffer und Lösungen 19
Tabelle 5: Kit-Systeme 21
Tabelle 6: Zelllinien 22
Tabelle 7: Primer für die PCR 22
Tabelle 8: Primer für die qPCR 23
Tabelle 9: Primärantikörper 23
Tabelle 10: Sekundärantikörper 25
Tabelle 11: Kontrollantikörper 25
Tabelle 12: Plasmide (Klonierung in der AG Buchholz) 26
Tabelle 13: Software 27
Tabelle 14: Ansatz für die cDNA-Synthese 33
Tabelle 15: Anleitung für den Mastermix für die PCR 34
Tabelle 16: Anleitung für den Mastermix für die qPCR 35
Tabelle 17: Pipettierschema für die qPCR 40

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Bösartige Neubildungen des Pankreas gehören mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 10 % zu den Tumoren mit der höchsten Sterberate. 2019 lag die Inzidenz in Deutschland bei 19.600 neu diagnostizierten Pankreaskarzinomen pro Jahr und sie steigt stetig weiter an. Gleichzeitig lag die Mortalität 2019 fast ebenso hoch, sodass nahezu für jede neu diagnostizierte Erkrankung eine betroffene Person starb (Robert Koch Institut 2023).

Das Pankreas besitzt einen endokrinen und einen exokrinen Anteil. Die endokrinen Zellen produzieren Hormone wie Insulin und Glukagon, die den Blutzucker regulieren. Die exokrinen Zellen produzieren verschiedene Verdauungsenzyme, um die Nahrung im Duodenum aufzuspalten. Pankreaskarzinome können aus beiden Zelltypen hervorgehen. Daher unterteilt man Pankreaskarzinome in pankreatisch neuroendokrine Neoplasien (pNEN) und Adenokarzinome. Diese können wiederum in duktale (PDAC), zystische und azinäre Adenokarzinome unterteilt werden (Grant et al. 2016). pNEN machen 5 % aller Neubildungen des Pankreas aus und haben dank der Früherkennung von etwa einem Drittel der Erkrankten eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 52 %. PDAC machen mit knapp 90 % den größten Teil der Pankreaskarzinome aus und haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5 % die schlechteste Prognose (Gao et al. 2020). Die Risikofaktoren für Pankreaskarzinome sind unspezifisch und beinhalten Rauchen, Adipositas und einen erhöhten Alkoholkonsum. Zudem steigern Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 oder eine chronische Pankreatitis und genetische Faktoren das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Einen weiteren Risikofaktor stellt ein hohes Lebensalter dar. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei Männer bei 72 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren (Hermann und Kraywinkel 2019; Hu et al. 2021).

Die Therapiemöglichkeiten von Pankreaskarzinomen weisen bisher noch geringe Behandlungserfolge auf. Zudem rechnen Forschende mit einem zukünftigen Anstieg der Inzidenzen des Pankreaskarzinoms bis auf weltweit über 800.000 Neuerkrankungen pro Jahr im Jahr 2040. Aufgrund dieser Entwicklung bleibt das Pankreaskarzinom weiterhin ein relevanter Gegenstand der aktuellen Forschung (Hu et al. 2021).

1.1.1 Neuroendokrine Pankreastumoren

pNEN gehen aus den endokrinen Zellen des Pankreas hervor und weisen in ihrer Symptomatik und Entität eine große Heterogenität auf. Dadurch sind sie nicht nur schwierig zu diagnostizieren, sondern auch die Therapie und die Prognose stellen aktuell eine

Herausforderung dar. Zudem hat sich die Inzidenz in den letzten 30 Jahren mit einer Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr mehr als verdreifacht (Wang et al. 2021). Bisher ist die Erkrankung noch nicht vollständig verstanden, sodass pNEN weiter im Interesse der Forschung stehen (Sun 2017).

Bei pNEN werden gut differenzierte pankreatisch neuroendokrine Tumoren (pNET) und schlecht differenzierte pankreatisch neuroendokrine Karzinome (pNEC) unterschieden. Des Weiteren lassen sich die Neoplasien in funktionell inaktive und funktionell aktive Tumoren einteilen, wovon letztere verschiedene Hormone produzieren. Dazu gehören die Hormone Gastrin, Insulin, Glukagon, Somatostatin, das vasoaktiv intestinale Polypeptid, der growth hormone-releasing factor und Adrenocorticotropin (Sun 2017). Klinisch machen sich funktionell aktive pNEN durch die übermäßige Ausschüttung dieser Hormone bemerkbar. Die häufigste funktionell aktive pNEN ist das Insulinom, das durch eine erhöhte Insulinausschüttung auffällt. Die Patient:innen leiden unter Hypoglykämien, einer neuroglykopenischen und vegetativen Symptomatik, die sich bei einer Glukosegabe schnell bessert. Zur zweithäufigsten funktionell aktiven pNEN zählt das Gastrinom, bei dem Patient:innen unter therapieresistenten Magenulzera und Diarrhoen leiden (Perren et al. 2009). Funktionell inaktive pNEN produzieren keine spezifischen Hormone und werden daher oft erst spät diagnostiziert. Die Symptomatik entsteht meist durch die lokale Raumforderung und kann sich in Form von abdominellen Beschwerden wie Erbrechen oder Diarrhoen äußern. Bis zu 25 % der pNET sind mit hereditären Syndromen wie multiple endokrine Neoplasie 1 (MEN1) oder Von-Hippel-Lindau assoziiert und können in diesem Zusammenhang multipel auftreten (Krejs 2010; Scott und Howe 2019). In der Diagnostik lassen sich bei hormonell aktiven pNEN die Hormone selbst, sowie ihre Abbauprodukte im Blut und Urin nachweisen. Zudem werden die Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie als bildgebende Mittel eingesetzt. Anhand der Größe, der lymphogenen Ausbreitung und der Metastasierung können die Tumoren in die TNM-Stadieneinteilung der European Neuroendocrinic Tumor Society eingeteilt werden. Anhand einer Biopsie kann die Graduierung in G1, G2 und G3 der WHO-Klassifikation vorgenommen werden. Die Graduierung basiert auf dem Proliferationsindex Ki-67 und der Mitoserate, wodurch in gut differenzierte pNET (G1) bis schlecht differenzierte pNEC (G3) eingeteilt werden kann (Gao et al. 2020; Ma et al. 2020). Zur Diagnosesicherung werden immunhistochemisch die Tumormarker Synaptophysin und Chromogranin A gemessen. Des Weiteren können in Metastasen die erweiterten Tumormarker TTF1, PAX6, PAX8, CDX2 und ISL1 gezeigt werden (Scott und Howe 2019). Oftmals finden sich auf der Oberfläche der Tumoren und auf ihren Metastasen Somatostatinrezeptoren, die in der Positronenemissions-Computertomographie nachgewiesen werden können. Daher können bei diesen Tumoren

Somatostatinanaloga therapeutisch eingesetzt werden. Bei kleinen und nicht-metastasierten Tumoren wird eine Heilung durch eine operative Entfernung angestrebt. Falls diese Therapieoption nicht möglich ist, werden eine Chemotherapie und/ oder eine Immuntherapie mit Everolimus und Sunitinib eingesetzt (Wolf 2019). Insgesamt hängt die Therapie stark von der Stadieneinteilung und der Graduierung ab und ist daher vielschichtig. Die Prognose von pNEN ist ebenfalls je nach Entität verschieden und abhängig von vielen Variablen. Die 5-Jahres-Überlebensrate der pNET liegt durchschnittlich je nach Differenzierungsgrad zwischen 55 % und 85 %, wohingegen die pNEC mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 7,5 Monaten deutlich schlechter abschneiden (Gao et al. 2020; Scott und Howe 2019).

Die Entstehung der pNET und pNEC unterschiedet sich ebenso wie die nachweisbaren Mutationen. In pNET werden hauptsächlich Mutationen in *MEN1* und *death-domain-associated protein/ alpha alassemia/ mental retardation syndrome X-linked* (*DAXX/ATRX*) und seltener in den Genen des mammalian target of rapamycin-Signalweges (mTOR), *phosphatase and tensin homolog* (*PTEN*), *TSC2* (tuberous sclerosis complex 2) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (PIK3) gezeigt. Der Funktionsverlust von *MEN1* stellt dabei eine initiale Mutation dar und der Funktionsverlust von *DAXX/ATRX* tritt eher in späteren Stadien auf. Bei pNEC hingegen finden sich die meisten Mutationen in den Genen *Tumorprotein 53* (*TP53*) und *Retinoblastoma 1* (*RB1*), die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Zudem finden sich weitere Mutationen in den Genen *Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A* (*CDKN2A*), *v-Raf-Maus-Sarkom-Virus-Onkogen-Homolog B* (*BRAF*) oder *Kirsten rat sarcoma virus* (*KRAS*). *KRAS*-positive pNEC können das karzinoembryonale Antigen (CEA) produzieren, was als Zeichen der duktalen Differenzierung gewertet wird (Gao et al. 2020). Entgegen den bisherigen Annahmen zeigt der Pathomechanismus, dass pNEC mehr Ähnlichkeiten mit PDAC haben als mit pNET.

Aufgrund der steigenden Fallzahlen, der komplexen Therapie und der unzureichenden Prognose ist die Forschung an pNEN weiterhin von großer Bedeutung. Ein zentrales Ziel ist die Entschlüsselung des Pathomechanismus, um weitere Angriffspunkte der Therapie zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die BON1-Zelllinie einer pNEN verwendet und mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Zellen der BON1-Zelllinie stammen aus einer Lymphknotenmetastase eines 21-jährigen Patienten mit einem pNET (Evers et al. 1994).

1.1.2 Pankreatisch duktale Adenokarzinome

Unter den Pankreaskarzinomen kommt das PDAC mit einer Prävalenz von 90 % am häufigsten vor. Die Veränderung geht bei dem PDAC von den Zellen der Pankreasgänge im exokrinen Anteil des Pankreas aus. Wie bei den funktionell inaktiven pNEN gibt es auch hier keine Frühsymptome, sondern die Patient:innen werden oft erst in späten Stadien mit unspezifischen Symptomen

auffällig. Dazu gehören unter anderem Oberbauchschmerzen, Erschöpfung, dunkler Urin oder ein Ikterus durch einen Aufstau der Gallensäure bei Stenosierung des Ductus choledochus (Park et al. 2021). Etwa 90 % der PDAC wachsen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose schon über das Pankreas hinaus und über 50 % der Patient:innen haben bereits Fernmetastasen entwickelt (Wood et al. 2022). Diagnostisch werden die Sonographie, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie jeweils mit Kontrastmittel eingesetzt, um die Ausmaße des Tumors und das Vorkommen von Metastasen abzuschätzen. Als Biomarker fungiert das Antigen CA19-9, was im frühen Stadium eine geringe Sensitivität aufweist. Daher sollte auf ein Screening der Allgemeinbevölkerung anhand dieses Biomarkers verzichtet werden (Halbrook et al. 2023). Die Therapie des PDACs richtet sich nach der Resektabilität der Raumforderung und dem Vorkommen von Fernmetastasen. Hier wird in resektable PDAC, grenzwertig resektable und lokal fortgeschrittene PDAC unterteilt. Bei einem resektablem Tumor wird dieser je nach Lokalisation im Rahmen einer Whipple-Operation oder einer Pankreaslinksresektion entfernt. Anschließend wird eine Chemotherapie mit Gemcitabin und einem Konjugat von Paclitaxel oder Fluoruracil, Irinotecan, Leucovorin und Oxaliplatin durchgeführt. Bei lokal fortgeschrittenen PDAC liegt eine palliative Situation vor und es wird ausschließlich eine Chemotherapie angewandt (Park et al. 2021; Halbrook et al. 2023). Nur 15 – 20 % der PDAC sind bei Diagnosestellung noch resektabel und damit potenziell kurativ behandelbar. Doch selbst bei operierten Patient:innen liegt das Risiko für ein Rezidiv innerhalb von zwei Jahren bei 75 % (Halbrook et al. 2023).

PDAC entstehen aus Vorläuferläsionen und wachsen in einem mehrstufigen Prozess von einer low-grade zu einer high-grade Läsion, aus der dann schlussendlich das Karzinom entsteht. Dabei kann das Karzinom über zwei verschiedene Wege entstehen. 85 – 90 % der PDAC entstehen aus pankreatisch intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und die restlichen 10 – 15 % entstehen aus intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN). PanIN sind Läsionen mit einem Durchmesser unter 5 mm und daher schwer zu detektieren. IPMN sind makroskopisch sichtbare zystische Läsionen, die in einer Bildgebung als Zufallsbefund auffallen können (Wood et al. 2022). Der Pathomechanismus ist noch nicht abschließend geklärt, doch gibt es einige Anhaltspunkte für den Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen und der Entstehung von PDAC. Mutationen in *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *Small mothers against decapentaplegic homolog 4* (*SMAD4*) und deren Kombinationen gehören zu den bisher häufigsten nachgewiesenen Mutationen. *KRAS* wurde dabei in > 90 % der frühen low-grade PanIN und IPMN nachgewiesen, was die Vermutung einer initialen Mutation von PDAC zulässt (Gao et al. 2020; Grant et al. 2016). *KRAS*-Mutationen allein bedingen nicht die Entstehung eines PDACs. Hierfür sind weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *CDKN2A*, *TP53* oder *SMAD4*

notwendig, die zu einem Funktionsverlust führen. *CDKN2A* konnte vornehmlich in frühen Läsionen detektiert werden, wohingegen die Mutationen in *TP53* und *SMAD4* vermehrt in späten high-grade Läsionen der PanIN nachgewiesen wurden. Oft folgen diese beiden Mutationen auf die Mutation in *CDKN2A*, wobei eine Mutation in *SMAD4* oftmals die abschließende Mutation vor der Entstehung eines PDACs darstellt (Gao et al. 2020; Grant et al. 2016; Halbrook et al. 2023; Wood et al. 2022).

Neueste Studien zeigen, dass pNEC und PDAC weitaus mehr Ähnlichkeiten haben, als bisher angenommen wurde. Insgesamt machen Mutationen in *KRAS*, *CDKN2A* und *TP53* über 90 % der Mutationen in PDAC aus, sodass diese sich mit den Mutationen in pNEC überschneiden. In diesen Beobachtungen könnte ein großes Potenzial für die weitere Forschung und Therapie der PDAC und pNEC liegen (Gao et al. 2020). Aus diesem Grund wurden Zellen der PDAC-Zelllinie S2-007 verwendet, um die beiden Entitäten der Pankreastumore in verschiedenen Untersuchungen einander gegenüberzustellen. Die Zellen stammen aus einer Lebermetastase eines high-grade PDACs eines 73-jährigen Patienten (Takeshi IWAMURA et al. 1987).

1.2 Das Zielgen *PLAC8*

Placenta-specific 8 (*PLAC8*), auch Onzin genannt, gehört zu den Plazenta-regulierenden Genen und ist im menschlichen Genom auf Chromosom 4 lokalisiert. Eine vermehrte Genexpression von *PLAC8* findet während der Schwangerschaft statt, insbesondere während der Entwicklung der Plazenta im Endometrium (Feng et al. 2021; Mao et al. 2021). Das Protein PLAC8 ist ein kleines Protein von 16 kDa und besitzt fünf Exons. Es konnte bisher in Trophoblasten, in der Plazenta, in myeloiden und lymphoiden Zellen, sowie intestinalem und Lungengewebe nachgewiesen werden (Feng et al. 2021; Kaistha et al. 2016). PLAC8 bzw. homologe Proteine kommen sowohl in humanen Zellen als auch in tierischem Gewebe und in einigen Pflanzen vor. Das Protein besitzt eine Cystin-reiche Region, in der die Proteine AKT1 und MDM-2 binden und dadurch aktiviert werden können. Gleichzeitig kann hier der Transkriptionsfaktor C/EBPβ binden und die Transkription von *PLAC8* induzieren (Mao et al. 2021). Die aktuelle Forschung zeigt, dass *PLAC8* nicht nur eine Rolle bei der Organentwicklung von Embryos spielt, sondern auch einen Einfluss auf die Entstehung und Progression von verschiedenen Tumoren hat. *PLAC8* wirkt als Onkogen in verschiedenen Tumorentitäten. Es induziert das Tumorwachstum bei Prostatakarzinomen und kolorektalen Karzinomen, verringert die Apoptose bei Brustkrebs und Lungenkarzinomen und führt zu einer Sensibilitätsreduktion gegenüber Radiotherapie und Chemotherapeutika (Deng et al. 2023; Huang et al. 2020; Mao et al. 2021). In Zellen des Zervixkarzinoms und von nasopharyngealen Karzinomen konnte die Aktivierung des AKT/mTOR-Signalwegs durch eine Überexpression von PLAC8 gezeigt werden, wodurch es zu einer

Proliferation von Tumorzellen kommt. Bei einer Herunterregulation von PLAC8 konnte hingegen ein Malignitätsverlust im Sinne einer geringeren Invasion und Migration gezeigt werden (Deng et al. 2023; Huang et al. 2020). PLAC8 beeinflusst nicht nur die Karzinogenese, sondern zeigt auch eine positive Korrelation in der Entstehung von Übergewicht. Indem es die Wachstumsfaktoren von Adipozyten stimuliert, agiert PLAC8 als ein Regulator von Übergewicht. In Mausmodellen konnte zudem gezeigt werden, dass Plac8 durch die Störung der Funktion von neutrophilen Granulozyten, das Immunsystem schwächt (Lee et al. 2018). Durch zahlreiche Wirkungsmechanismen in unterschiedlichen Geweben bleiben *PLAC8* und seine Genprodukte im Interesse der aktuellen Forschung und bieten möglicherweise einen neuen Therapieansatz für verschiedene Karzinome.

Neben zahlreichen Zellentitäten beeinflusst PLAC8 auch das pankreatische Gewebe, insbesondere die Entstehung und Progression von PDAC und von pNET. Während im gesunden pankreatischen Gewebe kaum eine Expression von PLAC8 detektierbar ist, können in high-grade Läsionen von PDAC und in einem hohen Prozentsatz von pNEN hohe Expressionsraten der *PLAC8*-mRNA nachgewiesen werden (Kaistha et al. 2016). Das PLAC8-Protein findet sich sowohl bei pNET- als auch bei PDAC-Zellen an der Innenseite der Plasmamembran (Kaistha et al. 2016; Kinsey et al. 2014; Tatura et al. 2020). Bei der Untersuchung mehrerer humaner Proben von pNET wurden sowohl PLAC8-positive als auch PLAC8-negative Tumoren ermittelt. Eine besonders hohe Korrelation bestand zwischen Insulin-produzierenden pNET (Insulinomen) und einer vermehrten PLAC8-Expression (Tatura et al. 2020). In high-grade PanIN wurde eine Hochregulation von PLAC8 am Übergang zu PDAC beobachtet (Kaistha et al. 2016). Daraus lässt sich schließen, dass eine erhöhte PLAC8-Expression in einer späteren Phase der Tumorentwicklung von PDAC eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu ist bei humanen pNET *in vivo* eine fehlende PLAC8-Expression mit aggressiveren Tumoren und einer schlechteren Prognose assoziiert (Tatura et al. 2020). Ein *PLAC8*-Knockdown *in vitro* korreliert durch verschiedene Mechanismen negativ mit der Zellviabilität von pNET-Zellen, weshalb dieser Zusammenhang in Zukunft weiterhin untersucht werden sollte. Kinsey et al. (2014) arbeiteten bei Mäusen mit einem PDAC und einem *Plac8*-Knockout. Diese wurden dann im Hinblick auf das Überleben mit Mäusen mit einem PDAC verglichen, die weiterhin *Plac8* exprimierten. Die Mäuse nach *Plac8*-Knockout überlebten mit PDAC signifikant länger als Mäuse mit *Plac8*-Wildtyp (Kinsey et al. 2014). Ein *PLAC8*-Knockdown führt unter anderem durch die Modifikation der Zellzyklusregulatoren p21, RB1, und Cyclin D1 zu einer Hemmung des Zellzyklus. So zeigte sich nach einem *PLAC8*-Knockdown eine Hochregulation von p21 und eine Herunterregulation von Cyclin D1 auf der Ebene der mRNA. Zudem wurde in den Zellen mit einem *PLAC8*-Knockdown eine Reduktion von p-RB1 und dem phosphorylierten ribosomalen Protein S6 (p-RPS6)

beobachtet, während bei den unphosphorylierten Proteinen keine Verringerung wahrgenommen wurde (Kaistha et al. 2016; Tatura et al. 2020). Damit scheint *PLAC8* ein zentraler Baustein der Zellregulation in pNET und PDAC zu sein. Die genauen Mechanismen und Interaktionen in verschiedenen pankreatischen Tumorzellen sind noch nicht endgültig verstanden, weshalb sie weiterhin im Fokus der Forschung stehen. Zukünftig könnte *PLAC8* einen vielversprechenden Angriffspunkt für neue Therapien darstellen.

1.3 Das Zielgen *CIP2A*

Cancerous/ cellular inhibitor of protein phosphatase 2a (CIP2A) ist ein ca. 90 kDa großes Onkoprotein, das durch das Gen KIAA1524 auf Chromosom 3 kodiert wird (Soofiyani et al. 2017). Seinen Namen erhält CIP2A durch den inhibitorischen Einfluss auf Protein phosphatase 2A (PP2A) (Junttila et al. 2007). Eine Überexpression von CIP2A wurde in bis zu 70 % der untersuchten Tumorgewebe detektiert, wie Brustkrebs, hepatozellulären Karzinomen und kolorektalen Karzinomen. Hier wurde ein Zusammenhang zwischen einer CIP2A-Erhöhung und einer schlechten Prognose beobachtet (Chen et al. 2020; Nagelli und Westermarck 2023; Xu et al. 2016). In Pankreastumoren wurde ebenfalls eine verstärkte Expression von CIP2A gezeigt, die mit einer schlechteren Prognose in Form von einer geringeren Differenzierung und einer höheren Metastasierungsrate korrelierte. Zudem wurde vermehrt eine Weiterentwicklung von Vorläuferläsionen zu PDAC gezeigt und eine höhere Rate an Gemcitabin-resistenten Tumoren beobachtet. Ein möglicher Grund könnte die Interaktion von CIP2A mit verschiedenen Proteinen sein, wodurch der Tumorprogress gefördert wird. Zu den Mechanismen gehören die Verhinderung der Apoptose von Tumorzellen, Förderung des Zellwachstums und die Beeinflussung von Mitose und Zellzyklusregulation (Junttila et al. 2007; Soofiyani et al. 2017; Xu et al. 2016).

PP2A ist eine Serin/Threonin-Kinase und gilt in mehreren Tumoren als Tumorsuppressorprotein durch die Regulation vom Übergang der G2- in die M-Phase des Zellzyklus. Über Signalwege wie PI3K/AKT/mTOR, c-Myc, Ras-Raf-mitogen-activated protein (MAP) und extracellular signal regulated kinase (ERK) wirkt PP2A dem Zellwachstum entgegen. PP2A wird durch CIP2A inhibiert, wodurch die Zellproliferation gefördert wird und CIP2A die Reparatur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) hemmt (Nagelli und Westermarck 2023; Soofiyani et al. 2017). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) an der Stelle Ser473 durch PP2A initiiert und AKT dadurch aktiviert wurde. Demnach wird die Aktivität von p-AKT durch CIP2A indirekt reguliert und eine erhöhte CIP2A-Expression korreliert in der Literatur mit einer erhöhten p-AKT-Expression (Lucas et al. 2018; Luque et al. 2022). Diese Korrelation zeigte sich auch in Untersuchungen, in denen nach Inhibition von *CIP2A* die

Ribonukleinsäure (RNA) *AKT* und das Protein p-AKT herunterreguliert wurden (Xu et al. 2016). Insgesamt sind PP2A und AKT wichtige Biomarker von Tumorzellen und relevante Regulatoren in der Tumorprogression (Lucas et al. 2018).

CIP2A hat nicht nur über den PP2A/AKT-Signalweg einen Einfluss auf Zellzyklusregulatoren. Auch über die Interaktion mit c-Myc kann CIP2A in die Regulation des Zellzyklus eingreifen. Die Expression von CIP2A wird unter anderem durch c-Myc initiiert und hochreguliert. Im Gegenzug dazu stabilisiert CIP2A c-Myc durch die Verhinderung der Dephosphorylierung durch PP2A. C-Myc ist ein wichtiger Zellzyklusregulator, der als Transkriptionsfaktor die Expression von Zellzyklusprogressionsgenen wie beispielsweise den Cyclinen initiiert und somit den Zellzyklus vorantreibt. So verstärkt CIP2A über die Stabilisierung von c-Myc das Wachstum und die Tumorproliferation (Junttila et al. 2007; Soofiyani et al. 2017). Auch andere Studien mit Zellen des hepatozellulären Karzinoms ergaben, dass über die Inhibition von PP2A der Zellzyklus weniger gehemmt wurde. So wurde beispielsweise durch die Phosphorylierung von FOXM1 der Zellzyklusinhibitor p21 gehemmt. Bei einer Inhibition von CIP2A konnte demnach eine Expressionssteigerung von p21 und eine durch p21 gehemmte Expression von Cyclin D1 und den Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 4 beobachtet werden (Chen et al. 2020; Yang et al. 2018).

Erlotinib ist ein Chemotherapeutikum, ein Tyrosinkinase-Hemmer, das bereits in der Therapie von Pankreaskarzinomen und bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eingesetzt wird. Es bewirkt in den Tumorzellen durch eine Inhibition von EGFR einen Zellzyklusarrest und induziert den Zelltod (Abdelgalil et al. 2020). TD52 ist ein Erlotinib-Derivat und CIP2A-Inhibitor, der CIP2A über den CIP2A/PP2A/AKT-Signalweg herunterreguliert und somit unabhängig von EGFR wirkt. Elk-1 dient in der Transkription von *CIP2A* als Transkriptionsaktivator und bindet an dessen Promoter. In Zellen des hepatozellulären Systems wurde gezeigt, dass TD52 die Bindung von Elk-1 an den Promoter von CIP2A beeinträchtigt, sodass die Transkription von *CIP2A* herunterreguliert wurde. Des Weiteren wurde eine Hochregulation von PP2A und eine Herunterregulation von AKT beobachtet. Ähnliche Ergebnisse konnten *in vivo* erzielt werden (Yu et al. 2014). In Brustkrebszellen wurde ergänzend beobachtet, dass ERK nach der Inhibition mit TD52 verringert exprimiert wurde. ERK phosphoryliert Elk-1, sodass dieses Protein an den Promoter von CIP2A binden kann. So wird wahrscheinlich nicht nur die Promoterbindung durch TD52 gestört sondern auch die Expression von ERK (Liu et al. 2017a). In der vorliegenden Arbeit wurde TD52 verwendet, um CIP2A spezifisch zu inhibieren.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Pankreaskarzinome sind aktuell eine Herausforderung in der medizinischen Praxis und gehen mit einer schlechten Prognose einher. Die beiden Tumorentitäten unterscheiden sich besonders durch ihre Entstehungsmutationen. Es wurde beobachtet, dass die beiden Zielgene *PLAC8* und *CIP2A* wichtige Bausteine in der Zellproliferation und Differenzierung von Pankreaskarzinomen darstellen. Der Einfluss beider Gene auf die Zellen von Pankreaskarzinomen ist noch nicht abschließend geklärt. Beide Zusammenhänge können in Zukunft ein Angriffspunkt neuer Therapien für pNET und PDAC sein. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Entitäten zu finden, wurde in der vorliegenden Arbeit die pNET-Zelllinie BON1 untersucht und der PDAC-Zelllinie S2-007 gegenübergestellt.

In vorangegangenen Arbeiten der AG Buchholz wurde beobachtet, dass S2-007-Zellen ohne das Protein PLAC8 überleben können, nicht jedoch ohne die RNA. Das lässt den Schluss zu, dass die RNA weitaus relevanter für die Zellen ist als das Protein (Stark 2017). Zudem wurde durch den Rescue-Versuch von *PLAC8* in S2-007-Zellen gezeigt, dass ein vollständiger Knockout der *PLAC8* mRNA-Expression (im Gegensatz zur Proteinexpression) nicht möglich war. Nach einer Sequenzierung der Klone konnte beobachtet werden, dass verschiedene Versionen von Exon 1 von *PLAC8* exprimiert wurden und dass einige Klone kein Exon 2 mehr enthielten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Transkripte von *PLAC8* in einigen untersuchten S2-007-Zellen länger waren, als bisher beschrieben wurde (Stark 2022). Ähnliche Ergebnisse konnten für BON1-Zellen gezeigt werden. Zwar konnten Klone mit einer geringen bzw. einer fehlenden PLAC8 Proteinexpression generiert werden, jedoch war ein Knockout der *PLAC8*-RNA in BON1-Zellen erfolglos (Kuhl 2019). Aus diesen Untersuchungen ergaben sich neue Forschungsaspekte, sodass diese Themen den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden.

Das Ziel der Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche Rolle spielt Exon 2 von *PLAC8* und dessen Fehlen für die Zellviabilität von pNET?
2. Inwieweit ist die 3‘ untranslatierte Region (UTR) von *PLAC8* relevant für die Zellviabilität und ergibt sich ein Unterschied in der Wahl verschiedener Endpunkte von *PLAC8*?
3. Welche Rolle spielt *CIP2A* in der Tumorprogression von pNET und PDAC?
4. Wie beeinflusst *CIP2A* verschiedene Zellzyklusmodulatoren auf RNA- und auf Proteinebene?
5. Wie unterscheidet sich der Einfluss von *CIP2A* bei pNET und PDAC im Hinblick auf verschiedene Zellzyklusmodulatoren?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Arbeits- und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
15 mL Falcon	Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, Germany)
50 mL Falcon	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Germany)
50 mL Falcon, selbststehend	Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Amersham Protran Nitrocellulosemembran 0,2 µm	GE Healthcare (Freiburg, Germany)
Blotting Papier (MN 218 B)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany)
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Germany)
Cellstar 6 well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Germany)
Combitips advanced (2,5; 5; 10 mL)	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting (0,2 µm)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Feldkirchen, Germany)
MicroAmp Fast 96 well Reaction Plate	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
Microtest Plate 96 well F/R/K	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Micro Tube 2 mL DNA low binding	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Multiply-µStrip Pro 4-Strip	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Petri Dish 92x16 mm with Cams	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Pipettes (2 mL)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Germany)
Pipettes (5; 10; 25; 50 mL)	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Pipette Tips (20; 200; 1000 µL), Gelloader Pipette Tips	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
Reaction Tubes (0,5; 1,5; 2 mL)	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
TC Dish 100, Standard	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)
TC Flask T25/ T75, Standard	Sarstedt Ag & Co. (Nürnbrecht, Germany)

ViewPlate-96 Black, optically clear bottom	Perkin Elmer (Waltham, USA)

2.1.2 Laborgeräte

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Realtime-PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
AccuBlock Digital Dry Baths	Labnet International Inc (Edison, USA)
Autoclave Systec DX-65	Systec GmbH (Linden, Germany)
Autoclave Systec VX-150	Systec GmbH (Linden, Germany)
Cell Culture Bench: Msc-Advantage 1.2	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Centro LB960 Luminometer	Verthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Germany)
Chemo Cam Imager	INTAS Science Imaging (Göttingen, Germany)
Duran Glas 600 mL	Schott AG (Mainz, Germany)
EasyPhor PAGE Maxi – Systeme (Elektrophoresekammer, Glasplatte, Gießbasis, Kämme, Gießstand)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Germany)
EasyPhor PAGE Mini – Systeme	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Germany)
Freezer Mediline LKexv 3910 (4 °C, -20 °C)	LIEBHERR (Bulle, Switzerland)
Gel Imager	INTAS Science Imaging (Göttingen, Germany)
Heracell 240i CO_2 Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Heraeus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Hera Freeze Hfu T Series (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Heratherm Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany)
Leica Microscope DM IL LED	Leica Microsystems CMS GmbH (Wetzlar, Germany)
Micro Star 17 Centrifuge	VWR International GmbH (Darmstadt, Germany)

Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Feldkirchen, Germany)
Multipipette Plus	Eppendorf AG (Hamburg, Germany)
Multiscan Fc	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Germany)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondenheim vor der Rhön, Germany)
Peqpower E300 Power Supply	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Germany)
Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Switzerland)
Pipetman Pipettes P10/P20/P200/P1000	Gilson (Limburg-Offenheim, Germany)
PS 500 XT DC Power Supply	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
S-403 Digital Scale	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Göttingen, Germany)
See-Saw Rocker – SSL4	Stuart (Stone, United Kingdom)
Shaking Device (Ks 250 Basic)	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany)
Sprout Mini Centrifuge	Heathrow Scientific (Illinois, USA)
Step One Plus Real-time PCR System	Applied Biosystems by Life Technologies (Waltham, USA)
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Feldkirchen, Germany)
VIP20 Microwave	Whirlpool Corporation (Benton Harbor, USA)
Vortexer Reax Top	Heidolph Instruments (Schwabach, Germany)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10x 0,5 % Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ampuwa Rinse Solution (1 L)	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Germany)
Aqua ad Injectabilia (20 x 10 mL)	B. Braun (Melsungen, Germany)

Blasticidin [10 mg/ mL]	InvivoGen (Toulouse, France)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Clarity Western ECL Substrate	Bio-rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Germany)
Coomassie Plus Protein Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix [10 mM]	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Dulbecco's Modified Eagle Medium/ F-12, GlutaMAX Supplement	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Germany)
Full lenght clone *PLAC8*	BioCat GmbH (Heidelberg, Germany)
G418 -disulfat (Salz) -Lösung [50 mg/ mL]	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Gentamicin Lösung [10 mg/ mL]	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Germany)
Glycerin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Guide-RNA 1	OriGene Technologies, Inc. (Rockville, USA)
Guide-RNA 2	OriGene Technologies, Inc. (Rockville, USA)
HD Green Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, Germany)

HEPES Buffer Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Germany)
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Methanol ≥ 99,8 %	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tetrabasisches Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Polyethylenimin, linear, MW 25.000	Polysciences, Inc. (Warrington, USA)
Protease Arrest	G-Biosciences (St. Louis, USA)
Puromycin [10 mg/ mL]	InvivoGen (Toulouse, France)
Restriktionsenzyme (NaeI, XhoI)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Germany)
Rotiphorese 10x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Salzsäure (1 M)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
TD52	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
Tween20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Western Lightning Ultra	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Zeocin [100 mg/ mL]	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
10x Blotting Puffer	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin Aqua dest ad 1 L
1x Blotting Puffer	10 % 10x Blotting Puffer 20 % Methanol Aqua dest ad 1 L
1x Lysepuffer	50 mM Hepes (1 M, pH: 7,5) 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % Triton X 100 100 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumdiphosphat
1x Lysepuffer mit Phosphatase	10 mL 1x Lysepuffer 10 µL EGTA 200 µL Natriummetavanadat 10 µL Phenylmethylsulfonlyfluorid 100 µL Protease 9590 µL PBS
10x Laufpuffer	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin 1 % SDS Aqua dest ad 1 L
1x Laufpuffer	10 % 10x Laufpuffer Aqua dest ad 1 L
4x SDS Ladepuffer	253 mM Tris-Hydrochlorid 0,05 % Bromphenolblau 40 % Glycerol 2 % SDS Aqua dest ad 50 mL pH 6,8

1x TAE-Puffer	10 % TAE-Puffer Aqua dest ad 1 L
10x TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	24,2 g Tris Base 80 g Natriumchlorid Aqua dest ad 1 L pH 7,6
1x TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20	10 % 10x TBS-Puffer 0,1 % Tween 20 Aqua dest ad 1 L
10 % APS	1 g APS 10 mL Aqua dest
BSA-Lösung (5 %)	2 g BSA 40 mL TBST
Dithiothreitol (DTT)-Lösung	154,25 mg DTT Aqua dest ad 1 L
Ethanol 70 %	70 mL Ethanol 100 % 30 mL Aqua dest
Ethanol 80 %	80 mL Ethanol 100 % 20 mL Aqua dest
Magermilch 5 %	2 g Magermilchpulver 40 mL TBST-Puffer
MTT-Reagenz	5 mg Thiazolyl blue 1 mL PBS
Sammelgellösung	25 mL Sammelgelpuffer 59 mL Aqua dest 16 mL Acrylamid Später: + 0,25 % 10 % APS + 0,25 % Temed
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris Base 0,4 % SDS Aqua dest ad 1 L pH 6,8

Solubilization Solution	8 mL Isopropanol 1 mL Triton X 100 1 mL Salzsäure (1 M)
Stopplösung	250 µL Trenngellösung (ohne 10 % APS und Temed) Später: + 1 % 10 % APS + 1 % Temed
Trenngellösung 15 %	3 mL Trenngelpuffer 2,4 mL Aqua dest 6 mL Acrylamid 0,6 mL Glycerol Später: + 0,17 % 10 % APS + 0,17 % Temed
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base 0,4 % SDS Aqua dest ad 1 L pH 8,8

2.1.5 Kit-Systeme

Tabelle 5: Kit-Systeme

Kit-Systeme	Hersteller	Verwendung
Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden, Germany)	Synthese von cDNA
peqGOLD Total RNA Kit	VWR International GmbH (Darmstadt, Germany)	Isolation von mRNA
PLAC8 – human gene knockout kit via CRISPR - Blasticidin-Resistenz - Puromycin-Resistenz	OriGene Technologies (Rockville, USA)	Knockout von *PLAC8*
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Germany)	Isolation von genomischer DNA

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: Zelllinien

Name	Herkunft	Zellkulturmedium
S2-007 (SUIT2-007)	Lebermetastase eines Patienten (73 J.) mit PDAC, Subzelllinie 007 mit hohem Metastasierungs-potenzial (Taniguchi et al. 1992)	DMEM, 5 % FBS
BON1	Lymphknotenmetastase eines Patienten (28 J.) mit einem Serotonin-produzierendem pNET (1986) (Lou et al. 2022)	DMEM/F-12, GlutaMAX Supp., 10 % FBS
RMS13	Rhabdomyosarkom (Schott et al. 2015)	DMEM/F-12, GlutaMAX Supp., 10 % FBS

2.1.7 Primer

Tabelle 7: Primer für die PCR

Primer	Sequenz	
Blasticidin	Forward Reverse	5‘ -tcggaaatgagaacaggggc- 3‘ 5‘ -gggcagcaattcacgaatcc- 3‘
EXT	Forward Reverse	5‘ -tctcacgttcctagatagcatcatct- 3‘ 5‘ -agctagcaagagagacattctgaaga- 3‘
LHA	Forward	5‘ -cagagatttctaacaccactct- 3‘
PLAC8 3. TF	Forward Reverse	5‘ -cctcctgggctcaagtgttaat- 3‘ 5‘ -ggcggatcacttgaggttagg- 3‘
PLAC8 Exon 1	Forward	5‘ -tcatttgtggtgagattctct- 3‘
PLAC8 Exon 2 hinten	Forward	5‘ -gaactccaactggcagacag- 3‘
PLAC8 neu	Forward Reverse	5‘ -gtatgacctcggcttaatgcaa- 3‘ 5‘ -agatcgtgccattgcactcca- 3‘
PLAC8 ORF	Forward Reverse	5’ -gggtgtcaagttgcagctgat- 3‘ 5‘ -tagatccagggatgccatatcg- 3’
PLAC8 skipped Exon 2	Reverse	5‘ -tgaatgctgtctgtgtggaaca- 3‘
PLAC8 UTR	Reverse	5‘ -agatggtgaagaactcaagctgaa- 3‘
RHA	Reverse	5‘ -tggtaattcacctcggtatcaa- 3‘

Tabelle 8: Primer für die qPCR

Primer	Sequenz	
CIP2A	Forward	5‘ -ggcttcctccctagaggttca- 3‘
	Reverse	5‘ -gtgggagtgtttgttcaattcct- 3‘
Claudin-4	Forward	5‘ -tgcactctgcgaacgttaagtc- 3‘
	Reverse	5‘ -gcgtccacgggagttgag- 3‘
Cyclin D1	Forward	5‘ -cagaacacggctcacgctta- 3‘
	Reverse	5‘ -cttgccccatcacgacaga- 3‘
GLI1	Forward	5’ -aatgctgccatggatgctaga- 3‘
	Reverse	5‘ -gagtatcagtaggtgggaagtccatats 3’
p18	Forward	5’ -ctgtgatttggccaggctcta- 3‘
	Reverse	5‘ -ccctccccacgtttattgaa- 3’
p21	Forward	5’ -tgattagcagcggaacaagga- 3‘
	Reverse	5‘ -aactactcccagccccatatga- 3’
p27	Forward	5’ -tgccctccccagtctctctta- 3‘
	Reverse	5‘ -caagcacctcggatttttgc- 3’
PLAC8 3. TF	Forward	5‘ -cctcctgggctcaagtgttaat- 3‘
	Reverse	5‘ -ggcggatcacttgaggttagg- 3‘
PLAC8 EXT	Forward	5‘ -tctcacgttcctagatagcatcatct- 3‘
	Reverse	5‘ -agctagcaagagagacattctgaaga- 3‘
PLAC8 ORF	Forward	5’ -gggtgtcaagttgcagctgat- 3‘
	Reverse	5‘ -tagatccagggatgccatatcg- 3’
PP2A	Forward	5’ -atctctcccgctccctaagg- 3‘
	Reverse	5‘ -agacatgcctcaccccatca- 3’
RPLP0	Forward	5’ -tgggcaagaacaccatgatg- 3‘
	Reverse	5‘ -agtttctccagagctgggttgt- 3’

2.1.8 Antikörper

Tabelle 9: Primärantikörper

Antikörper	Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
Anti-AKT	AKT Antikörper #9272	Rabbit, polyklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

Anti-CIP2A	Anti-CIP2A Antikörper (ab99518)	Rabbit, polyklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Abcam plc. (Berlin, Germany)
Anti-Claudin-4	Claudin-4 polyklonaler Antikörper (ZMD.306)	Rabbit, polyklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany)
Anti-Cyclin D1	Rekombinanter Anti-Cyclin D1 Antikörper [SP4] (ab16663)	Rabbit, monoklonal	[1:500] in 5 % Magermilchpulver	Abcam plc. (Berlin, Germany)
Anti-Cyclin E	Anti-Cyclin E Antikörper, Klon HE12	Mouse, monoklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Germany)
Anti-GLI1	GLI1 (C68H3) Rabbit mAb #3538	Rabbit, monoklonal	[1:1.000] in 5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-p21	p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb #2947	Rabbit, monoklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-p27	p27 Kip1 (D69C12) XP Rabbit mAb #3686	Rabbit, monoklonal	[1:1.000] in 5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-phosphoAKT	Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb #4060	Rabbit, monoklonal	[1:2.000] in 5 % BSA	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-phosphoRPS6	Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	Rabbit, polyklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

	Antikörper #2211			
Anti-PP2A	Anti-PP2A alpha + beta Antikörper [E155] (ab32104)	Rabbit	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Abcam plc. (Berlin, Germany)
Anti-RPS6	S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb #2217	Rabbit, monoklonal	[1:1.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

Tabelle 10: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antikörper #7076S	horse	[1:10.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-rabbit	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antikörper #7074S	goat	[1:10.000] in 5 % Magermilchpulver	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

Tabelle 11: Kontrollantikörper

Antikörper	Hersteller	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	Anti-β-Aktin-Peroxidase-Antikörper (A3854)	Mouse, monklonal	[1:40.000] in 5 % Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.9 Plasmide

Tabelle 12: Plasmide (Klonierung in der AG Buchholz)

Plasmid	
PLAC8 E1Δ2	5‘ - agttacctctccccttttcacgtagttttcatttgtggtgagattctctcccaggccacaagacatttcc tgctcggaaccttgtttactaattgtctctgtggcacattttgtttcccgtgccttgggtgtcaagttgc agctgatatgaatgaatgctgtctgtgtggaacaagcgtcgcaatgaggactctctacaggacccg atatggcatccctggatctatttgtgatgactatatggcaactctttgctgtcctcattgtactctttgc caaatcaagagagatatcaacagaaggagagccatgcgtactttctaaaaactcgagtggtgaa aagctcttaccgaagcaacaaaattcagcagacacctcttcagcttgagttcttcaccatcttttgc aactgaaatatgatggatatgcttaagtacaactgatggcatgaaaaaaatcaaatttttgatttat tataaatgaatgttgtccctgaactta- 3‘
PLAC8 E1Nae	5‘ - agttacctctccccttttcacgtagttttcatttgtggtgagattctctcccaggccacaagacatttcc tgctcggaaccttgtttactaatttccactgcttttaaggccctgcactgaaaatgcaagctcagccg gcgttgtgacccaacctggagtcccggtccggccccccagaactccaactggcagacaggcatgt gtgactgtttcagcgactgcggagtctgtctctgtggcacattttgtttcccgtgccttgggtgtcaag ttgcagctgatatgaatgaatgctgtctgtgtggaacaagcgtcgcaatgaggactctctacagga cccgatatggcatccctggatctatttgtgatgactatatggcaactctttgctgtcctcattgtactc tttgccaaatcaagagagatatcaacagaaggagagccatgcgtactttctaaaaactgatggtg aaaagctcttaccgaagcaacaaaattcagcagacacctcttcagcttgagttcttcaccatctttt gcaactgaaatatgatggatatgcttaagtacaactgatggcatgaaaaaaatcaaatttttgattt attataaatgaatgttgtccctgaactta- 3‘
PLAC8 E2Δ2	5‘ - agttacctctccccttttcacgtagttttcatttgtggtgagattctctcccaggccacaagacatttcc tgctcggaaccttgtttactaattgtctctgtggcacattttgtttcccgtgccttgggtgtcaagttgc agctgatatgaatgaatgctgtctgtgtggaacaagcgtcgcaatgaggactctctacaggacccg atatggcatccctggatctatttgtgatgactatatggcaactctttgctgtcctcattgtactctttgc caaatcaagagagatatcaacagaaggagagccatgcgtactttctaaaaactcgagtggtgaa aagctcttaccgaagcaacaaaattcagcagacacctcttcagcttgagttcttcaccatcttttgc aactgaaatatgatggatatgcttaagtacaactgatggcatgaaaaaaatcaaatttttgatttat tataaatgaatgttgtccctgaacttagctaaatggtgcaacttagtttctccttgctttcatattatc gaattcgaatttcctggcttataaacttttaaattacatttgaaatataaaccaaatgaaatatttt actgataag- 3‘

PLAC8 E2Nae	5‘ - agttacctctccccttcacgtagttttcatttgtggtgagattctctcccaggccacaagacatttcc tgctcggaaccttgtttactaatttccactgcttttaaggccctgcactgaaaatgcaagctcagccg gcgttgtgacccaacctggagtcccggtccggccccccagaactccaactggcagacaggcatgt gtgactgtttcagcgactgcggagtctgtctctgtggcacattttgtttcccgtgccttgggtgtcaag ttgcagctgatatgaatgaatgctgtctgtgtggaacaagcgtcgcaatgaggactctctacagga cccgatatggcatccctggatctatttgtgatgactatatggcaactctttgctgtcctcattgtactc tttgccaaatcaagagagatatcaacagaaggagagccatgcgtactttctaaaaactgatggtg aaaagctcttaccgaagcaacaaaattcagcagacacctcttcagcttgagttcttcaccatctttt gcaactgaaatatgatggatatgcttaagtacaactgatggcatgaaaaaaatcaaatttttgattt attataaatgaatgttgtccctgaacttagctaaatggtgcaacttagtttctccttgctttcatattat cgaattcgaatttcctggcttataaacttttttaaattacatttgaaatataaaccaaatgaaatatttt actgataag- 3‘

2.1.10 Software

Tabelle 13: Software

Software	Verwendung
ImageJ bundled with 64-bit Java 8	Quantifizierung der Intensität von Proteinbanden
Microsoft Excel	Erstellung von Tabellen und Grafiken
Microsoft PowerPoint	Erstellung von Abbildungen
R Studio (x64 4.0.3)	Statistische Auswertung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Zellen der Zelllinie S2-007 wurden im Zellkulturmedium DMEM mit 5 % FBS kultiviert. Zellen der Zelllinie BON1 und deren Abkömmlinge wurden im Zellkulturmedium DMEM/F-12 mit 10 % FBS und 2,5 mL Gentamicin [Konzentration 50 mg/ L] kultiviert. Die Zellen wuchsen optimal bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO_2-Gehalt von 5 %. Wenn eine 80%ige Bedeckung des Bodens mit Zellen erreicht war, wurden die Zellen geteilt. Dazu erfolgte ein einmaliges Waschen mit 10 mL (T75-Flasche) bzw. 5 mL PBS (T25-Flasche) und eine 5-minütige Trypsinierung bei 37 °C mit 3 mL (T75-Flasche) bzw. 1 mL (T25-Flasche) Trypsin. Anschließend wurde die gewünschte Menge des Zellkulturmediums hinzugegeben und die benötigte Menge der Zellen wurde nach Resuspendierung in eine neue Kulturflasche überführt. In diese wurden je nach Flaschengröße 12 mL (T75-Flasche) oder 7 mL (T25-Flasche) des entsprechenden Mediums vorgelegt.

2.2.1.2 Zellzählung mittels Zählkammer nach Neubauer und Aussaat von Zellen

Die Zellzählung dient der gleichmäßigen Aussaat von Zellen. Nach der Zellteilung wurde die gewünschte Menge trypsinierter Zellsuspension je nach Dichte im Verhältnis 1:1 bis 1:4 mit Zellkulturmedium verdünnt. Aus der verdünnten Zellsuspension wurden 9 µL in eine Neubauer Zählkammer pipettiert, wodurch mit Hilfe des Rasters die durchschnittliche Zellzahl in einem Milliliter der Lösung berechnet werden konnte. Dafür wurden die Zellen in den 4 großen Eckquadraten gezählt, die jeweils ein Volumen von 0,1 µL ($1\ \mathrm{mm} \cdot 1\ \mathrm{mm} \cdot 0{,}1\ \mathrm{mm}$) fassen. Daraus wurde der Durchschnitt gebildet und dieser mit 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro 1 mL zu bestimmen. Anschließend wurde die Menge der benötigten Suspension berechnet (Zielzellzahl gesamt/ gezählte Zellzahl pro 1 mL) und entsprechend mit Zellkulturmedium auf eine Menge von 10 mL verdünnt. Für BON1-Zellen betrug die Zielzellzahl 100.000 bzw. 120.000 Zellen pro mL und S2-007-Zellen wurden in einer Dichte von 60.000 bzw. 80.000 Zellen pro mL ausgesät. Dazu wurden in eine Vertiefung einer 6 well-Platte zu 2 mL Zellkulturmedium 1 mL der Zellsuspension hinzugegeben oder alternativ zu 10 mL Zellkulturmedium in einer 10 cm-Schale 5 mL der Zellsuspension hinzugefügt.

2.2.1.3 Probengewinnung

Die Proben wurden je nach Art des Wachstumsbehältnisses in einem oder mehreren Schritten gewonnen. Beim Wachstum auf einer 6 well-Platte wurden die Zellen mit 500 µL Trypsin vom

Boden gelöst und in ein 2 mL-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen 3 min bei 8.000 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen.

Die Zellen einer 10 cm-Schale wurden zunächst in ca. 5 mL Medium mit einer Pipettenspitze gelöst und in ein 15 mL Falcon überführt. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 2.500 rpm wurde das überschüssige Zellkulturmedium abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde in 1 mL PBS gelöst und anschließend in einem 2 mL-Röhrchen erneut für 3 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt.

Nach der Gewinnung des Zellpellets konnten die Proben bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.2 Gewinnung von Klonen mit *PLAC8*-Knockout

2.2.2.1 Transfektion via PEI

Transfektion beschreibt den Prozess des Einbringens von genetischem Fremdmaterial in eukaryotische Zellen. Die hier verwendete stabile Transfektion hat zum Ziel, dass fremde DNA in Form eines Plasmids dauerhaft in das Zielgenom integriert wird. Das kationische stark verzweigte Polymer Polyethylenimin (PEI) bildet Komplexe mit der negativ geladenen exogenen DNA. Dadurch wird die Fremd-DNA in einem positiven Partikel gebunden und kann an negativ geladene Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche binden. So kann die DNA über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Zellen am Vortag in drei verschiedenen Konzentrationen mit 2 mL Zellkulturmedium in 6 well-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde eine der drei Zellkonzentrationen gewählt, bei der sich die Zellen idealerweise in der log-Phase ihres Wachstums befinden. Pro zu transfizierender Zellkultur wurden 4 µL PEI mit jeweils 100 µL Zellkulturmedium ohne Zusätze in einem low binding-Röhrchen gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden jeweils 800 ng von den Plasmiden mit der Guide-RNA und der Antibiotikumresistenzkassette in einem weiteren low binding-Röhrchen mit 100 µL Zellkulturmedium ohne Zusätze vermengt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Inhalte der Röhrchen zusammengeführt und für weitere 20 min inkubiert. In dieser Zeit findet die Komplexierung von PEI mit der Nukleinsäure statt. Anschließend wurde das gesamte Volumen auf die Zellaussaat vom Vortag gegeben, die zu 30 % mit Zellen bedeckt waren.

2.2.2.2 CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung

Zur Genom-Editierung mittels Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /Cas9 wurde das human gene knockout Kit verwendet. Für einen erfolgreichen Gen-Knockout müssen zwei Plasmide gleichzeitig in die Zellen eingebracht werden. Das erste Plasmid kodiert für die Guide-RNA und die Endonuklease Cas9. Die Guide-RNA dient der Markierung und bindet spezifisch am 5'-Ende des offenen Leserahmens (ORF) von *PLAC8* und Cas9 verursacht drei Basenpaare upstream vom PAM-Motiv entfernt einen Doppelstrangbruch der DNA. Zur Reparatur des Doppelstrangbruchs mittels homologer Rekombination wird ein zweites Plasmid benötigt. Dieses Plasmid enthält eine Resistenzkassette gegen ein Antibiotikum, das für die spätere Selektion notwendig ist. Die Kassette wird von einem rechten (RHA) und einem linken homologen Arm (LHA) flankiert (siehe Abb. 1). Die homologen Arme sind komplementär zu den Sequenzen an den enzymatisch zerschnittenen Enden (blunt ends) des Zielgens *PLAC8*, sodass der Doppelstrangbruch durch homologe Rekombination repariert werden kann. Zudem ist ein Stoppsignal in Form einer Poly-A-Sequenz innerhalb der Resistenzkassette integriert, was zum Transkriptionsabbruch und somit zu einem Knockout von *PLAC8* auf RNA- und Proteinebene führt (Jinek et al. 2012).

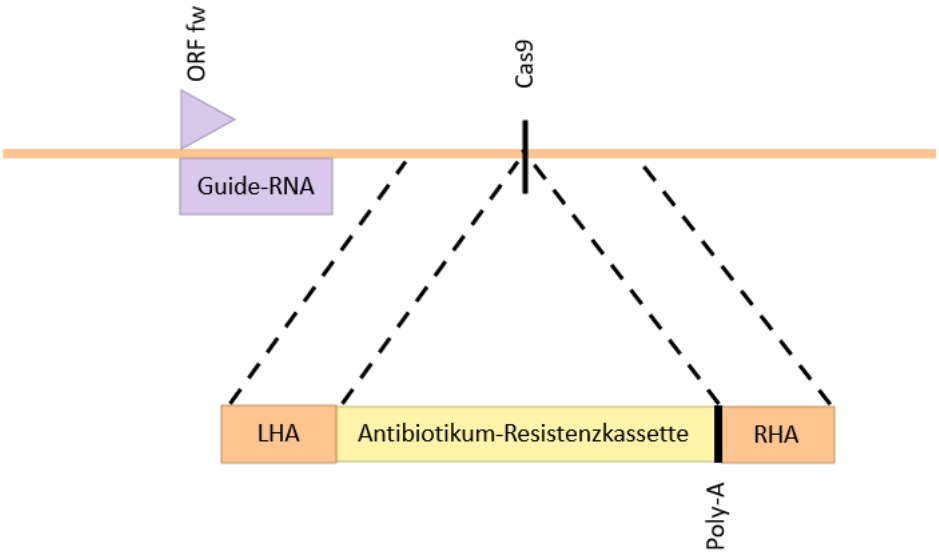


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 durch homologe Rekombination (eigene Abbildung)

Dargestellt ist ein Teil der Sequenz *PLAC8* zu Beginn des offenen Leserahmens (ORF), der durch den Primer ORF fw markiert wird. Dort befindet sich zudem die Bindungsstelle für die Guide-RNA zur Markierung für das Enzym Cas9. Dieses Enzym schneidet an einer vorgesehenen Schnittstelle (Cas9). Hier entsteht ein Doppelstrangbruch, an dem eine Resistenzkassette eingefügt werden kann, die von einem RHA und einem LHA (rechter und linker homologer Arm) flankiert wird. Am Ende der Resistenzkassette befindet sich eine Poly-A-Sequenz, die zum Abbruch des Transkripts und damit zum *PLAC8*-Knockout führt.

Wenn das Resistenz-vermittelnde Plasmid nicht aufgenommen wurde oder inkorrekt integriert wurde, wird die Zelle einen Doppelstrangbruch alternativ mit nicht-homologer Rekombination reparieren (non-homologous end joining). Dabei werden die freien DNA-Enden zusammengefügt, ohne dass eine DNA-Sequenz als Vorlage dient. Die nicht-homologe Rekombination ist stark fehleranfällig, da sie zu Insertionen oder Deletionen führen kann. Diese waren hier nicht erwünscht. In den Zellen der Zelllinie BON1 wird *PLAC8* auf zwei Allelen exprimiert (Kuhl 2019). Für einen vollständigen *PLAC8*-Knockout müssen die *PLAC8*-Sequenzen auf beiden Allelen detektiert und ersetzt werden. Wenn ein Knockout auf lediglich einem Allel erfolgreich wäre, würden die Zellen die Selektion zwar überleben, doch wäre *PLAC8* in den darauffolgenden quantitativen Assays weiterhin nachweisbar. Ein vollständiger Knockout wäre erst dann erreicht, wenn *PLAC8* auf keinem der Allele mehr nachweisbar wäre.

Zusätzlich zu den o.g. Plasmiden wurde im Rahmen eines Rescue-Versuchs ein drittes Plasmid mit einem alternativen *PLAC8*-Konstrukt in die Zellen transfiziert. Dieses Konstrukt wurde an einem zufälligen Ort im Genom integriert. Mit diesem Plasmid konnte neben dem *PLAC8*-Knockout überprüft werden, ob die Zellen mit veränderten Varianten von *PLAC8* überleben konnten. Die Veränderungen betrafen das Fehlen von Exon 2 und eine Verkürzung der UTR. Zur Selektion enthielt das Plasmid eine Resistenzkassette gegen ein weiteres Antibiotikum.

Die Plasmide wurden mit PEI nach dem Protokoll 2.2.2.1 in die Zellen transfiziert. Dazu wurden jeweils 800 ng der drei Plasmide (Guide-RNA/Cas9-Plasmid, Resistenz-Plasmid und *PLAC8*-Plasmid) miteinander vermengt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zu dem Ansatz von PEI gegeben und weitere 20 min inkubiert.

Nachdem das Zellkulturmedium am letzten Tag der Transfektion gewechselt wurde, erfolgte am nächsten Tag die Aussaat auf 10 cm-Schalen. Zunächst wurden die Zellen mit 3 mL PBS gewaschen und 5 min in 1 mL Trypsin abgelöst. Von der entstandenen Zelllösung wurden 4 mL; 2 mL; 1 mL; 0,5 mL und 0,25 mL abgenommen und auf eine Menge von 10 mL mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Dadurch konnten die Konzentrationen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 ausgesät werden. Am kommenden Tag wurden die Zellen das erste Mal mit dem Selektionsmedium aus 10 mL Zellkulturmedium und den Selektionsantibiotika behandelt. Unter weiterer Beobachtung wurde etwa alle drei Tage das Selektionsmedium gewechselt, bis die gewünschte Größe einzelner Klone erreicht war.

2.2.2.3 Gewinnung von Proben der Klone

Sobald die Zellkolonien makroskopisch sichtbar waren und sie eine ausreichende Größe erreicht hatten, wurden die Kolonien einzeln gepickt. Sie wurden mit einer 2 mL-Pipette in eine 6 well-

Platte überführt, in der in jeder Vertiefung 2 mL Zellkulturmedium vorgelegt war. Bei 20%iger Konfluenz des Klons wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,5 mL Trypsin abgelöst. Anschließend wurden sie in eine T25-Flasche mit 7 mL Zellkulturmedium überführt. Bei erneuter 20%iger Bedeckung des Bodens erfolgte die Ablösung der Zellen in 1,8 mL PBS mit einem Zellschaber. 1,5 mL der Zelllösung wurde in einem Röhrchen 3 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abgenommen, sodass das verbliebene Pellet bei -20°C eingefroren werden konnte. Die in der T25-Flasche verbliebene Zelllösung konnte zur weiteren Kultivierung mit Zellkulturmedium aufgefüllt werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolation

RNA wurde mithilfe des peqGOLD Total RNA Kits aus Zellproben gewonnen. Die Lösungen Lysepuffer, Waschpuffer und das RNAse-freie Wasser waren gemeinsam mit der DNA-Removing-Säule und der PerfectBind-RNA-Säule im Kit enthalten.

Zunächst wurden 350 µL Lysepuffer auf die bei -20 °C gelagerte Zellprobe gegeben. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Suspension in die DNA-Removing-Säule gefüllt und anschließend 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde entfernt, sodass 350 µL 70%iges Ethanol zum Durchfluss gegeben werden konnte. Diese Lösung wurde auf die PerfectBind-RNA-Säule pipettiert und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt wurde RNA ab einer Länge von 200 Nukleotiden an die Säule gebunden. Danach wurden 500 µL Waschpuffer auf die Säule gegeben und 30 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zugabe von 600 µL 80%igem Ethanol wurde erneut 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Durch die Überführung der Säule in ein neues Röhrchen, konnte die RNA bei 12.000 rpm für 2 min getrocknet werden. Zur Lösung der RNA aus der Säule wurde je nach Probengröße etwa 50 µL RNAse-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Probe für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Im Anschluss an die Isolation konnte die Konzentration der RNA [ng/µL] mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 bestimmt und die Probe bei -80 °C gelagert werden.

2.2.3.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) aus isolierter RNA erfolgte mit dem Omniscript RT Kit, in dem destilliertes Wasser, 10x Puffer, dNTPs, Oligo(dT)-Primer und Reverse Transkriptase enthalten waren. Der Puffer schafft optimale Bedingungen für die Reaktion. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die anhand eines RNA-Strangs die cDNA synthetisieren kann. Dafür werden Primer benötigt, die aus kurzen DNA-

Abschnitten bestehen und an die RNA binden. Die Oligo(dT)-Primer binden an den Poly-A-Schwanz der RNA und dienen als Bindungsstelle für die reverse Transkriptase. Zur Synthese des cDNA-Strangs werden zudem dNTPs benötigt, aus denen sich die cDNA zusammensetzt.

Aus diesen Komponenten wurde je nach Anzahl der Proben ein Mastermix mit einem Endvolumen von 5,9 µL pro Probe hergestellt (siehe Tab. 14).

Tabelle 14: Ansatz für die cDNA-Synthese

Reagenzien	Menge für eine Probe
Destilliertes Wasser	1,0 µL
10x Puffer	2,0 µL
dNTPs (5 mM)	2,0 µL
Oligo(dT)-Primer	0,4 µL
Reverse Transkriptase	0,5 µL
RNA	500 ng bzw. 1000 ng
Aqua dest	Ad 20 µL

Aus der Konzentrationsbestimmung mit dem Spektralphotometer NanoDrop wurde das Volumen der RNA-Proben berechnet, das 500 ng oder 1000 ng RNA enthält. Der fertige Ansatz aus Mastermix und RNA wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von bestimmten Genabschnitten innerhalb einer DNA-Sequenz. Nach einer Denaturierung der DNA bei 96 °C wird die Probe auf 55 – 65 °C abgekühlt, damit die Primer an die DNA binden können. Die Primer fw und rev begrenzen den Zielgenabschnitt für die Replikation. Anschließend wird bei einer Temperatur von 72 °C der komplementäre DNA-Strang von der Polymerase synthetisiert. Dieser Zyklus wiederholt sich für die Anzahl der gewählten Durchgänge. Das Verhältnis zwischen Spezifität der Primerbindung und Produktausbeute kann durch eine TouchDown-Strategie optimiert werden. Bei diesem Verfahren wird die Temperatur nach der Denaturierung in jedem Zyklus um 0,5 °C verringert, sodass in frühen Zyklen eine hohe Spezifität und in späten Zyklen dagegen eine hohe Effizienz der Amplifikation erreicht wird.

Die PCR kann nach der Isolation von RNA und anschließender DNA-Gewinnung durchgeführt werden. Zunächst wurde die cDNA im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Dann wurde ein PCR-Ansatz mit dem Endvolumen von 24 µL pro Probe angesetzt (siehe Tab. 15). Hier wurde die

Dream Taq-Polymerase verwendet, die eine höhere Empfindlichkeit besitzt und größere Erträge bringt als die herkömmliche Taq-Polymerase.

Tabelle 15: Anleitung für den Mastermix für die PCR

Mastermix	Menge für eine Probe
Dream Taq	12,5 µL
Primer fw [0,1 µM]	1,0 µL
Primer rev [0,1 µM]	1,0 µL
Destilliertes Wasser	24,0 µL

Für jede Probe wurden 1 µL DNA und 24 µL des Mastermixes in ein PCR-Röhrchen überführt und im Anschluss wurde eine PCR nach der TouchDown65-Strategie (bis 65 °C) mit dem T100 Thermal Cycler durchgeführt.

In jedem Durchlauf wurden zusätzlich zu dem behandelten Replikat eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und ein unbehandeltes Replikat ohne DNA mitgeführt und parallel untersucht.

2.2.3.4 quantitative Polymerasekettenreaktion

Mit der Reverse-Transkriptase-quantitativen-PCR (RT-qPCR) wird die Menge von definierten RNA-Sequenzen ermittelt. Dieses Verfahren beschreibt eine Kombination aus der reversen Transkription und einer qPCR. Die reverse Transkription wird im Kapitel der cDNA-Synthese erläutert. Die cDNA ist eine direkte Abschrift einer bestimmten RNA-Sequenz und enthält daher im Gegensatz zur DNA keine Introns. Durch begrenzende Primer wird der zu amplifizierende cDNA-Abschnitt definiert. Mit dieser Methode können über die Amplifikation der cDNA Rückschlüsse auf die RNA-Expression gezogen werden (Saiki et al. 1985). Zur Detektion der cDNA wird der Farbstoff SYBR Green verwendet, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert und durch das 7500 Fast Realtime-PCR System detektiert werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz ist äquivalent zu der vorhandenen cDNA-Menge. Die Lichtemission wird nach jedem Amplifikationszyklus ermittelt. Die Zeit zum Erreichen eines bestimmten Schwellenwerts wird gemessen und in Form des Cycle-Threshold-Wertes (C_t-Wert) wiedergegeben. Bei einer geringen cDNA-Menge werden mehr Amplifikationszyklen benötigt, um die definierte Leuchtintensität zu erreichen. Der C_t-Wert wird größer. Umgekehrt führt eine hohe Genexpression zu einem schnellen Erreichen des Schwellenwerts und zu einem kleinen C_t-Wert.

Wie in Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, wurde RNA aus Proben isoliert und anschließend mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Vor der weiteren Verwendung wurde die cDNA im Verhältnis 1:50 verdünnt. Für jeden verwendeten Primer wurde ein Mastermix mit

dem Endvolumen von 15 µL angemischt (Mengenangaben siehe Tab. 16). Die Messung fand als Doppelbestimmung und mit einer Wasserkontrolle statt.

Tabelle 16: Anleitung für den Mastermix für die qPCR

Mastermix	Menge für eine Probe
SYBR Green	10,0 µL
Destilliertes Wasser	4,6 µL
Primer fw [10 µM]	0,2 µL
Primer rev [10 µM]	0,2 µL

Es wurden 15 µL des Mastermixes zusammen mit 5 µL der verdünnten cDNA in eine Vertiefung einer 96 well-Platte pipettiert und mit dem MicroAmp Optical Adhesive Film verschlossen, um Verschmutzungen zu vermeiden. Die Testung wurde im 7500 Fast Realtime-PCR System durchgeführt.

Da eine reine Bestimmung der Gen-Expression sehr fehleranfällig für Pipettierungenauigkeiten wäre, hat sich die Normierung auf ein Housekeeping Gen etabliert, welches stetig von der Zelle exprimiert wird. In diesem Fall wird das *RPLP0*-Gen verwendet. Dafür wurden die gemessenen C_t-Werte zueinander in Bezug gesetzt und der ΔC_t-Wert wurde gebildet ($\Delta C_t = C_{t_{Zielgen}} - C_{t_{Referenzgen}}$). Zur Veranschaulichung ließen sich die Ergebnisse im Rahmen der relativen Expression vergleichen ($\text{realtive Expression} = 2^{-\Delta C_t}$). Hier sprach ein hoher Wert für eine starke Expression des Zielgens in den Zellen und ein geringer Wert für eine geringe Expression des Zielgens. Die Wasserprobe diente dazu, Verunreinigungen der Reagenzien auszuschließen.

2.2.3.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient der Erstellung von DNA-Fragmenten, welche für die Klonierung notwendige spezifische Schnittstellen enthalten. Restriktionsenzyme schneiden hierbei an individuell spezifischen palindromischen Basenabfolgen.

Im Rahmen des Restriktionsverdaus wurde aus den Proben aus Kapitel 2.2.3.3 die Hälfte entnommen (ca. 12 µL) und in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wurde zu den entnommenen Proben 1 µL eines Restriktionsenzyms hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4 °C gelagert oder weiterverarbeitet.

2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt. Dieser Mechanismus lässt sich durch die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA erklären, die bei

einer angelegten Spannung zur Anode wandern. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann sie durch das Gel laufen. Die Darstellung der DNA-Fragmente erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff HD Green, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert und unter UV-Einstrahlung Photonen emittiert.

Für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1,5%iges Agarosegel gegossen. Dafür wurden 1,5 g Agarose und 100 mL TAE-Puffer aufgekocht. Nach einigen Minuten wurden 1,8 µL des Fluoreszenzfarbstoffs HD Green hinzugegeben und das Gel konnte aushärten. Zur Beladung des Gels musste dieses im EasyPhor-Gerät vollständig mit TAE-Puffer bedeckt sein. In die erste Tasche wurden 7 µL des GeneRulers 100 base pairs (bp) DNA Ladder als Standard aufgetragen. In die weiteren Taschen wurden je 12 µL des unverdauten und des verdauten Replikats gefüllt. Zudem wurde bei jedem Durchgang eine Positivkontrolle und als Negativkontrolle eine Probe ohne DNA mitgeführt. Das Agarosegel wurde bei 130 Volt ca. 45 min laufen gelassen. Anschließend erfolgte die Darstellung der Banden mit dem Gel Imager. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm – 520 nm wurde der in der DNA interkalierte Fluoreszenzfarbstoff sichtbar.

2.2.3.7 Isolation genomischer DNA

Bei der Genom-Editierung wurde eine Guide-RNA verwendet, sodass das Enzym Cas9 die DNA an einer bestimmten Stelle zerschneiden konnte. Dafür band die Guide-RNA an einer spezifischen Bindungsstelle. Für die zweite Genom-Editierung wurde erneut eine Guide-RNA verwendet. Daher wurde überprüft, ob die Bindungsstelle für die Guide-RNA 1 noch unbeschadet war. Die Überprüfung erfolgte anhand von genomischer DNA, die zur Eurofins Genomics GmbH eingeschickt wurde.

Dafür wurde zunächst RNA aus den Klonen gewonnen und in cDNA umgeschrieben. In der darauffolgenden PCR wurde die cDNA amplifiziert. Die Temperaturen und Anzahl der Zyklen richtete sich dabei nach den Angaben des Protokolls von der Eurofins Genomics GmbH. Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese nach dem Protokoll des Unternehmens Qiagen. Die DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und weiterverarbeitet. Dazu wurde die Probe im Agarosegel zunächst mit dem zur Verfügung gestellten Puffer zur Stabilisierung der Nukleinsäuren lysiert und anschließend auf die QIAamp Membran pipettiert. Nach der Zentrifugation wurde Alkohol zum Überstand hinzugegeben und auf die QIAamp spin Säule überführt. Der Waschpuffer entfernt verbleibende Unreinheiten und Salze. Die DNA wurde mit Wasser eluiert und mit einer Konzentration von 1-2 µg/µl zur Sequenzierung zu Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Germany) geschickt.

2.2.4 Proteinanalytische Methoden

2.2.4.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte aus 6 well-Platten oder aus 10 cm-Schalen.

Bei der Extraktion aus 6 well-Platten wurden die Zellen mit dem Zellschaber in 1 mL PBS abgelöst und in ein 1,5 mL-Röhrchen überführt. Anschließend wurde 3 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und der flüssige Überstand wurde abgenommen. Zur Aufbewahrung wurden die Gesamtproteinextrakte bei -20 °C eingefroren.

Zur Extraktion der Zellen aus 10 cm-Schalen wurden die Zellen in 5 mL Zellkulturmedium mechanisch abgelöst. Die Suspension wurde 3 min bei 2.500 rpm zentrifugiert, sodass das gewonnene Pellet in 1 mL PBS gelöst werden konnte. Diese Suspension wurde wiederum 3 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und die Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wird die Gesamtproteinkonzentration einer Zellprobe photometrisch ermittelt. Die Bestimmung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau von 465 nm zu 595 nm, wenn dieser an Proteine bindet.

Zur Vorbereitung wurden je nach Größe des Pellets 50 µL – 120 µL Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (1:100) auf die gefrorene Probe gegeben. Bei der Detektion von phosphorylierten Proteinen mussten zusätzlich Phosphataseinhibitoren hinzugegeben werden. Während der Lyse wurde die Probe 20 min auf Eis inkubiert. Nachdem sich das Pellet gelöst hatte, konnte 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein 1,5 mL-Röhrchen überführt werden.

Für die Proteinbestimmung wurde zu Beginn eine BSA-Standardreihe in Doppelbestimmung angelegt. Dafür wurden in die Vertiefungen A – G der ersten und zweiten Spalte einer 96 well-Platte 200 µL eines Mastermixes aus 2,8 mL Coomassie-Brilliant-Blau und 28 µL Lysepuffer pipettiert. Anschließend konnte in die Vertiefungen B – G aufsteigend in 1 µL-Schritten BSA hinzugegeben werden. Für jede zu bestimmende Probe wurden 200 µL Coomassie-Brilliant-Blau in eine Vertiefung pipettiert und 1 oder 2 µL der Probe beigefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 10 min unter Ausschluss von Licht wurde der Farbumschlag der Proben und damit die Proteinkonzentration mit dem Centro LB960 Luminometer gemessen.

Je nach Menge des hinzugegebenen Lysepuffers wurde die Probe pro 100 µL Lysepuffer mit 14 µL DTT und 32 µL SDS versetzt. Im Anschluss konnte mit dem Western Blot fortgefahren oder die Proben bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.4.3 Western Blot

Die Methodik des Western Blots besteht aus der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, dem Blotting Vorgang, der Antikörperbehandlung, der Darstellung mittels ChemoCam und der Darstellung der Ladekontrolle β-Aktin. Durch die Gelelektrophorese werden Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine durch das Anlegen einer Spannung auf eine Membran übertragen, damit auf dieser der Nachweis verschiedener Proteine möglich ist (Burnette 1981).

Anfangs wurde in dem EasyPhor Gießstand ein Polyacrylamidgel (10 %, 12,5 % oder 15 % je nach Größe der Proteine) bestehend aus Stoppgel, Trenngel und Sammelgel gegossen (siehe Tab. 3). Nach etwa einer Stunde der Aushärtung konnte die EasyPhor Elektrophoresekammer aufgebaut werden, sodass deren Elektroden mit Laufpuffer bedeckt waren. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgekocht und somit die Proteine denaturiert. Anschließend wurden die Taschen des Gels mit 20 µg (alternativ 10 µg, 15 µg oder 25 µg) Protein befüllt. Die Volumina dafür konnten der Proteinbestimmung entnommen werden. Die erste Tasche wurde stets mit 5 µL des Standards PageRuler Prestained Protein Ladder beladen. Nach vollständiger Beladung wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt, bis sich die Proben weit genug aufgetrennt hatten.

Für den Blotting Vorgang wurde die Blotting Kammer Mini Trans-Blot Cell aufgebaut. Dafür wurde die Kassette mit Blotting Puffer (siehe Tab. 3) bedeckt und anschließend im Blotting Puffer liegend befüllt. Das Gel wurde in der Kassette auf einem Schwamm und zwei Filterpapieren platziert. Auf das Gel wurde die Blotting Membran (Nitrocellulosemembran oder PVDF-Membran nach der Aktivierung in Methanol) gelegt und Luftblasen wurden vorsichtig ausgestrichen. Abschließend wurden wieder zwei Filterpapiere und ein Schwamm in der Kassette positioniert. Nach korrekter Positiv-/ Negativausrichtung in der Blotting Kammer konnten die Proteine bei 300 mA im Blotting Puffer vom Gel auf die Membran übertragen werden. Die Dauer richtete sich dabei nach der Größe der Proteine (1 min pro 1 kDa).

Nach dem Abschluss des Blotting Vorgangs begann die Behandlung mit verschiedenen Antikörpern. Zunächst wurde die Membran mindestens zwei Stunden in 10 mL 5%iger Magermilch geblockt, wodurch freie Bindungsstellen von unspezifischen Proteinen blockiert wurden. Bei in BSA-gelösten Antikörpern konnte alternativ eine 5%ige BSA-Lösung verwendet werden. Danach wurde der Primärantikörper des zu detektierenden Proteins hinzugegeben und

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran viermal für 10 min in Tris-buffered saline mit Tween20 (TBS-T) gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Im Anschluss wurde ein Sekundärantikörper (rabbit- oder mouse-Antikörper) für eine Stunde hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase, HRP) gekoppelt. Für die Darstellung der Proteinbanden wurde pro Membran 500 µL ECL Plus oder ECL Ultra (250 µL Clarity Western Substrat und 250 µL Clarity Western) aufgetragen und für zwei Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Das gekoppelte Enzym HRP katalysiert die Chemolumineszenzreaktion von Luminol, das in Form von ECL-Substrat hinzugegeben wird. Das emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm kann durch den X-ray Film der ChemoCam in Form von Banden sichtbar gemacht werden. Die Belichtung in der ChemoCam erfolgte je nach Intensität der Proteinbanden 5 sek bis zu 4 min. Zur Ermittlung der Proteingröße wurde der Standard dargestellt und in die Aufnahme eingefügt.

Nach erfolgreicher Abbildung der Banden konnte mit TBS-T gewaschen und bei 4 °C über Nacht mit dem β-Aktinantikörper inkubiert werden. Der Antikörper wurde ebenfalls in 5%iger Magermilch gelöst und dient zur Normalisierung der Banden auf ein Housekeeping Protein. Da β-Aktin gleichmäßig in den Zellen vorhanden ist, kann es als Referenzprotein verwendet werden. Der abschließende Schritt beinhaltete die Entwicklung des Referenzproteins mittels ChemoCam (ECL Plus, 1 min Belichtung).

Die Quantifizierung der Zielprotein- und β-Aktinbanden erfolgte im Anschluss mit dem Programm ImageJ. Dafür wurden die Intensitäten der Banden der Antikörper jeweils auf die Intensitäten der Aktinbanden normiert. Die berechneten Werte gaben Aufschluss über die Zielproteinmengen in den untersuchten Proben.

2.2.5 MTT-Assay

Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid-Assay (MTT) ist eine Möglichkeit die Zellviabilität anhand der metabolischen Aktivität von Zellen zu bestimmen. Die Methodik beruht auf der Metabolisierung des gelben Farbstoffes zu violettem Formazan. Dieser Farbumschlag kann mit dem Centro LB960 Luminometer gemessen werden. Der Assay diente der Untersuchung der Zellviabilität 72 Stunden nach Behandlung mit dem *CIP2A*-Inhibitor TD52.

Zu Beginn der Untersuchung wurden die Zellen mit 100 µL MTT behandelt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen je nach Intensität der Färbung in 200 – 400 µL Solubilization Solution für 5 min gelöst. Von jeder Probe konnten

50 – 200 µL in einer 96 well-Platte im Centro LB960 Luminometer bei 597/620 nm gemessen werden. Ein hoher Wert sprach für eine intensive Färbung und eine hohe Zellviabilität.

2.2.6 Etablierung der *CIP2A*-Inhibition mit TD52

Zunächst wurden 60.000 Zellen der Zelllinie S2-007 und 120.000 Zellen der Zelllinie BON1 ausgesät und kultviert. Nach 24 Stunden wurde der *CIP2A*-Inhibitor TD52 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die Zielkonzentrationen betrugen 2 µM, 5 µM, 7,5 µM und 10 µM TD52. Zusätzlich gab es eine Kontrolle mit 3 µL DMSO und eine Kontrolle ohne Behandlung (hier: Wasser). Der Inhibitor TD52 wurde in DMSO gelöst, sodass das Volumen von 3 µL DMSO dem DMSO-Volumen in dem Replikat mit der höchsten TD52-Konzentration (10 µM) entsprach. So konnte eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel ausgeschlossen werden.

Die Behandlung mit dem Inhibitor wurde 72 Stunden nach der Zugabe von TD52 durch Entfernung des Zellkulturmediums beendet. Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt und das Ergebnis im Centro LB960 Luminometer visualisiert. Die Farbintensität gab Aufschluss über die Zellviabilität. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Farbintensität der Kontrollprobe mit DMSO auf 100 % gesetzt. Bei den anderen Replikaten wurde der prozentuale Anteil der viablen Zellen anteilig von der Kontrollprobe bestimmt.

Für die Vorbereitung der qPCR wurde aus den mit TD52-behandelten Zellen die RNA isoliert und in cDNA überführt. Im Anschluss erfolgte die qPCR. Pro Zellzyklusmodulator wurden behandelte und unbehandelte Replikate im Duplikat verglichen. Für jeden Modulator wurde ein eigener Mastermix mit dem entsprechenden Primerpaar angelegt (z.B. CIP2A fw und CIP2A rev zur Untersuchung von *CIP2A*). Zusätzlich wurden zweimal Wasser als Negativkontrolle mitgeführt, um potenzielle Verunreinigungen zu detektieren. Für jedes Replikat wurde das Referenzgen RPLP0 mit den dazugehörigen Primern als Doppelbestimmung untersucht (siehe Tab. 17).

Tabelle 17: Pipettierschema für die qPCR

Zelllinie / Primer	S2-007 unbehandelt	S2-007 behandelt	BON1 unbehandelt	BON1 behandelt	Wasser
CIP2A Mastermix	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○
PP2A Mastermix	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○
Cyclin D Mastermix	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○
RPLP0 Mastermix	○	○	○	○	○
	○	○	○	○	○

Die Probeverteilung erfolgte nach dem Pipettierschema (siehe Tab. 17). Durch die Zugabe des SYBR Greens zum Mastermix konnte die amplifizierte Menge der DNA im 7500 Fast Realtime-PCR System sichtbar gemacht werden. Als Ergebnis der qPCR wurde der C_t-Wert jeder Probe ausgegeben und im Anschluss auf das Referenzgen RPLP0 normiert.

Für die Untersuchung der Proteinexpression der Zellzyklusmodulatoren wurden zunächst 60.000 BON1-Zellen und 120.000 S2-007-Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden 7,5 µM des *CIP2A*-Inhibitors TD52 hinzugegeben und weitere 72 Stunden später konnten die Proben in Form eines Zellpellets gewonnen werden. Anschließend wurde die Proteinmenge in den Proben mit der Proteinbestimmung nach Bradford gemessen 2.2.4.2. Im Anschluss erfolgte der eigentliche Western Blot. In der Auswertung wurde die Intensität der Banden mit dem Programm ImageJ erfasst. Die Intensität der Proben wurden in Bezug zu der Intensität der Aktinbanden gesetzt. Durch die daraus berechneten Werte wurde die Proteinmenge der behandelten und der unbehandelten Probe zueinander in Bezug gesetzt. Eine dickere Bande sprach für eine stärkere Expression des untersuchten Proteins und eine dünnere Bande zeigte eine schwächere Expression an. So wurde im Vergleich zu dem unbehandelten Replikat in dem mit TD52 behandelten Replikat eine Herauf- oder Herunterregulation der Proteinexpression deutlich.

2.2.7 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit R Studio (x64 4.0.3). Zum Vergleich der Kontroll- und der Interventionsgruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0{,}05$ festgesetzt. Die statistische Signifikanz p wird in Abbildungen mit Hilfe von „*“ dargestellt (* $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$).

3. Ergebnisse

3.1 *PLAC8*-Knockout und Integration von E1Δ2 und E2Δ2

Wie in vorangegangenen Arbeiten der AG Buchholz beschrieben, scheinen sowohl BON1-Zellen als auch S2-007-Zellen die Expression der *PLAC8*-RNA zur Proliferation zu benötigen, nicht jedoch das Protein PLAC8 (Kuhl 2019, Stark 2022). Zudem wurde in S2-007-Zellen beobachtet, dass bei einigen Klonen eine Spleißvariante von *PLAC8* existiert, die kein Exon 2 enthält. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Exon 2 nicht proteinkodierend ist oder von den Zellen nicht zwangsläufig benötigt wird. Außerdem konnten in den S2-007-Klonen verschiedene Endpunkte innerhalb des Volllängengens *PLAC8* nachgewiesen werden. Das lässt ebenfalls die Vermutung zu, dass die Genabschnitte downstream von Ende 1 bzw. Ende 2 für die Zellviabilität nicht relevant sind (Stark 2022). Zur Überprüfung dieser Hypothesen sollte zunächst ein *PLAC8*-Knockout erfolgen. Das Ziel der nachfolgenden Transfektion ist die stabile Integration eines alternativen *PLAC8*-Konstrukts. So sollte untersucht werden, welche Sequenzen des Volllängenkonstrukts *PLAC8* benötigt werden oder ob spezifische Abschnitte der RNA zur Proliferation der Zellen ausreichen. In dieser Arbeit wurde der Fokus besonders auf Exon 2 und die beiden Endpunkte Ende 1 und Ende 2 gelegt.

Zur Transfektion der Klone wurde PEI eingesetzt, das die Endozytose der Plasmide in die Zellen ermöglicht. Eine Guide-RNA markiert die DNA-Sequenz, an der das Enzym Cas9 die DNA zerschneiden soll. In diesem Fall wurde der Genabschnitt *PLAC8* selektiert, an dessen Schnittstelle eine Kassette mit einer Antibiotikumresistenz eingesetzt werden kann. Die verwendeten *PLAC8*-Alternativen enthielten eine weitere Antibiotikumresistenz und konnten an einer beliebigen Stelle in das Genom eingefügt werden. Durch die anschließende Selektion konnten lediglich die Zellen überleben, die beide Antibiotikaresistenzen integriert hatten. Dafür mussten beide Plasmide stabil im Genom eingebaut und exprimiert werden. Die BON1-Zellen enthalten zwei *PLAC8*-exprimierende Allele. Bei einem *PLAC8*-Knockout auf einem der Allele, wären die Zellen resistent gegen die Selektionsantibiotika, doch wäre das endogene *PLAC8* weiterhin nachweisbar. Erst bei einem vollständigen *PLAC8*-Knockout auf beiden Allelen könnten nur die exogenen *PLAC8*-Konstrukte detektiert werden.

3.1.1 Rescue-Versuch mit E1Δ2 und E2Δ2

Um zu überprüfen, ob die Zelllinie BON1 auf Exon 2 von *PLAC8* angewiesen ist, wurde in einem Rescue-Versuch das endogene *PLAC8* ausgeknockt und je ein exogenes *PLAC8*-Konstrukt ohne Exon 2 in die Zellen eingebracht. Es wurden mittels PEI drei Plasmide in die Zellen transfiziert.

Dazu gehörten das Plasmid, was die Guide-RNA 2 und das Cas9-Enzym enthielt, das Plasmid mit der Antibiotikumresistenz gegen Puromycin und das Plasmid mit dem alternativen *PLAC8*-Konstrukt. Die Plasmide Ende 1 delta Exon 2 (E1Δ2) und Ende 2 delta Exon 2 (E2Δ2), die anstelle von *PLAC8* in das Genom integriert werden sollten, bestanden aus Exon 1 bis Exon 5 des *PLAC8*-Volllängenkonstrukts (flc) mit Ausnahme des Exons 2. E1Δ2 endete an einer Poly-A-Sequenz innerhalb von Exon 5 und E2Δ2 endete bei einer Poly-A-Sequenz am Ende von Exon 5. Damit war E1Δ2 mit 618 bp etwa 119 bp kürzer als das 737 bp lange E2Δ2 (siehe Abb. 2). Die alternativen Konstrukte enthielten eine Neomycinresistenz, welche Resistenz gegenüber G418 (Geneticin) vermittelt. So konnte nach der Transfektion und der Genom-Editierung mit CRIPSR/Cas9 die Selektion mit Puromycin und G418 erfolgen, bis Zellkolonien makroskopisch sichtbar waren.

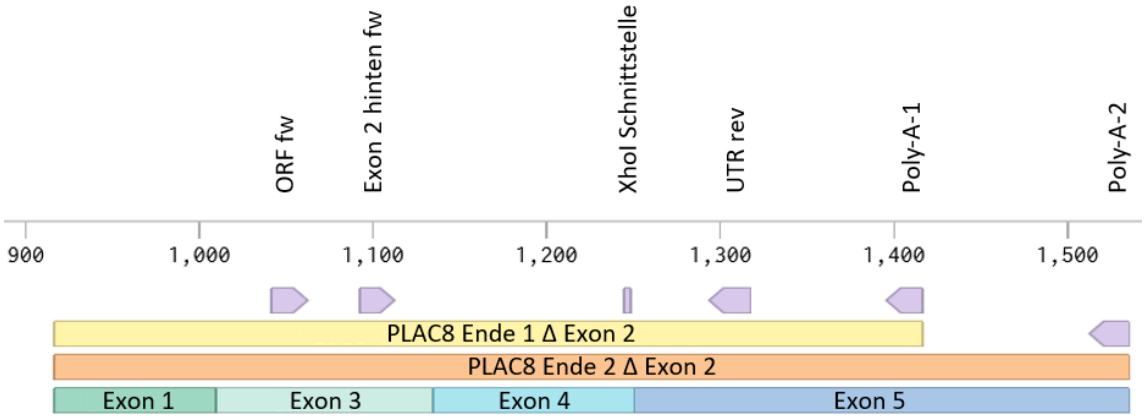


Abbildung 2: Schematische Darstellung der in BON1-Zellen transfizierten Konstrukte E1Δ2 und E2Δ2 (eigene Abbildung)

Bei *PLAC8* Ende 1 delta Exon 2 (E1Δ2) und *PLAC8* Ende 2 delta Exon 2 (E2Δ2) handelt es sich um veränderte Varianten von *PLAC8* mit vier Exons. Beide Varianten enthalten nur noch die Exons 1, 3, 4 und 5 und exprimieren nicht mehr Exon 2. Das Transkript E1Δ2 endet an einer Poly-A-Sequenz, die innerhalb von Exon 5 liegt und E2Δ2 endet an einer Poly-A-Sequenz am Ende von Exon 5. Zusätzlich sind die Bindungsstellen für die Primer ORF fw, Exon 2 hinten fw und UTR rev dargestellt. XhoI markiert die Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI, anhand dessen die erfolgreiche Integration eines der Konstrukte überprüft werden konnte.

3.1.2 Die Klone E1Δ2 und E2Δ2 enthalten weiterhin endogenes *PLAC8*

Durch die Testung sollten die Klone detektiert werden, die das exogene alternative *PLAC8*-Konstrukt E1Δ2 oder E2Δ2 enthielten. Dabei sollten drei Gruppen differenziert werden. Sie lassen sich einteilen in die Klone, die das alternative Konstrukt nicht integriert haben und weiterhin nur das endogene *PLAC8* exprimieren, die Klone, die beide Varianten exprimieren und schließlich die, die das alternative *PLAC8*-Konstrukt aufgenommen haben und kein endogenes *PLAC8* mehr enthalten. Mischvarianten aus endogener und exogener PLAC8 Expression können durch einen erfolgreichen *PLAC8*-Knockout auf nur einem Allel entstehen. Die Klone, die nur das endogene *PLAC8* enthielten, wurden verworfen.

Aus den Zellkulturen der Klone wurde zu Beginn die RNA extrahiert und in cDNA umgewandelt. Zum Nachweis der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 wurden in der darauffolgenden PCR die Primer ORF fw und UTR rev verwendet. ORF fw lag innerhalb von Exon 3 von *PLAC8* und UTR rev lag innerhalb von Exon 5 (siehe Abb. 2). Bei Klonen, die eine oder mehrere der *PLAC8*-Varianten stabil exprimierten, müsste die Sequenz von 276 bp zwischen ORF fw und UTR rev in der PCR amplifiziert werden.

Der enzymatische Verdau erfolgte mit dem Restriktionsenzym XhoI. Anschließend erfolgte die bildliche Darstellung der Ergebnisse anhand der Agarose-Gelelektrophorese. Die XhoI-Schnittstelle befindet sich in den Konstrukten E1Δ2 und E2Δ2 innerhalb von Exon 4 (siehe Abb. 2). Im endogenen *PLAC8* ist diese Schnittstelle nicht vorhanden, wodurch die Klone mit dem integrierten *PLAC8*-Konstrukt sichtbar gemacht werden können. Dazu wurde zunächst der Genabschnitt zwischen ORF fw und UTR rev mit der PCR vervielfältigt. Durch den Schneidevorgang mit dem Enzym XhoI entstanden bei den Klonen mit dem alternativen *PLAC8*-Konstrukt zwei Banden. Die Sequenzen zwischen ORF fw und XhoI und zwischen XhoI und UTR rev sind 202 bp und 74 bp lang. Bei den Klonen ohne die Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 ist die Schnittstelle nicht integriert und so war in der Gelelektrophorese nur eine Bande von 276 bp zwischen ORF fw und UTR rev sichtbar. Als Positivkontrolle wurde das Volllängenkonstrukt von *PLAC8* mitgeführt, das ebenfalls die Schnittstelle XhoI enthält. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte BON1-Zellen mit endogenem *PLAC8* und eine Wasserprobe verwendet. Die BON1-Zellen galten als Referenz für das endogene *PLAC8*.

Die Gelelektrophorese zeigte bei den meisten Klonen eine Bande von 276 bp. Das bedeutet, dass das endogene *PLAC8* weiterhin exprimiert wurde. Lediglich bei elf Klonen ließ sich eine schwache zweite Bande erkennen. Die unverdaute Bande wurde jeweils als Referenz mitgeführt und zeigte die unzerschnittene Gensequenz von 276 bp zwischen ORF fw und UTR rev. Zur weiteren Abklärung wurden die Klone 1.14 und 1.16 ausgewählt, bei denen das Konstrukt E1Δ2 nachgewiesen wurde. Die Klone 2.13, 2.14 und 2.16 mit dem Konstrukt E2Δ2 wurden ebenfalls zur weiteren Untersuchung ausgewählt. In diesen Klonen zeigte sich neben der Bande von 276 bp eine zweite Bande mit einer Länge von 202 bp und eine dritte Bande mit einer Länge von 74 bp. Das Vorhandensein von den Banden mit 202 bp und 74 bp zeigt, dass das Restriktionsenzym XhoI schneiden konnte und die Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 in die Zellen aufgenommen wurden. Die prominente Bande von 276 bp zeigt, dass das endogene *PLAC8* weiterhin im Genom exprimiert wird. Möglicherweise waren die exogenen Konstrukte und das Resistenzplasmid demnach nur auf einem Allel der Zellen exprimiert. Es müssen Plasmide mit den Resistenzen gegen Puromycin und G418 vorhanden gewesen sein, da die Zellen die

Selektion mit den Antibiotika sonst nicht überstanden hätten. Insgesamt konnten keine reinen Klone mit der alternativen *PLAC8*-Sequenz erzeugt werden, sondern es entstanden lediglich Klone, die beide Varianten enthielten.

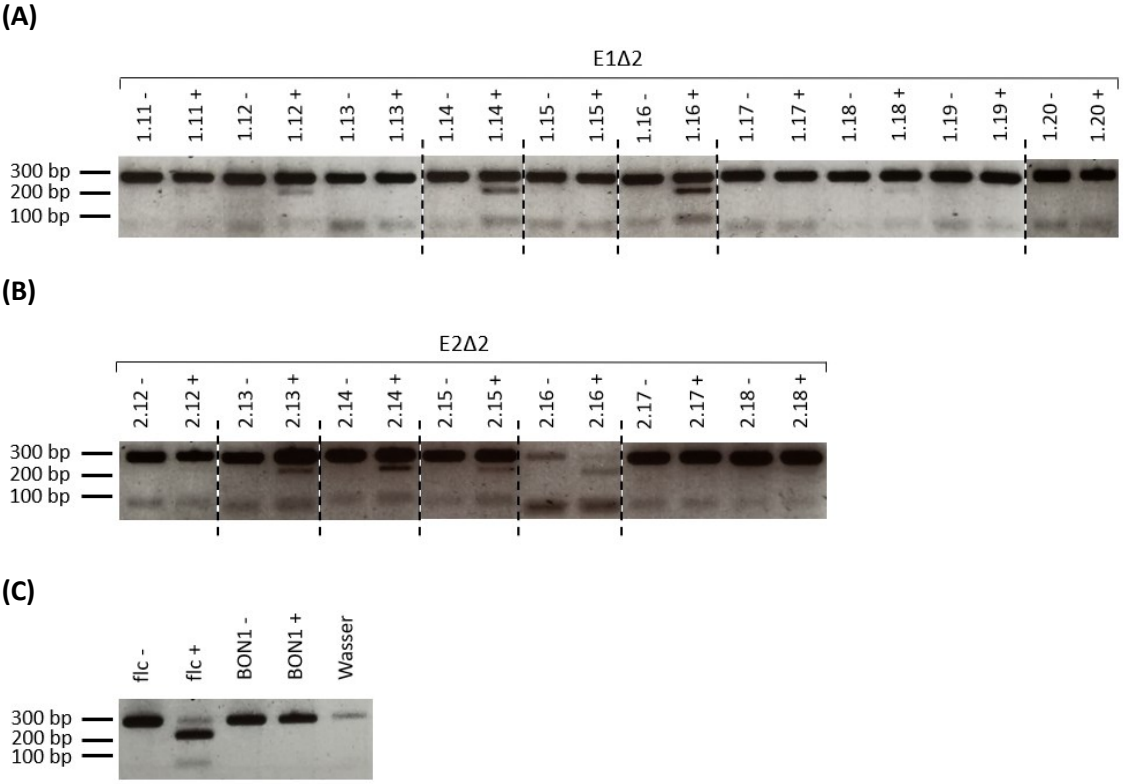


Abbildung 3: Gelelektrophorese zur Überprüfung der Integration der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 bei ausgewählten Klonen

Die Integration des exogenen *PLAC8*s in Form von E1Δ2 oder E2Δ2 wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden die Primer ORF fw und UTR rev eingesetzt und es sind nebeneinander die unverdauten (-) und verdauten (+) Proben gezeigt. Erwartete Größe bei den verdauten Proben: 202 bp und 74 bp. Zur Kontrolle wurden das Volllängenkonstrukt (flc), BON1-Zellen und eine Wasserprobe eingesetzt. **(A)** Beispielhaft Klone E1Δ2 11 bis 20 **(B)** E2Δ2 12 bis 18 **(C)** Kontrollen.

Anschließend wurde mit den Klonen 1.14, 1.16, 2.13, 2.14 und 2.16 weitergearbeitet. Sie hatten die exogenen Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 stabil im Genom integriert. Im weiteren Vorgehen sollte erneut ein vollständiger *PLAC8*-Knockout des ursprünglichen *PLAC8* versucht werden.

3.1.3 Überprüfung auf Störungen der Zielsequenzen der Guide-RNA

Für einen erneuten Versuch des vollständigen *PLAC8*-Knockouts sollte die Transfektion der Plasmide und anschließend der Genom-Editierung mit CRISPR/Cas9 erfolgen. Da die Bindungsstelle der Guide-RNA 2 aus der ersten Genom-Editierung bereits zerstört war, musste die Gensequenz für die Guide-RNA 1 auf Störungen überprüft werden. Dafür wurde aus den Klonen genomische DNA isoliert und eine erste PCR mit den Primern PLAC8 neu fw und PLAC8 neu rev durchgeführt, die die Gensequenz *PLAC8* begrenzen. In einer zweiten PCR wurden die

Primer LHA fw und RHA rev verwendet. Diese Primer binden upstream von LHA und downstream von RHA, sodass *PLAC8* und die begrenzenden homologen Arme amplifiziert wurden. Anschließend wurde mit der DNA eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, sodass die Gensequenz zwischen LHA fw und RHA rev als Banden dargestellt werden konnte. Bei Klon 2.16 war die Bande so schwach ausgeprägt, dass er verworfen wurde (Abb. 3). Die Proben wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Germany) sequenziert.

Der Vergleich der Klone 1.14, 1.16, 2.13 und 2.14 mit der Sequenz des *PLAC8*-Volllängenkonstrukts lässt eine Aussage über die Intaktheit der Bindungssequenz für die Guide-RNA 1 zu. Bei Klon 1.14 waren lediglich wenige Basenpaare innerhalb der Primer deletiert und die Bindungsstelle der Guide-RNA 1 blieb intakt, weshalb der Klon weiterhin verwendet werden konnte. In der Sequenz von Klon 1.16 waren große Teile verändert und die Bindungsstelle der Guide-RNA 1 war größtenteils deletiert. Daher musste dieser Klon aus weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Die relevanten Sequenzen der Klone 2.13 und 2.14 zwischen den Primern waren vollständig erhalten, sodass sie für weitere Versuche verwendet werden konnten. Demnach wurde bei den Klonen 1.14, 2.13 und 2.14 im weiteren Vorgehen ein erneuter *PLAC8*-Knockout versucht.

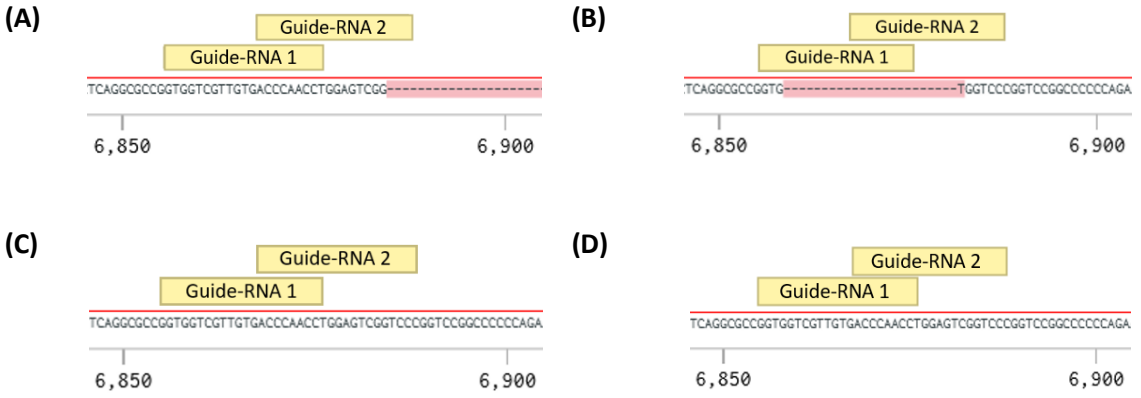


Abbildung 4: Überprüfung der Zielsequenzen für die Guide-RNA 1 und 2

In dem Labor der Eurofins Genomics GmbH wurden die Klone E1Δ2 14 und 16 und die Klone E2Δ2 13 und 14 sequenziert. Dadurch konnten die Guide-RNA 1 und 2 zwischen 6.850 bp und 6.900 bp als Bindungsstellen für die Guide-RNA 1 bzw. 2 überprüft werden. Die rote Markierung zeigt an, dass die Sequenz im Vergleich zur Ursprungssequenz verändert ist und die Guide-RNA nicht binden kann. **(A)** E1Δ2 14. **(B)** E1Δ2 16. **(C)** E2Δ2 13. **(D)** E2Δ2 14.

3.1.4 Erneuter *PLAC8*-Knockout nach Integration der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2

Das Ziel des nächsten Schrittes ist ein erneuter *PLAC8*-Knockout der Klone, die bereits eins der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 integriert hatten. Dafür wurden die Klone 1.14, 2.13 und 2.14 verwendet. Der Knockout erfolgte als Kotransfektion mit der Guide-RNA 1, dem Enzym Cas9 und

der Resistenzkassette gegen Blasticidin. Plasmide, die für das exogene *PLAC8* kodieren, wurden nicht mehr benötigt, da diese bereits von den Klonen exprimiert wurden. Da die Bindungsstellen für die Guide-RNA 1 mit der Sequenzierung überprüft wurden, wurde sie anstelle der Guide-RNA 2 verwendet. Beim zweiten Knockout-Versuch wurde eine Resistenz gegen Blasticidin eingesetzt, da die erzeugten Klone bereits gegen Puromycin und G418 resistent waren.

3.1.5 E1Δ2 oder E1Δ2 können *PLAC8* nicht ersetzen

Die Selektion mit Blasticidin wurde fortgeführt, bis makroskopisch sichtbare Zellhaufen gewachsen waren. Wie in vorherigen Versuchen wurde aus den Zellen RNA und anschließend cDNA extrahiert. Im Anschluss daran wurde eine PCR mit den Primern ORF fw und UTR rev durchgeführt. ORF fw befindet sich innerhalb von Exon 3 von *PLAC8* und somit innerhalb der Konstrukte E1Δ2 und E2Δ2. UTR rev liegt innerhalb von Exon 5. Da die Klone bereits die Konstrukte integriert hatten, wird von einer starken Amplifizierung der Sequenz ausgegangen. Der Verdau erfolgte mit dem Enzym XhoI. Zur Darstellung der Sequenzen wurde die Agarose-Gelelektrophorese gewählt. Nach der ersten Genom-Editierung zeigten sich Klone, die sowohl das endogene *PLAC8* in Form einer einzelnen 276 bp langen Sequenz als auch eins der alternativen Konstrukte enthalten, sichtbar durch zwei kurze Fragmente. Bei einem vollständigen *PLAC8*-Knockout sollen die beiden Banden von 202 bp und 74 bp Länge vorherrschend sein. Das spricht dafür, dass die Konstrukte anstelle von *PLAC8* auf beiden Allelen integriert sind. Als direkte Referenz wurden ein verdautes und ein unverdautes Replikat parallel aufgetragen. Das verdaute Volllängenkonstrukt diente als Positivkontrolle und unbehandelte BON1-Zellen dienten als Negativkontrolle.

Die Klone der zweiten Genom-Editierung E1Δ2 14.1 bis 10, E2Δ2 13.1 bis 4 und E1Δ2 14.1 bis 7 zeigten alle eine Bande von 276 bp Länge. Bei einigen Klonen waren zusätzlich die beiden kürzeren Banden zu erkennen (siehe Abb. 5, Klon E2Δ2 13.4). Somit exprimierten alle überprüften Klone neben dem exogenen *PLAC8*-Konstrukt weiterhin das endogene *PLAC8*. Einige Klone zeigten keine kurze Bande mehr, was bedeutet, dass das *PLAC8*-Konstrukt nicht mehr integriert war (Beispiel Klon E2Δ2 13.3). Die Versuche zeigen, dass es selbst nach mehreren Durchläufen nicht möglich ist, das endogene *PLAC8* durch die Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 zu ersetzen. Auf mindestens einem Allel wird bei den überlebenden Zellen weiterhin das ursprüngliche *PLAC8* exprimiert. Die Selektionen wurden vermutlich durch die zufällige Integration der Resistenzkassetten überlebt, aber nicht durch eine Integration innerhalb des *PLAC8*-Gens. Insgesamt konnten auch nach der zweiten Transfektion keine Klone identifiziert werden, die nur eines der *PLAC8*-Konstrukte exprimierten.

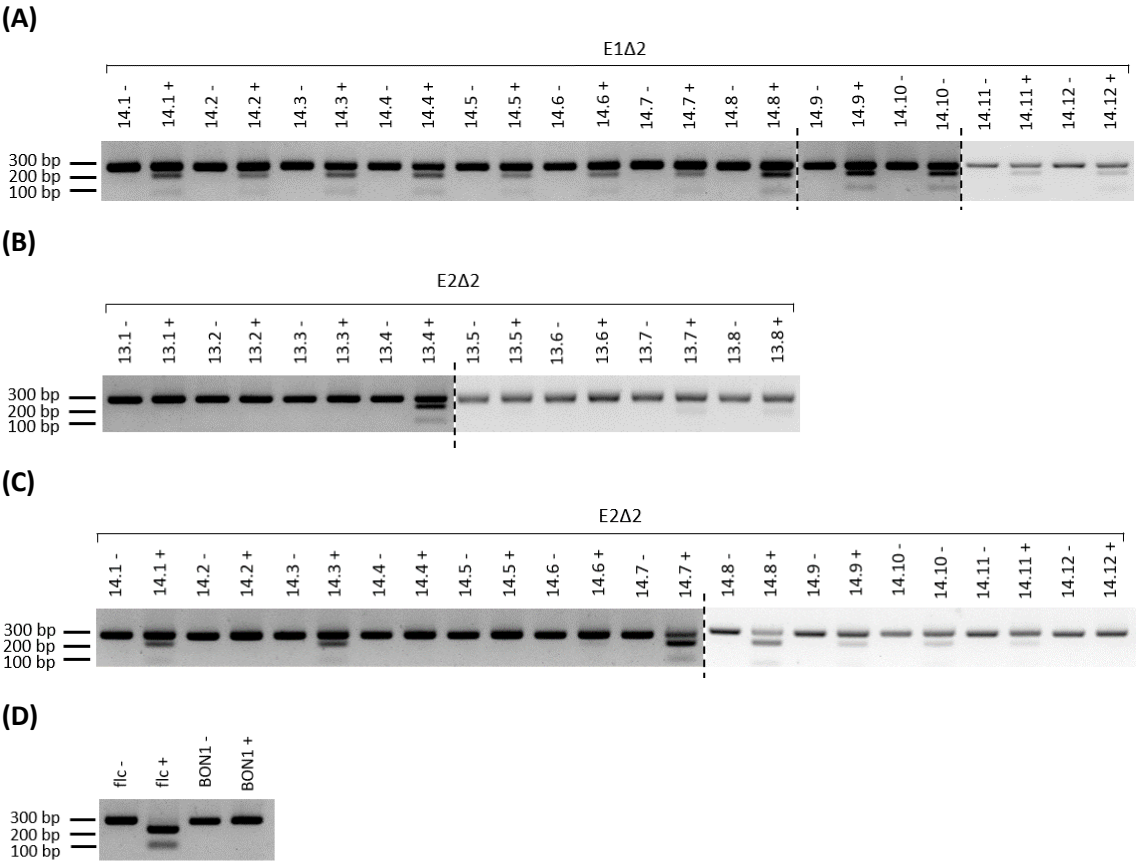


Abbildung 5: Überprüfung des zweiten *PLAC8*-Knockout-Versuchs

Der Knockout des endogenen *PLAC8s* wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden die Primer ORF fw und UTR rev eingesetzt und es sind nebeneinander die unverdauten (-) und verdauten (+) Proben gezeigt. Erwartete Größe bei den verdauten Proben: 202 bp und 74 bp. Zur Kontrolle wurden das Volllängenkonstrukt (flc) und BON1-Zellen eingesetzt. **(A)** Klone E1Δ2 14.1 bis 14.12 als Abkömmlinge von E1Δ2 14 **(B)** Klone E2Δ2 13.1 bis 13.8 als Abkömmlinge von E2Δ2 13 **(C)** Klone E2Δ2 14.1 bis 14.12 als Abkömmlinge von E2Δ2 14 **(D)** Kontrollen.

3.1.6 Das Blasticidinresistenzgen wurde erfolgreich ins Genom integriert

Um eine fehlerhafte Selektion auszuschließen, wurde abschließend die Blasticidin-Resistenz in den Klonen nachgewiesen. Dafür wurde eine PCR mit den Primern Blasticidin fw und Blasticidin rev durchgeführt, die die Blasticidin-Resistenzkassette begrenzen. Da die Klone die Selektion überlebt haben, wurde eine hohe Expression der Gensequenz zwischen den Primern erwartet. Die Ergebnisse wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Als direkte Kontrolle wurden die Klone E1Δ2 14, E2Δ2 13 und 14 des ersten PLAC8-Knockout-Durchlaufs verwendet, die nicht mit einer Blasticidin-Resistenzkassette transfiziert wurden.

Bei einigen repräsentativen Klonen des zweiten Durchlaufs war, im Gegensatz zu den Kontrollklonen E1Δ2 14, sowie E2Δ2 13 und 14, eine Bande zu sehen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Klone die Resistenzkassette integriert hatten und die Selektion mit Blasticidin erfolgreich

war. Es lag eine ausreichend hohe Konzentration des Antibiotikums zur Selektion vor. Die schwächeren Banden am Unterrand des Agarosegels zeigten sehr kurze unspezifische Primerbindungen oder -reste mit Sequenzen <100 bp und waren damit für die Ergebnisse nicht von Relevanz. Bei E1Δ2 14.1 waren wahrscheinlich keine Sequenzen <100 bp zu sehen, da die Primer mehrheitlich an das amplifizierte Gen gebunden haben. Das Vorhandensein von endogenem *PLAC8* kann demnach nicht auf eine misslungene Selektion mit Blasticidin zurückgeführt werden.

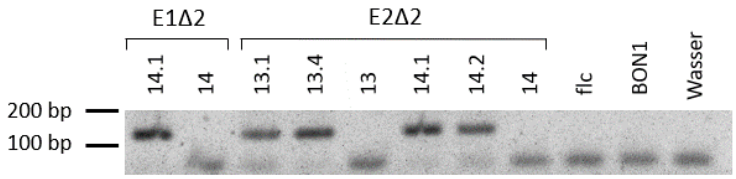


Abbildung 6: Überprüfung der erfolgreichen Integration der Blasticidinresistenz

Die Integration der Blasticidin-Resistenzkassette wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es sind die Klone E1Δ2 14 und 14.1, E2Δ2 13, 13.1 und 13.4 und E2Δ2 14, 14.1 und 14.2 dargestellt. Es wurden die Primer Blasticidin fw und rev eingesetzt. Zur direkten Kontrolle wurden die Klone E1Δ2 14, E2Δ2 13 und 14 eingesetzt. Das Volllängenkonstrukt (flc), BON1-Zellen und eine Wasserprobe (Kontrolle) dienten als Kontrollen.

3.2 *PLAC8*-Knockout und Integration von E1Nae und E2Nae

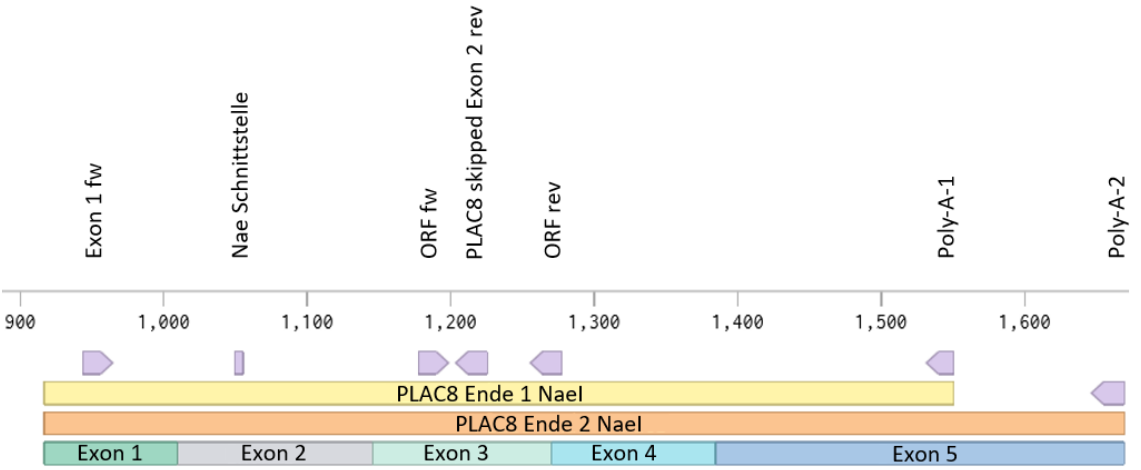
3.2.1 Rescue-Versuch mit E1Nae und E2Nae

Die Konstrukte E1Δ2 und E2Δ2 konnten nicht in BON1 Zellen integriert werden und sind nicht für einen Rescue der *PLAC8*-Funktion geeignet. In den vorangegangenen Versuchen wurde die künstlich erzeugte Schnittstelle XhoI benötigt, um rekombinante von endogenen mRNA-Varianten zu unterscheiden. Im Folgenden sollte ausgeschlossen werden, dass die XhoI-Schnittstelle die Integration oder Funktion der Konstrukte E1Δ2 und E2Δ2 negativ beeinflusst. Daher wurden bei den kommenden Versuchen zwei alternative *PLAC8*-Konstrukte gewählt, die die Schnittstelle NaeI anstelle von XhoI integriert hatten. NaeI liegt innerhalb von Exon 2, was im Gegensatz zu den Konstrukten E1Δ2 und E2Δ2 bei den Konstrukten Ende 1 Nae (E1Nae) und Ende 2 Nae (E2Nae) enthalten ist. Wie in Vorarbeiten der AG Buchholz bereits gezeigt wurde, ist Exon 2 von *PLAC8* sehr variabel und ist in einigen Klonen der Zelllinie S2-007 nach CRISPR/Cas-Editing in unterschiedlich stark verkürzten Varianten vorhanden (Stark 2022). Daher ist davon auszugehen, dass die Schnittstelle NaeI innerhalb von Exon 2 die Zellen nicht beeinflusst.

Es wurde eine Kotransfektion mit der Guide-RNA 2 und dem Enzym Cas9, einer Puromycin-Resistenzkassette und den Konstrukten E1Nae oder E2Nae mit der Resistenz gegen Zeocin durchgeführt. Die Konstrukte E1Nae und E2Nae bestehen jeweils aus Exon 1 bis 5. E1Nae endet

an einer Poly-A-Sequenz innerhalb von Exon 5 und E2Nae endet am Ende von Exon 5 mit einer Poly-A-Sequenz analog zu E1Δ2 und E2Δ2 (siehe Abb. 7). Die Selektion erfolgte mit den Antibiotika Zeocin und Puromycin.

(A)



(B)

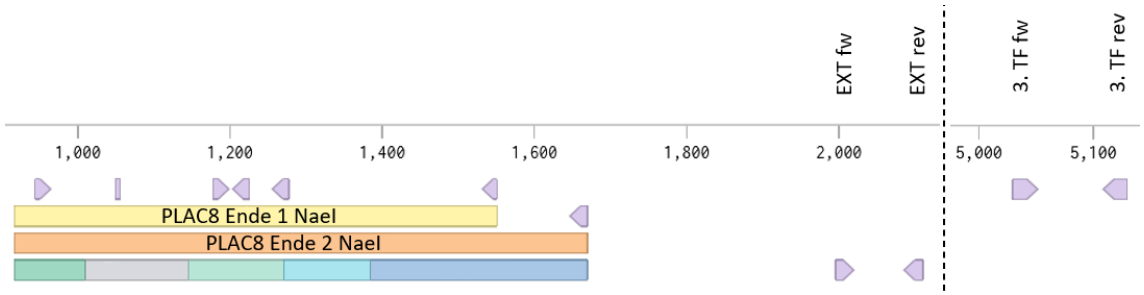


Abbildung 7: Schematische Darstellung der in BON1-Zellen exprimierten Genabschnitte E1Nae und E2Nae (eigene Abbildung)

(A) Bei *PLAC8* Ende 1 NaeI (E1Nae) und *PLAC8* Ende 2 NaeI (E2Nae) handelt es sich um veränderte Varianten von *PLAC8* mit fünf Exons. Beide Varianten enthalten die Schnittstelle NaeI anstelle der Schnittstelle XhoI. E1Nae endet bei einer Poly-A-Sequenz, die innerhalb von Exon 5 liegt und E2Nae endet bei einer Poly-A-Sequenz am Ende von Exon 5. Zusätzlich sind die Bindungsstellen für die Primer Exon 1 fw, ORF fw und rev und *PLAC8* skipped Exon 2 rev dargestellt. NaeI markiert die Schnittstelle für das schneidende Enzym NaeI, anhand dessen die erfolgte Integration eines der Konstrukte überprüft werden konnte. **(B)** Außerhalb von *PLAC8* sind die Bindungsstellen für die Primer EXT fw und rev und 3. TF fw und rev dargestellt.

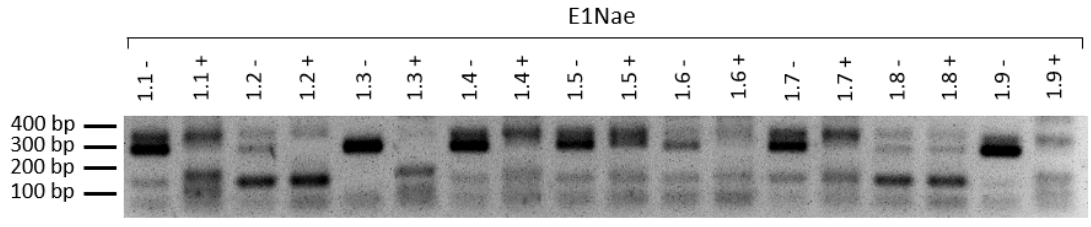
3.2.2 Die Klone E1Nae und E2Nae enthalten weiterhin die *PLAC8*-Sequenz

Die Testung der Klone diente abermals der Detektion von Klonen, die eines der angebotenen alternativen Konstrukte E1Nae oder E2Nae stabil im Genom integriert hatten. Dabei war eine Unterscheidung von Klonen relevant, die nur das exogene *PLAC8* enthielten und von Klonen, die das endogene und das *PLAC8*-Konstrukt exprimierten (siehe Kapitel 3.1.2). Die Amplifizierung erfolgte mit den Primern Exon 1 fw innerhalb von Exon 1 und *PLAC8* skipped Exon 2 rev innerhalb von Exon 3 und ergab einen 282 bp langen Genabschnitt (siehe Abb. 7).

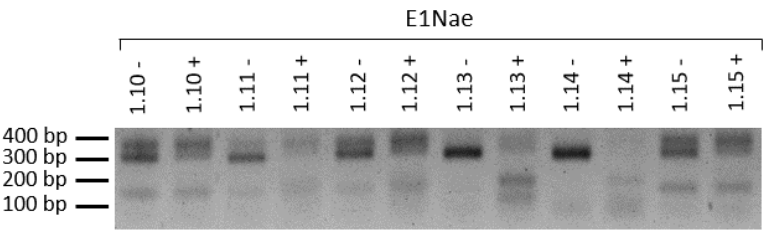
Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau mit dem Enzym NaeI. Dadurch sollte der Erfolg der Integration überprüft werden. Die Schnittstelle für NaeI liegt innerhalb von Exon 2 in den exogenen Konstrukten E1Nae und E2Nae. Da die Schnittstelle innerhalb einer sehr variablen Gensequenz von *PLAC8* liegt, welche vermutlich nicht funktionell entscheidend ist, sollte die NaeI-Schnittstelle die Zellen nicht negativ beeinflussen. In der Agarose-Gelelektrophorese wurde der Vorgang des Restriktionsverdaus bildlich dargestellt. Wenn die Schnittstelle NaeI vorhanden wäre, würden in der Gelelektrophorese zwei Banden sichtbar sein. Die Sequenz zwischen Exon 1 fw und NaeI ist 109 bp lang und die Sequenz zwischen NaeI und *PLAC8* skipped Exon 2 rev ist 173 bp lang. Das Vorhandensein von zwei Banden würde demnach für die Integration eines der exogenen Konstrukte E1Nae oder E2Nae sprechen. Wenn nur eine Bande in der Gelelektrophorese zu sehen wäre, spräche das gegen das Vorhandensein der Schnittstelle NaeI und damit gegen die Integration eines der Konstrukte. Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt E1Nae oder E2Nae verwendet und die Negativkontrollen waren unbehandelte BON1-Zellen und eine Wasserprobe.

In der Gelelektrophorese wurde die unverdaute 282 bp lange Bande jeder Probe als Referenz mitgeführt. Bei den Klonen mit einem negativen Ergebnis war auch in der verdauten Probe nur diese Bande sichtbar. Es wurden die Klone zur Weiterarbeit herausgesucht, bei denen zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 109 bp und 173 bp erkennbar waren. Sie hatten die Schnittstelle für das Enzym NaeI im Genom integriert. Die Klone 1.3, 1.9, 1.11, 1.13 und 1.14 wurden aus der Versuchsreihe mit dem Konstrukt E1Nae gewählt. Aus den Klonen mit dem Konstrukt E2Nae wurden die Klone 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.8, 2.16 und 2.18 zur Weiterarbeit ausgewählt. Bei den Klonen waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine weiterführende Untersuchung vorgenommen.

(A)



(B)



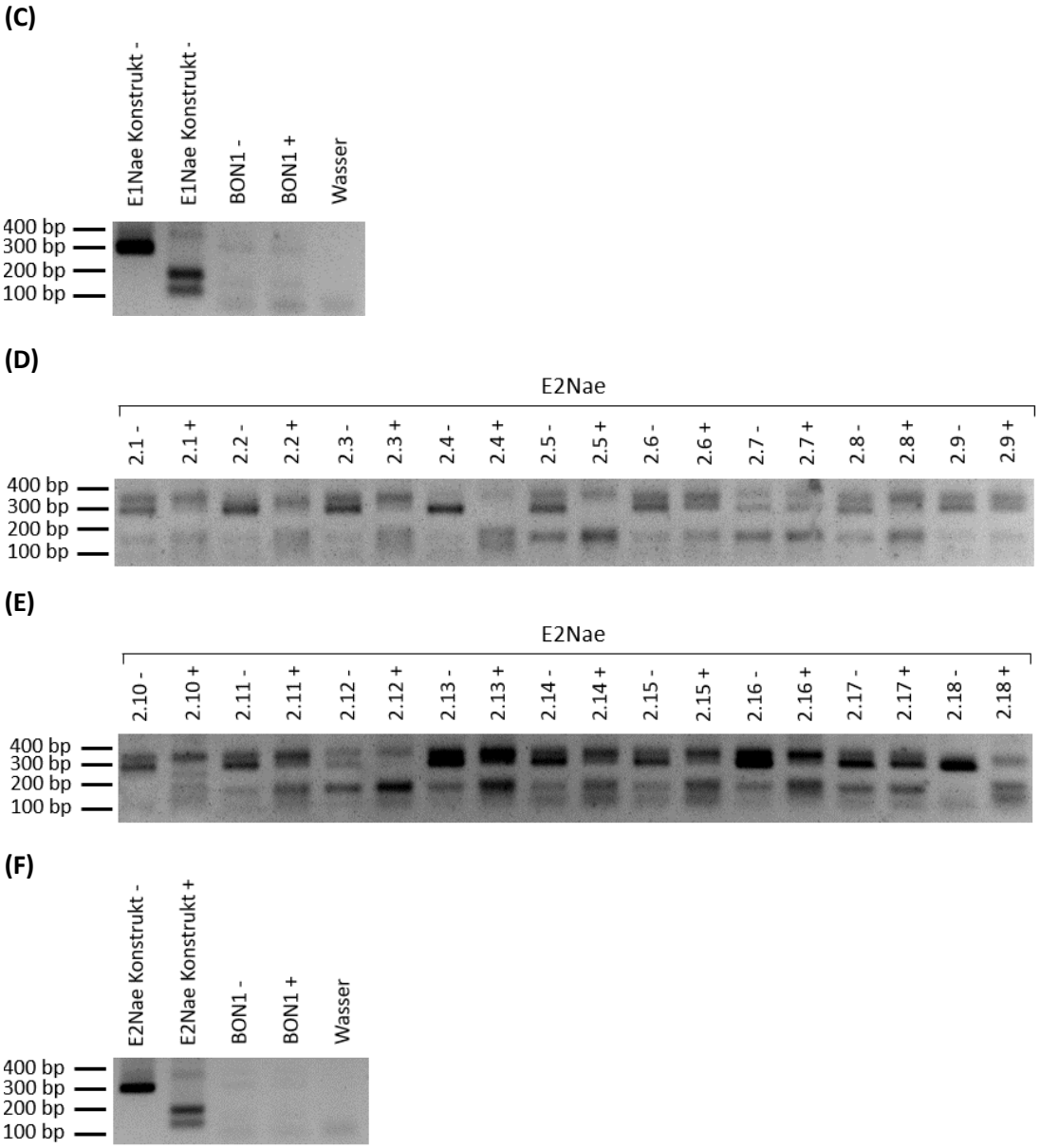


Abbildung 8: Überprüfung der Integration der Konstrukte E1Nae oder E2Nae

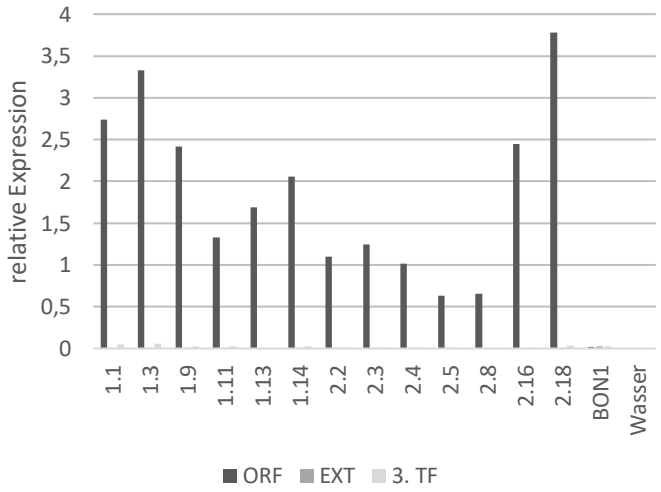
Die Integration des exogenen *PLAC8s* in Form von E1Nae oder E2Nae wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden die Primer Exon 1 fw und *PLAC8* skipped Exon 2 rev eingesetzt und es sind nebeneinander die unverdauten (-) und verdauten (+) Proben gezeigt. Erwartete Größe bei den verdauten Proben: 173 bp und 109 bp. Zur Kontrolle wurden die Konstrukte E1Nae bzw. E2Nae, BON1-Zellen und eine Wasserprobe eingesetzt. **(A)** Klone E1Nae 1 bis 9 **(B)** Klone E1Nae 10 bis 15 **(C)** Kontrollen **(D)** Klone E2Nae 1 bis 9 **(E)** Klone E2Nae 10 bis 18 **(F)** Kontrollen.

Bei den ausgewählten Klonen wurde eine qPCR durchgeführt, um die Expression verschiedener Genabschnitte zu bestimmen. Für die PCR wurden die Primer ORF fw und rev, Extended (EXT) fw und rev und 3. Teilfragment (3. TF) fw und rev verwendet. Die Primer ORF fw und ORF rev liegen innerhalb von den Konstrukten E1Nae und E2Nae in Exon 3 und 4 (1178 bp bis 1277 bp). Eine starke Expression dieses Abschnittes würde daher für das Vorhandensein des Konstruktes sprechen. Bei einem vollständigen *PLAC8*-Knockout dürfte die Gensequenz zwischen EXT fw und

EXT rev nicht mehr exprimiert werden, da sie downstream der Poly-A-Sequenz beider Konstrukte liegt (1996 bp bis 2110 bp). Für die Sequenz zwischen den Primern 3. TF fw und rev wurde eine mittelstarke Expression erwartet. Diese Primer liegen downstream von EXT fw und rev am Ende von *PLAC8*. In der AG Buchholz wurde in vorangegangenen Arbeiten beobachtet, dass bei einer Analyse einige Klone die Transkriptvariante *PLAC8 EndEnd* exprimierten. Hierbei handelt es sich um eine kurze Sequenz, die am Ende des Volllängenkonstrukts *PLAC8* liegt und durch das Primerpaar 3. TF fw und rev abgedeckt wird.

In der qPCR war zu sehen, dass die Gensequenz zwischen den Primern ORF fw und rev exprimiert wurde, was die Expression der Konstrukte E1Nae bzw. E2Nae zeigt. Anhand der Expression zwischen dem Primerpaar EXT fw und rev konnte beobachtet werden, dass die endogene *PLAC8*-RNA vermindert exprimiert wurde. Die Gensequenz zwischen dem Primerpaar 3. TF fw und rev zeigte eine mittelstarke Expression. Es kann festgehalten werden, dass selbst nach diesem Knockout-Versuch weiterhin endogenes PLAC8 exprimiert wurde. Insgesamt konnten nach der Transfektion keine Klone identifiziert werden, in denen das endogene *PLAC8* ausgeknockt wurde und gleichzeitig ein *PLAC8*-Konstrukt exprimiert wird. Im Folgenden sollte ein erneuter *PLAC8*-Knockout durchgeführt werden, nachdem die Konstrukte stabil in den Klonen integriert waren.

(A)



(B)

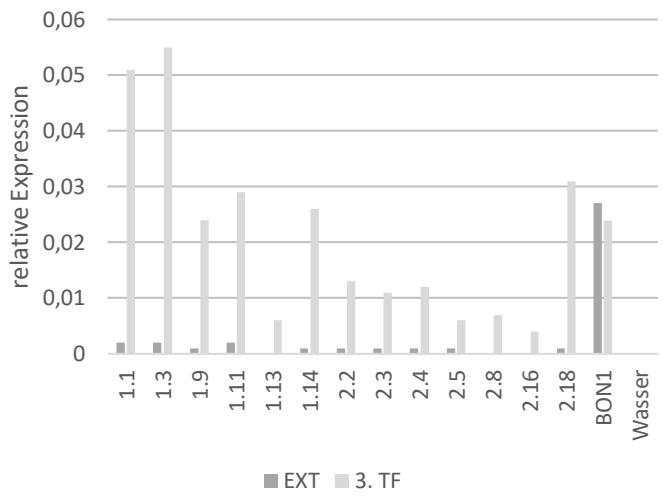


Abbildung 9: Überprüfung der Expression von *PLAC8* mittels qPCR

Die Expression der eingefügten Konstrukte wurde mit einer qPCR überprüft. Es wurden die Primer ORF fw und rev, EXT fw und rev und 3. TF fw und rev eingesetzt. Es sind die Klone E1Nae 1, 3, 9, 11, 13 und 14 und E2Nae 2, 3, 4, 5, 8, 16 und 18 dargestellt. Auf der Vertikalachse ist die relative Expression der Zielgensequenzen abgebildet. Die Expression der Primer in den Nae-Klonen lässt Rückschlüsse auf die Expression von *PLAC8* zu. Zur Kontrolle wurden BON1-Zellen und eine Wasserprobe verwendet. **(A)** ORF, EXT und 3. TF **(B)** Vergrößerte Darstellung von EXT und 3. TF.

3.2.3 Erneuter *PLAC8*-Knockout nach Integration von E1Nae oder E2Nae

Im Folgenden wurde bei den Klonen 1.11, 1.13, 2.4 und 2.16 ein zweiter *PLAC8*-Knockout angestrebt. Diese Klone wurden ausgewählt, da sie sowohl in der Gelelektrophorese als auch in der qPCR eine verminderte Expression von endogenem PLAC8 gezeigt haben. Es wurde mit der Guide-RNA 1, Cas9 und der Blasticidin-Resistenzkassette kotransfiziert. Auf die Plasmide mit den Konstrukten E1Nae und E2Nae konnte verzichtet werden, da diese bereits stabil im Genom integriert waren. Es wurde die Guide-RNA 1 verwendet, weil davon auszugehen war, dass die Bindungsstelle für die Guide-RNA 2 bereits durch den ersten Versuch gestört war. Im Sinne einer Nutzenabwägung wurde keine Sequenzierung wie bei den Δ2-Klonen vorgenommen. Es hatten deutlich mehr Nae-Klone eines der Konstrukte stabil integriert als bei den Δ2-Konstrukten. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass einige der Nae-Klone eine intakte Bindungsstelle für die Guide-RNA 1 besaßen. Die Blasticidin-Resistenz wird von dem RHA und dem LHA flankiert, sodass eine Integration in das Genom an der Schnittstelle von dem Enzym Cas9 vereinfacht wurde.

3.2.4 E1Nae oder E2Nae können *PLAC8* nicht ersetzen

Zur Überprüfung der Klone auf den *PLAC8*-Knockout wurde eine PCR mit den Primern Exon 1 fw und *PLAC8* skipped Exon 2 rev durchgeführt. Die Klone hatten bereits das Konstrukt E1Nae oder E2Nae stabil im Genom integriert, wodurch der Fokus auf dem *PLAC8*-Knockout lag. Der anschließende Verdau erfolgte mit dem Enzym NaeI, welches die 282 bp lange Sequenz in zwei

kürzere Sequenzen teilte. Im vorangegangenen Versuch konnten nur Klone erzeugt werden, die weiterhin die lange Sequenz und damit das endogene *PLAC8* enthielten. Das Ziel des zweiten Durchgangs ist der vollständige Knockout von *PLAC8*, der durch das Wegfallen der 282 bp langen Sequenz gezeigt werden würde. Zur Darstellung wurde die Agarose-Gelelektrophorese gewählt. Zur Positivkontrolle wurden die Konstrukte E1Nae und E2Nae herangezogen und als Negativkontrolle galten unbehandelte BON1-Zellen.

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um den zweiten *PLAC8*-Knockout nach erfolgreicher Integration der Konstrukte E1Nae oder E2Nae zu überprüfen. Bei fast allen Klonen war weiterhin die Sequenz von 282 bp neben den kurzen Sequenzen von 173 bp und 109 bp zu erkennen. Die kurzen Sequenzen entstanden durch das Vorhandensein der Schnittstelle NaeI, die durch die Konstrukte in das Genom gebracht wurde. Die Klone mit einer zusätzlichen Sequenz von 282 bp exprimierten demnach weiterhin das endogene *PLAC8*. Aufgrund der Schwäche der Banden, die ein uneindeutiges Ergebnis lieferten, wurde eine qPCR mit dem Primerpaar EXT fw und rev durchgeführt. Der begrenzte Genabschnitt liegt downstream von den Konstrukten E1Nae und E2Nae im Genom und sollte daher nach einem erfolgreichen Knockout von *PLAC8* nicht mehr exprimiert werden. Zur Kontrolle wurden eine Wasserprobe und das Konstrukt E1Nae bzw. E2Nae verwendet.

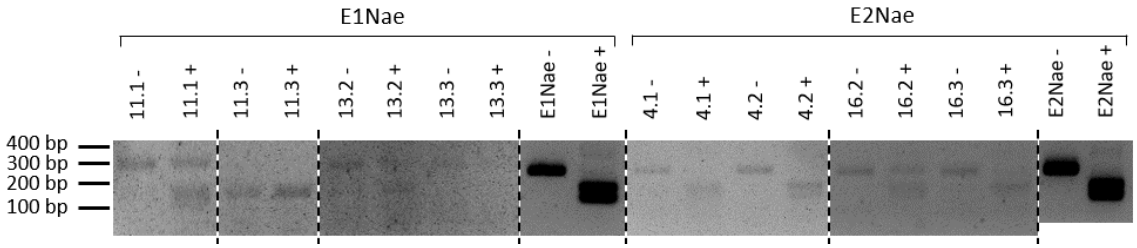
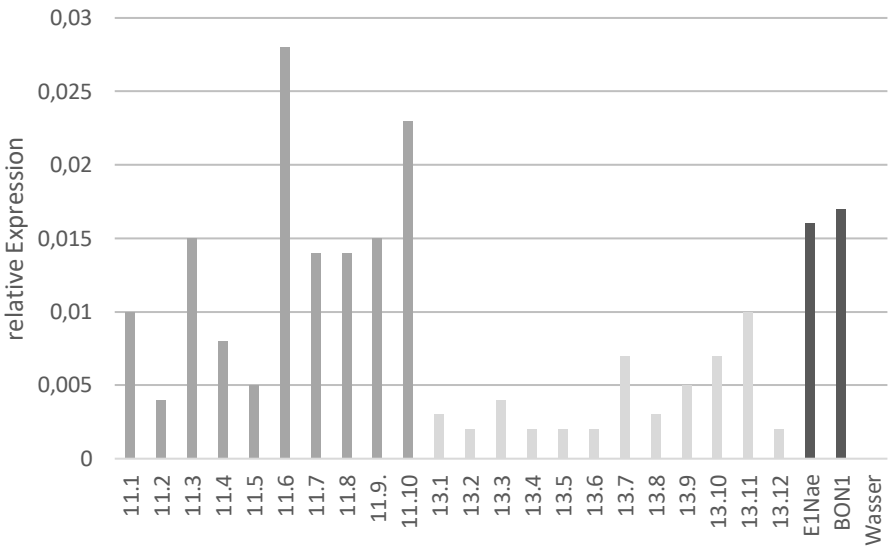


Abbildung 10: Überprüfung des *PLAC8*-Knockouts nach der zweiten Transfektion

Der Knockout des endogenen *PLAC8s* wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es sind die Klone E1Nae 11.1, 11.3, 13.2 und 13.3 als Abkömmlinge von E1Nae 11 bzw. 13 und die Klone E2Nae 4.1, 4.2, 16.2 und 16.3 als Abkömmlinge von den Klonen E2Nae 4 bzw. 16 dargestellt. Es wurden die Primer Exon 1 fw und *PLAC8* skipped Exon 2 rev eingesetzt und es sind die unverdauten (-) und verdauten (+) Proben gezeigt. Erwartete Größe bei den verdauten Proben: 173 bp und 109 bp. Zur Kontrolle wurden die verdauten und unverdauten Konstrukte E1Nae und E2Nae verwendet.

In allen Klonen wurde, wenn auch nur in geringem Maße, weiterhin die Gensequenz zwischen den Primern EXT fw und rev exprimiert. Damit war der vollständige *PLAC8*-Knockout nicht erfolgreich und das ursprüngliche *PLAC8* wurde weiter auf mindestens einem Allel exprimiert. Die Konstrukte E1Nae oder E2Nae konnten nicht anstelle von dem endogenen *PLAC8* integriert werden und dieses vollständig ersetzen.

(A)



(B)

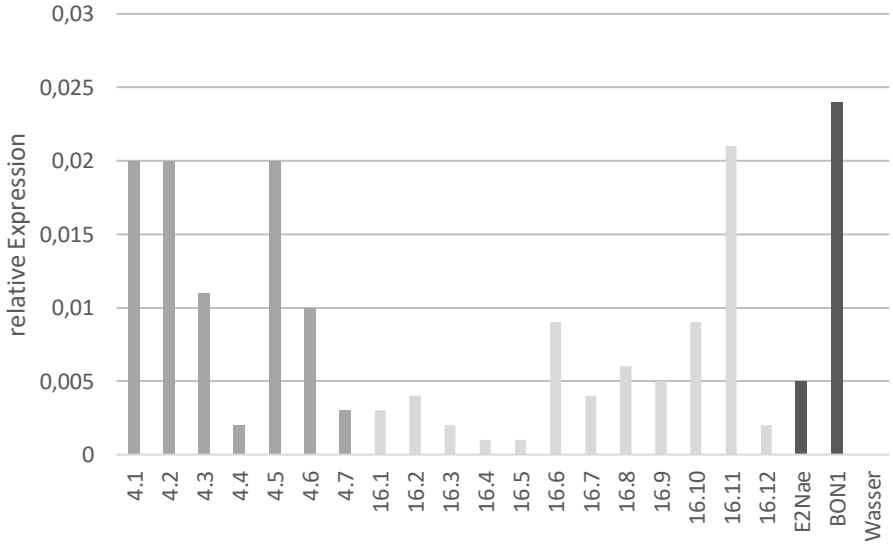


Abbildung 11: Überprüfung der Expression des endogenen *PLAC8s* mittels qPCR

Es wurde die relative Expression des Genabschnitts zwischen den Primern EXT fw und rev ermittelt. Die Expression des Primers EXT in den Nae-Klonen lässt Rückschlüsse auf die Expression von *PLAC8* zu. EXT sollte bei einem vollständigen Knockout des endogenen *PLAC8s* nicht mehr exprimiert werden. Zur Kontrolle wurden das jeweilige Konstrukt, BON1-Zellen und eine Wasserprobe verwendet. **(A)** Klone E1Nae 11.1 bis 11.10 und 13.1 bis 13.12 **(B)** Klone E2Nae 4.1 bis 4.7 und 16.1 bis 16.12.

3.2.5 Die Selektion mit Blasticidin war erfolgreich

Um auszuschließen, dass der Knockout aufgrund einer fehlerhaften Selektion nicht erfolgreich war, wurde die Integration der Blasticidinresistenz überprüft. Dazu wurde eine PCR mit den Primern Blasticidin fw und rev durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Gelelektrophorese. Es wurden die Klone nach der ersten Transfektion als Negativkontrolle aufgetragen und der Klon E1Δ2 14.1 diente als Positivkontrolle.

Bei allen getesteten Klonen mit dem Konstrukt E1Nae oder E2Nae konnte die Blasticidinresistenz nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb von 100 bp zeigen unspezifische Primerbindungen von Blasticidin fw und rev an und sind hier nicht von Bedeutung. Die Blasticidin-spezifischen Banden zeigen, dass die Selektion mit Blasticidin erfolgreich war und die Resistenzkassette tatsächlich integriert wurde. Demnach konnte kein vollständiger *PLAC8*-Knockout erzielt werden und keines der Nae-Konstrukte konnte *PLAC8* ersetzen, da das endogene *PLAC8* in allen Proben weiterhin nachweisbar war.

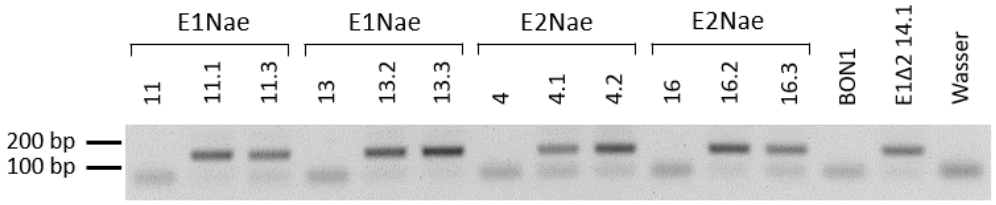


Abbildung 12: Überprüfung der erfolgreichen Integration der Blasticidin-Resistenz

Die Integration der Blasticidin-Resistenzkassette wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Es sind die Klone E1Nae 11, 11.1 und 11.3, E1Nae 13, 13.2 und 13.3, E2Nae 4, 4.1 und 4.2 und E2Nae 16, 16.2 und 16.3 dargestellt. Es wurden die Primer Blasticidin fw und Blasticidin rev eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde der Klon E1Δ2 14.1 eingesetzt. Zudem dienten BON1-Zellen und eine Wasserprobe als Kontrollen.

3.2.6 Zwischenfazit

Zusammenfassend hat *PLAC8* in den Zellen BON1 eines pNETs einen wichtigen Einfluss. Bei einem Rescue-Versuch durch CRISPR/Cas9 mit den Konstrukten E1Δ2 und E2Δ2 sollte ein Knockout des endogenen *PLAC8*s erzeugt werden. Auch nach einem zweiten Knockout bei Klonen mit bereits integrierten Konstrukten konnte kein vollständiger Knockout erreicht werden. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die Konstrukte das endogene *PLAC8* nicht ersetzen können. Um auszuschließen, dass die Störung der Genomsequenz an der verwendeten XhoI-Schnittstelle ursächlich für den Zelluntergang ist, wurde ein zweiter Rescue-Versuch durchgeführt. Bei dieser Untersuchung mit den Konstrukten E1Nae und E2Nae zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Insgesamt scheinen die Konstrukte nicht für das Zellüberleben auszureichen, sondern die BON1-Zellen benötigen die gesamte endogene *PLAC8*-Sequenz.

3.3 Das Kandidatengen *CIP2A*

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des Kandidatengens *CIP2A* und dessen Auswirkung auf verschiedene Zellzyklusmodulatoren. Zunächst wurde die Expression von *CIP2A* spezifisch durch das Erlotinib-Derivat TD52 herunterreguliert. Durch die Kooperation mit dem Institute of Medical Systems Biology der Universität in Ulm konnten Vorhersagen bezüglich der Herunterregulation von *CIP2A* in getroffen werden. Es wurden Hypothesen aufgestellt, wie verschiedene Zellzyklusmodulatoren auf die Herunterregulation von *CIP2A* in Zellen von neuroendokrinen Pankreastumoren und in den Zellen des pankreatisch duktalen Adenokarzinoms reagieren. Diese Hypothesen sollen in der folgenden Arbeit überprüft und gegebenenfalls angepasst werden.

3.3.1 Herunterregulation von *CIP2A* mittels TD52

Zur Untersuchung des Kandidatengens *CIP2A* und dessen Auswirkung auf verschiedene Zellzyklusmodulatoren musste zunächst die Herunterregulation des Gens *CIP2A* mit dem Erlotinib-Derivat TD52 etabliert werden. Ziel ist es, die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC50) zu ermitteln, bei der etwa die Hälfte der Zellen überlebten.

Nach einer 72-stündigen Behandlung der Zellen beider Zelllinien mit dem Inhibitor TD52 wurde ein MTT-Assay durchgeführt und das Ergebnis im Centro LB960 Luminometer visualisiert. Die Intensität gibt dabei Aufschluss über die Zellviabilität. Die verwendeten Replikate wurden auf die Viabilität unter DMSO-Behandlung normiert.

Anhand der Untersuchungen ließ sich erkennen, dass durch die Behandlung der Zellen mit mehr als 5 µM TD52 die Zellviabilität signifikant sank. Bei einer Konzentration von 2 µM TD52 zeigte sich bei beiden Zelllinien keine bedeutende Veränderung der Zellviabilität. Die Zellen der Zelllinie BON1 wurden auch durch eine Konzentration von 5 µM TD52 ebenfalls nur gering beeinflusst (85 %). Im Gegensatz dazu waren bei der gleichen Konzentration nur noch 73 % der S2-007-Zellen viabel. Bei einer Konzentration von 7,5 µM TD52 waren 59 % der BON1-Zellen und 25 % der S2-007-Zellen viabel. Die Konzentration von 10 µM TD52 führte bei den BON1-Zellen zu einer Viabilitätsreduktion auf 38 % und bei den S2-007-Zellen auf 15 %. Das Ziel ist, die halbmaximale inhibitorische Konzentration zu finden (IC50). Sie bezeichnet die Konzentration des Inhibitors, um die Hälfte der Zellen zu inhibieren. Daher wurde die Konzentration von 7,5 µM TD52 gewählt. Bei einer Konzentration von 5 µM wären zu wenige der BON1-Zellen untergegangen und bei einer höheren TD52-Konzentration wären zu wenige S2-007-Zellen apoptotisch gewesen (siehe Abb. 13).

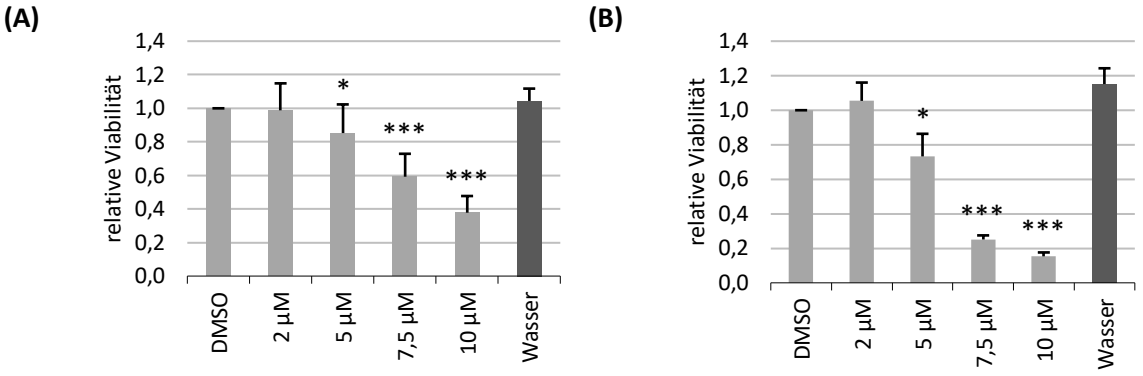


Abbildung 13: Viabilität BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Viabilitätder BON1- und S2-007-Zellen nach Behandlung/Inhibition mit TD52 wurde mit einem MTT-Assay überprüft. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (2 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM) von TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Viabilität unter DMSO-Behandlung normiert. Die Werte wurden aus n = 4 bis 11 Replikaten zusammengefasst. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. **(A)** BON1-Zellen. **(B)** S2-007-Zellen.

3.3.2 Das Zielgen CIP2A und der Signalweg über PP2A und AKT

Mit der qPCR wurden die Expression des Zielgens *CIP2A* und weiterer Zellzyklusmodulatoren ermittelt. Durch die Behandlung mit TD52 konnte direkt die Auswirkung auf *CIP2A* dargestellt werden. Zusätzlich wurden Versuche zu den Modulatoren *PP2A*, *p18*, *p21*, *p27*, *Cyclin D1*, *Claudin-4* und *GLI1* durchgeführt. Durch die qPCR wurden die zu untersuchenden Sequenzen amplifiziert, die durch die Primer fw und rev begrenzt werden. Mit dem Western Blot wurde die Menge des Proteins CIP2A und weiterer Zellzyklusmodulatoren nach der Inhibition von der Gensequenz *CIP2A* gemessen. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Erfolg der Inhibition mit TD52 auf Proteinebene zu überprüfen. Zudem wurden die Proteine PP2A, AKT, RPS6 und p-RPS6, Cyclin D1, Cyclin E, die Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 und Claudin-4 untersucht.

Die Ergebnisse der relativen Expression der behandelten Replikate wurden in Bezug zur jeweiligen Kontrolle gesetzt. Die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. Die ΔC_t-Werte der behandelten Replikate sind anteilig von der Kontrolle zu verstehen.

Bei den BON1-Zellen zeigten alle untersuchten Replikate eine verminderte RNA-Expression von *CIP2A.* Im Mittel wurde die Expression bis auf 50 % der Ausgangsexpression vermindert. Die Standardabweichung lag bei 0,107 und die Ergebnisse waren bei einem p-Wert von < 0,0001 statistisch signifikant. Bei den S2-007-Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Durchschnittlich konnte die relative Expression von *CIP2A* in den S2-007-Zellen auf 34 % gesenkt werden. Die Standardabweichung betrug 0,347 und durch den p-Wert von 0,0014 wurde die statistische

Signifikanz der Ergebnisse gezeigt (siehe Abb. 14 A). Diese Ergebnisse bestätigen die Funktion des Inhibitors TD52, da dieser zu einer verminderten Expression von CIP2A führt.

Analog zu den Ergebnissen aus der qPCR, konnte auch im Western Blot eine deutliche Intensitätsminderung der Banden der behandelten Replikate im Vergleich zu den unbehandelten Replikaten gesehen werden (siehe Abb. 14 C). Insgesamt war im Mittel ein Expressionsrückgang von 28 % und eine Standardabweichung von 0,21 zu beobachten. Mit einem p-Wert von < 0,0001 waren die Ergebnisse statistisch signifikant. In der Untersuchung der Proteinexpression von CIP2A bei den S2-007-Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Im Durchschnitt wurde die Expression von CIP2A auf Proteinebene auf 35 % gesenkt. Die Standardabweichung lag bei 0,4 und durch den p-Wert von 0,05 konnte von einer statistischen Signifikanz der Ergebnisse ausgegangen werden (siehe Abb. 14 B).

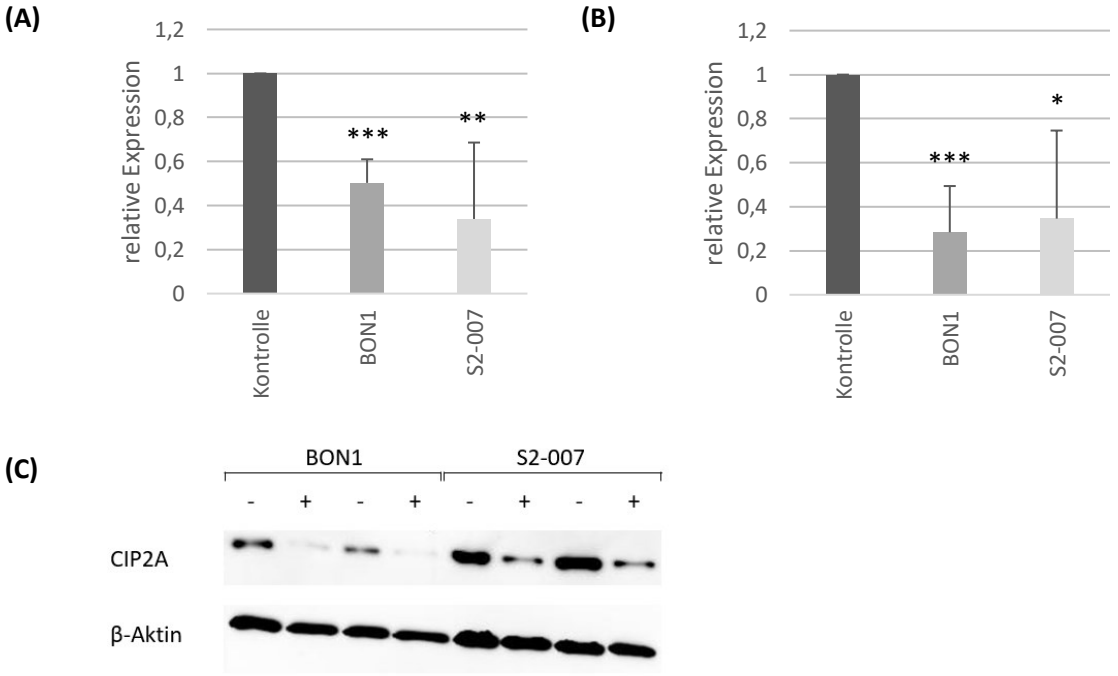


Abbildung 14: Expression der RNA *CIP2A* und des Proteins CIP2A in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *CIP2A* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *CIP2A* auf der RNA-Ebene wurde mittels qPCR und auf der Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **(A)** RNA-Expression, n = 9 bzw. 10. **(B)** Proteinexpression, n = 8 bzw. 6. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Die Ergebnisse der qPCR mit den Primern PP2A fw und rev zeigten bei den BON1-Zellen eine Senkung der relativen Expression in allen untersuchten Replikaten. Durchschnittlich verringerte sich die Expression auf 64 % der Kontrollen. Die Standardabweichung betrug 0,185 und mit

einem p-Wert von 0,0002 waren die Ergebnisse statistisch signifikant. Bei den S2-007-Zellen zeigte sich eine ähnliche Tendenz. Bei Betrachtung des Mittelwertes ließ sich mit einer Verminderung auf 68 % der Ausgangsprobe eine deutliche Tendenz erkennen. Die Messungen zeigten eine Standardabweichung von 0,334. Zudem waren die Werte mit einem p-Wert von 0,002 statistisch signifikant (siehe Abb. 15 A).

In der Untersuchung der BON1-Zellen wurde im Western Blot in den meisten Replikaten eine verringerte Bandenintensität ermittelt, die eine geringere Expression des Proteins PP2A bedeutet. Durchschnittlich wurde eine verringerte Proteinexpression auf 49 % der Ausgangsexpression in den Kontrollproben gesehen. Die Standardabweichung lag bei 0,38 und mit einem p-Wert von 0,004 waren die Ergebnisse statistisch signifikant. Die Ergebnisse der S2-007-Zellen stellten sich ebenso wie die Ergebnisse der BON1-Zellen dar. Der Mittelwert der Proteinexpression betrug 56 % des Ausgangswertes und die Standardabweichung lag bei 0,34. Mit einem p-Wert von 0,029 konnte eine statistische Signifikanz der verringerten Expression gezeigt werden (siehe Abb. 15 B).

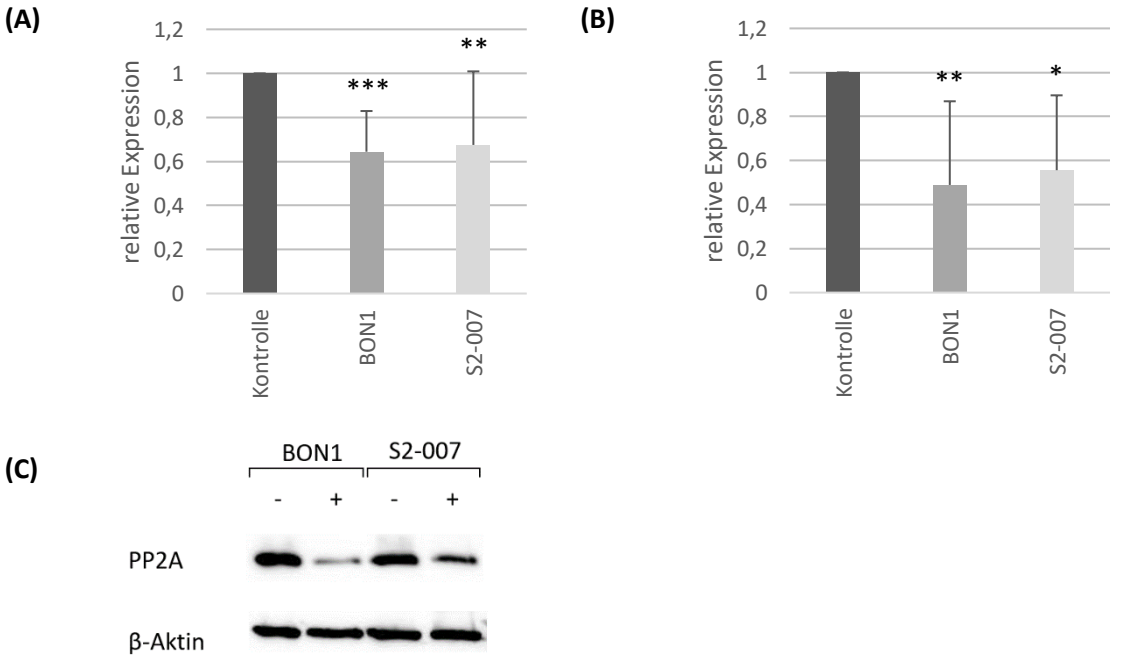


Abbildung 15: Expression der RNA *PP2A* und des Proteins PP2A in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *PP2A* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *PP2A* auf der RNA-Ebene wurde mittels qPCR und auf der Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **(A)** RNA-Expression, n = 10 bzw. 15. **(B)** Proteinexpression, n = 9 bzw. 7. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Bezüglich der Proteinexpression von AKT in den BON1-Zellen wurden uneindeutige Ergebnisse gemessen. In zwei behandelten Replikaten wurde eine erhöhte und in zwei behandelten Replikaten wurde eine verringerte Proteinexpression von AKT gezeigt (siehe Abb. 16 B). Der Mittelwert lag bei 113 % und die Standardabweichung betrug 0,98. Anhand des p-Wertes von 0,81 ließen sich keine signifikanten Daten nach der Behandlung der Zellen mit TD52 ermitteln. Die Ergebnisse des Western Blots mit dem Antikörper Anti-AKT bei den S2-007-Zellen waren bei einem Mittelwert von 55 % eindeutiger. Die Standardabweichung betrug 0,4. Die Ergebnisse waren mit einem p-Wert von 0,19 nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 16 A).

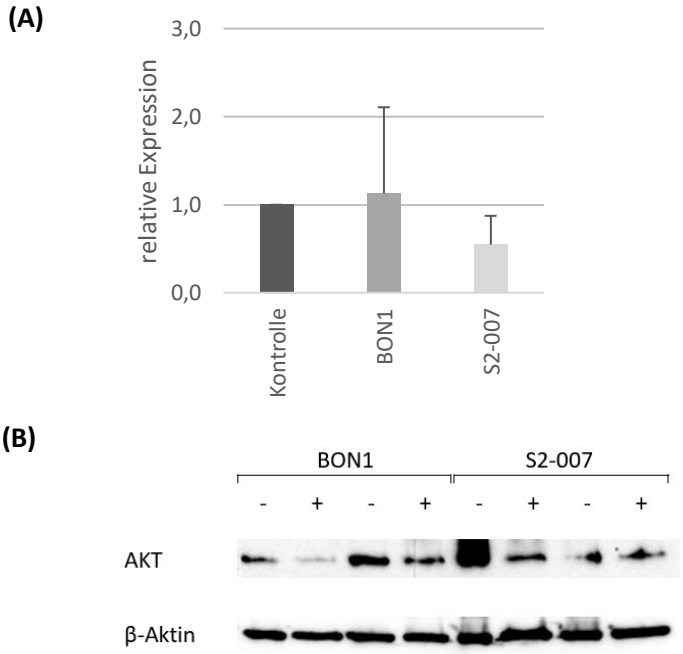


Abbildung 16: Expression des Proteins AKT in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von AKT nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von AKT auf der Proteinebene wurde mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. **(A)** Proteinexpression, n = 4. **(B)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Das Protein p-AKT wurde mehrfach versucht in BON1-Zellen und S2-007 nachzuweisen. Auch mit der Verwendung verschiedener Antikörper konnte p-AKT weder in der Kontrollprobe noch nach der Inhibition von CIP2A im Western Blot dargestellt werden (siehe Abb. 17).

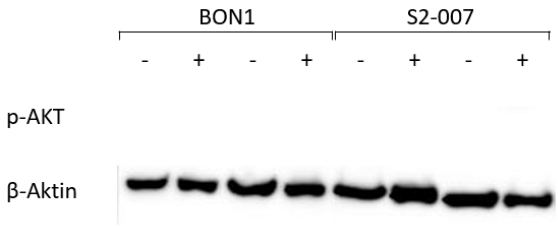


Abbildung 17: Expression des Proteins p-AKT in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von p-AKT nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von p-AKT auf der Proteinebene wurde mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Zusammenfassend konnte nach der Inhibition mit TD52 für *CIP2A* in beiden Zelllinien sowohl auf der RNA- als auch auf der Proteinebene eine signifikant verringerte Expression ermittelt werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine gelungene Inhibition von *CIP2A*. Bei der Unteruschung von *PP2A* konnte ebenfalls in beiden Zelllinien eine Herunterregulation der RNA- und Proteinexpression beobachtet werden. Daher lässt sich entgegen der Erwartungen vermuten, dass eine Inhibition von *CIP2A* auch negative Einflüsse auf die Expression von *PP2A* hat. Für die Proteine AKT und p-AKT wurden keine signifikanten Ergebnisse ermittelt.

3.3.3 RPS6 und p-RPS6

In den BON1-Zellen wurde über Western Blots die Expression des Proteins RPS6 nach der Inhibition von *CIP2A* gemessen (siehe Abb. 18 C). Der Mittelwert lag bei 132 % und die Standardabweichung betrug 0,48. Die Werte ließen keine signifikanten Aussagen zu, doch es konnten Tendenzen erkannt werden, was anhand des p-Wertes von 0,097 gezeigt wurde (siehe Abb. 18 A). Bei der Untersuchung des an Ser235/236 phosphorylierten Proteins p-RPS6 wurden andere Ergebnisse beobachtet (siehe Abb. 18 D). Durchschnittlich wurde die Expression auf 83 % der Ausgangsprobe verringert. Die Standardabweichung betrug 0,52. Die Herunterregulation der Expression war bei einem p-Wert von 0,0137 statistisch signifikant (siehe Abb. 18 B).

Bei den S2-007-Zellen wurde in den meisten Replikaten eine verminderte Expression von RPS6 gemessen (siehe Abb. 18 D). Der Mittelwert lag bei 0,48. Bei einer Standardabweichung von 0,37 konnte ein p-Wert von 0,01 ermittelt werden, der die statistische Signifikanz der Daten zeigt (siehe Abb.: 18 A). Diese Ergebnisse verstärkten sich bei der Untersuchung des phosphorylierten Proteins p-RPS6. Fast alle Replikate zeigten eine stark verringerte Proteinexpression, was zu einem Mittelwert von 51 % führte. Die Standardabweichung betrug 0,16 und bei einem p-Wert von 0,0035 wurde die statistische Signifikanz der Werte gezeigt (siehe Abb. 18 B).

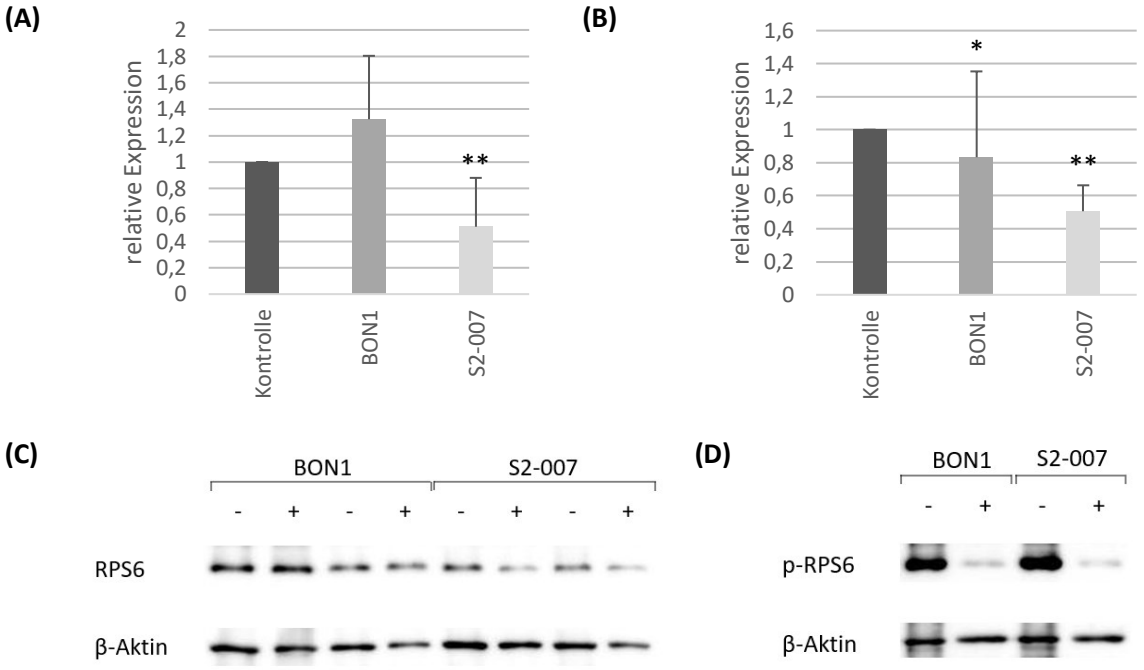


Abbildung 18: Expression der Proteine RPS6 und p-RPS6 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von RPS6 und p-RPS6 nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von RPS6 und p-RPS6 wurde auf der Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **(A)** Proteinexpression RPS6, n = 8 bzw. 7. **(B)** Proteinexpression p-RPS6, n = 13 bzw. 9. **(C)** Beispielblot von RPS6 nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-). **(D)** Beispielblot von p-RPS6 nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Zusammenfassend wurden bei der Untersuchung der Proteine RPS6 und p-RPS6 fast ausschließlich signifikante Ergebnisse ermittelt. Nur die Proteinexpression von RPS6 in den BON1-Zellen zeigte keine signifikant verminderte Expression, wie die anderen Untersuchungen. Daraus lässt sich schließen, dass TD52 über die Inhibition von *CIP2A* die Proteinexpression und die Phosphorylierung von RPS6 negativ beeinflusst.

3.3.4 Cyclin D1 und Cyclin E

In den Zellen der BON1-Zelllinie wurde die Expression von *Cyclin D1* durch die Behandlung mit TD52 durchschnittlich um etwa 10 % gesenkt. Die Standardabweichung lag bei 0,31 und der p-Wert bei 0,344. Daher konnte keine statistisch signifikante Verringerung der relativen Expression von *Cyclin D1* durch TD52 in den BON1-Zellen gezeigt werden. Die Werte der relativen Expression von *Cyclin D1* in der S2-007-Zelllinie zeigten eindeutigere Ergebnisse. Durch eine Inhibition mit TD52 wurde eine um das 1,85-fache gesteigerte Expression von Cyclin D1 beobachtet. Es ergab sich eine Standardabweichung von 0,958. Mit einem p-Wert von 0,014 war

die Expressionserhöhung von *Cyclin D1* in den S2-007-Zellen im Gegensatz zu den BON1-Zellen statistisch signifikant (siehe Abb. 19 A).

In der Untersuchung der BON1-Zellen mit dem Antikörper Anti-Cyclin D1 wurde in den meisten Replikaten eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (siehe Abb. 19 C). Im Mittel sank die Expression des Proteins Cyclin D1 auf 71 % des Ausgangswertes. Die Standardabweichung lag bei 0,29. Mit einem p-Wert von 0,00762 waren die Ergebnisse statistisch signifikant. Bei den S2-007-Zellen zeigten sich gegenteilige Ergebnisse nach der *CIP2A*-Inhibition. Durchschnittlich wurde die Expression von Cyclin D1 auf 108 % erhöht. Die Standardabweichung betrug 0,46, aber mit einem p-Wert von 0,76 waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 19 B).

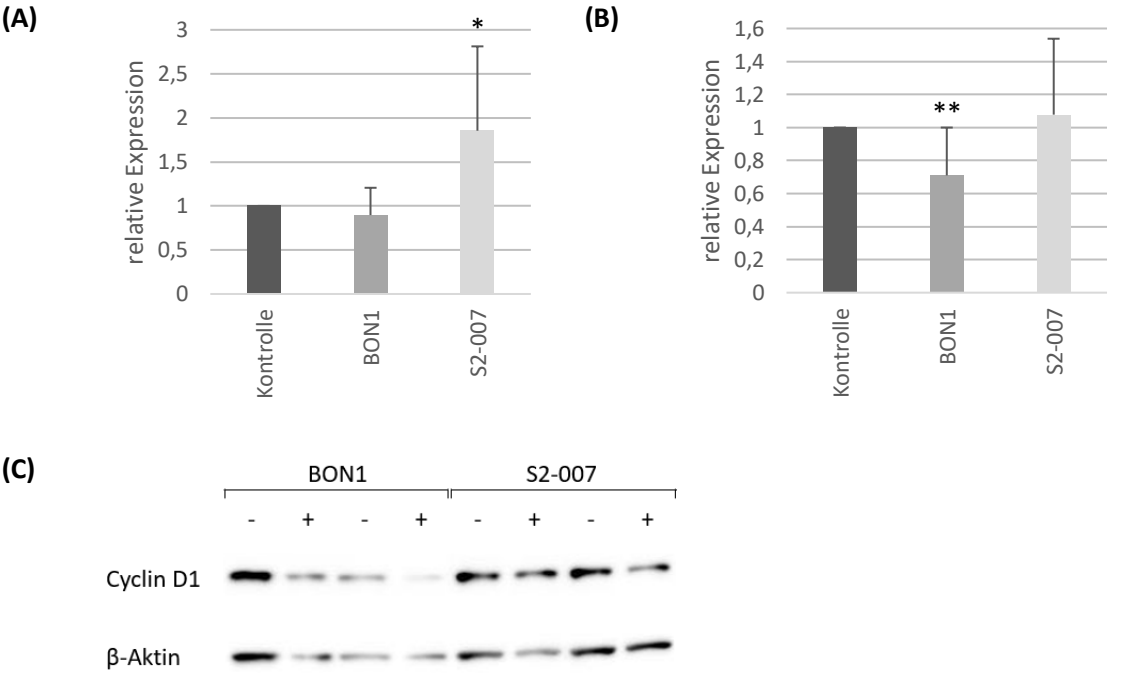


Abbildung 19: Expression der RNA *Cyclin D1* und des Proteins Cyclin D1 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *Cyclin D1* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *Cyclin D1* auf der RNA-Ebene wurde mittels qPCR und auf der Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **(A)** RNA-Expression, n = 9 bzw. 11. **(B)** Proteinexpression, n = 8 bzw. 4. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Im folgenden Western Blot wurden die BON1-Zellen mit dem Antikörper Anti-Cyclin E bezüglich der Proteinexpression untersucht. In den meisten Replikaten zeigte sich die Expression von Cyclin E stark vermindert. Der Mittelwert der Expression lag bei 50 % der Expression in der Kontrollprobe. Die Standardabweichung lag bei 0,42 und durch einen p-Wert von 0,0035 wurde

eine statistische Signifikanz der Werte gezeigt. Bei den S2-007-Zellen lag der Mittelwert bei 146 % der Kontrollprobe und die Standardabweichung betrug 0,84. Der p-Wert von 0,2 zeigte, dass die Ergebnisse keine statistische Signifikanz aufwiesen (siehe Abb. 20 A).

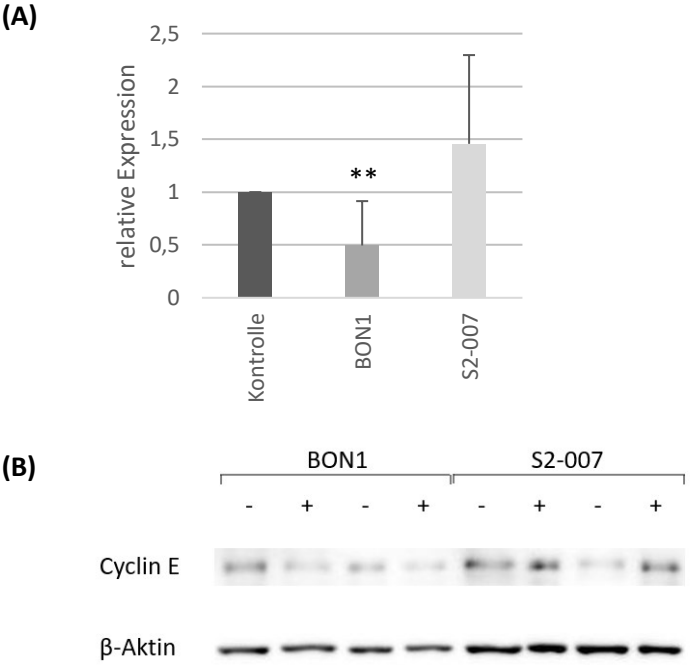


Abbildung 20: Expression des Proteins Cyclin E in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von Cyclin E nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird mittels Western Blot gezeigt. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** $p < 0,01$. **(A)** Proteinexpression, n = 9 bzw. 7. **(B)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Insgesamt wurden bei der Untersuchung der RNA *Cyclin D1* und der Proteine Cyclin D1 und Cyclin E sehr heterogene Ergebnisse ermittelt. Für *Cyclin D1* konnte lediglich in den S2-007-Zellen nach Behandlung mit TD52 eine signifikante Expressionssteigerung beobachtet werden. Bei den Proteinen Cyclin D1 und Cyclin E konnten nur in der BON1-Zelllinie eine signifikant verringerte Expression gezeigt werden. Die Ergebnisse ließen Rückschlüsse auf den komplexen Einfluss von *CIP2A* auf die Cycline zu. Durch die Heterogenität der Ergebnisse besteht hier weiterer Forschungsbedarf.

3.3.5 Die Zellzyklusinhibitoren p18, p21 und p27

Bei der Untersuchung der BON1-Zellen nach der Behandlung mit dem Inhibitor TD52 zeigte sich in allen Replikaten eine starke Reduktion der relativen Expression von *p18*. Der Mittelwert lag bei 32 % und die Standardabweichung bei 0,102. Die Ergebnisse waren mit einem p-Wert von 0,001 statistisch signifikant. Bei den S2-007-Zellen wurde in allen Replikaten ähnliche Werte

ermittelt. Die Verringerung der relativen Expression lag im Durchschnitt bei 21 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Standardabweichung betrug 0,16 und durch den p-Wert von 0,002 wurde eine statistische Signifikanz gezeigt (siehe Abb. 21).

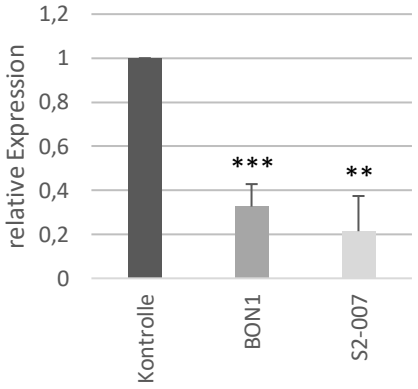


Abbildung 21: Expression der RNA *p18* in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *p18* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in BON1- und in S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *p18* auf RNA-Ebene wurde mittels qPCR gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 4$.

Die BON1-Zellen zeigten nach der Hemmung von *CIP2A* mit dem Inhibitor TD52 uneindeutige Ergebnisse. Insgesamt zeigte sich bei den meisten Replikaten eine erhöhte Expression von *p21* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Insgesamt ergab sich ein Mittelwert von 131 %. Die Standardabweichung betrug 0,582 und der p-Wert lag bei 0,148. Damit konnte keine statistische Signifikanz der erhöhten Expression von *p21* nach der Behandlung mit TD52 ermittelt werden, aber durch die Hochregulation in den meisten Replikaten ließ sich eine Tendenz erkennen. Hier verzerrte die hohe Standardabweichung die Aussagekraft der Ergebnisse (siehe Abb. 22 A). Bei den S2-007-Zellen konnten hingegen deutliche Tendenzen beobachtet werden. Alle getesteten Replikate zeigten eine erhöhte Expression von *p21* auf RNA-Ebene. Der Mittelwert lag bei 9,349 % und die Standardabweichung bei 41,1. Die Ergebnisse zeigten mit einem p-Wert von 0,02 eine statistische Signifikanz. Eine hohe Varianz in der *p21*-Expression führte zu einer hohen Standardabweichung, aber es ließ sich eindeutig eine erhöhte Expression nach der TD52-Behandlung beobachten (siehe Abb. 22 B).

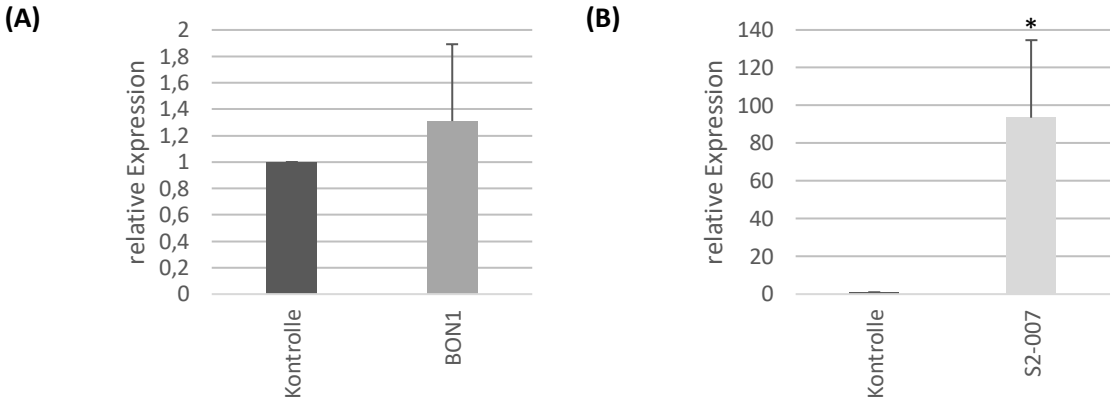
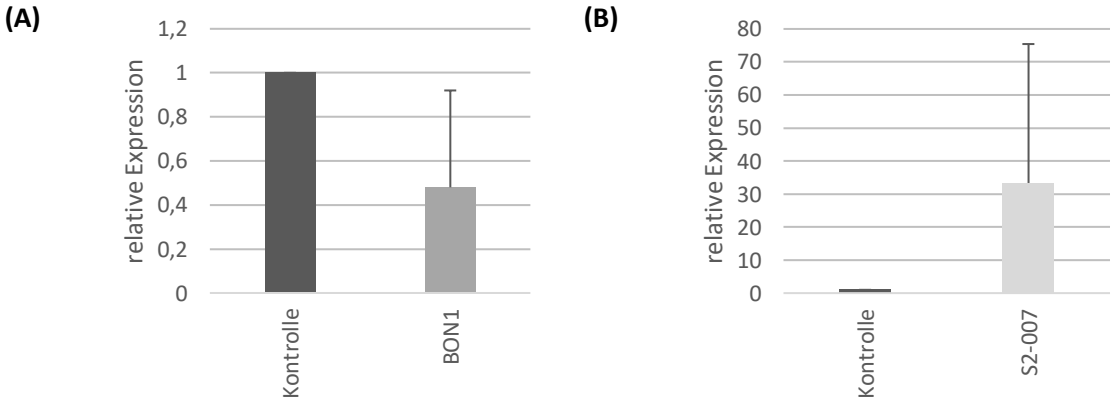


Abbildung 22: Expression der RNA *p21* in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *p21* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *p21* auf der RNA-Ebene wurde mittels qPCR gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$. **(A)** RNA-Expression BON1-Zellen, n = 9. **(B)** RNA-Expression S2-007-Zellen, n = 4.

Bei der Untersuchung der BON1-Zellen mit Anti-p21 wurde in allen Replikaten eine verringerte Expression gemessen (siehe Abb. 23 C). Hier lag der Mittelwert bei 48 % und die Standardabweichung betrug 0,44. Der p-Wert lag bei 0,064, sodass von einer Tendenz, aber nicht von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden konnte (siehe Abb. 23 A). In den S2-007-Zellen wurde in allen Replikaten eine verstärkte Proteinexpression von p21 ermittelt (siehe Abb. 23 C). Die durchschnittliche Erhöhung lag bei 3.335 % und die Standardabweichung betrug 42,08. Bei einem p-Wert von 0,118 waren die Ergebnisse nicht signifikant, aber es konnte anhand der Grafik von einer Erhöhung ausgegangen werden. Durch die breite Streuung der Ergebnisse wurde die Standardabweichung verzerrt (siehe Abb. 23 B).



(C)

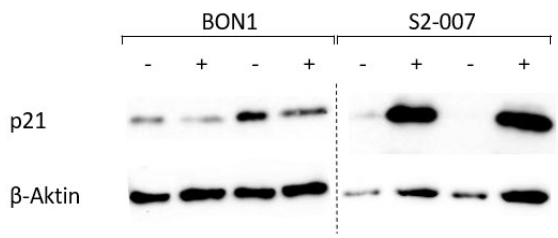


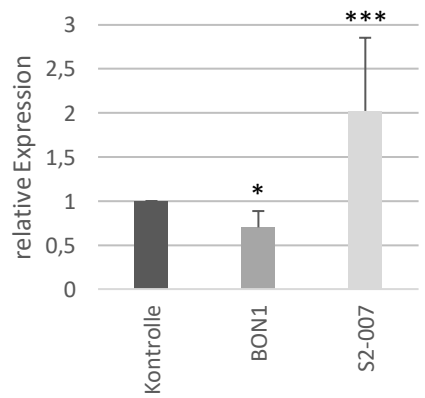
Abbildung 23: Expression des Proteins p21 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von p21 nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von p21 auf der Proteinebene wurde mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. **(A)** Proteinexpression BON1-Zellen, n = 3. **(B)** Proteinexpression S2-007-Zellen, n = 6. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

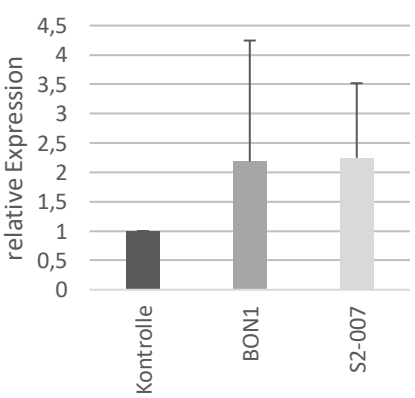
In der BON1-Zelllinie konnte eine Herunterregulation der relativen Expression von *p27* in den mit TD52 behandelten Zellen beobachtet werden. Der Mittelwert lag bei 70 % und es ergab sich eine Standardabweichung von 0,185. Mit einem p-Wert von 0,048 wiesen die Ergebnisse eine statistisch signifikant reduzierte Expression auf der Ebene der RNA nach. Im Gegensatz dazu wurden in der S2-007-Zelllinie ausschließlich erhöhte Expressionen von *p27* ermittelt. Es ergab sich ein Mittelwert von 202 %. Die Standardabweichung betrug 0,831 und die Ergebnisse waren mit einem p-Wert von < 0,0001 statistisch signifikant (siehe Abb. 24 A).

Bei den BON1-Zellen zeigte sich meistens eine verstärkte Proteinexpression von p27. Insgesamt zeigte sich ein Mittelwert von 219 % und eine Standardabweichung von 2,06. Bei einem p-Wert von 0,219 konnte nicht von signifikanten Ergebnissen ausgegangen werden. Bei der Untersuchung der S2-007-Zellen fiel eine erhöhte Expression von p27 in fast allen Replikaten auf. Im Mittel betrug die Expression 225 % und die Standardabweichung lag bei 1,27. Bei einem p-Wert von 0,134 waren die Ergebnisse nicht signifikant, aber es war eine Tendenz erkennbar (siehe Abb. 24 B).

(A)



(B)



(C)

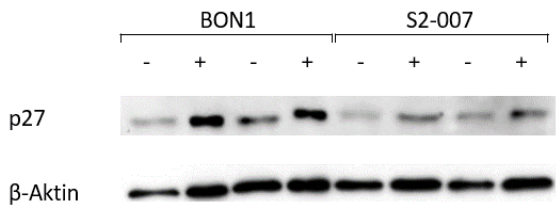


Abbildung 24: Expression der RNA *p27* und des Proteins p27 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *p27* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in den BON1- und in den S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *p27* auf RNA-Ebene wurde mittels qPCR und auf Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. **(A)** RNA-Expression, n = 4 bzw. 11. **(B)** Proteinexpression, n = 6 bzw. 5. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Zusammenfassend zeigte sich nach der Untersuchung der Zellzyklusinhibitoren ein heterogenens Bild. *p18* zeigte in beiden Zelllinien nach der Inhibition mit TD52 eine signifikant verringerte RNA-Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Expression der RNA *p27* in den BON1-Zellen beobachtet. In den S2-007-Zellen wurde hingegen auf der RNA-Ebene für *p21* und *p27* eine signifikant erhöhte Expression ermittelt. Für die untersuchten Proteine konnten keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden. Diese Untersuchungen zeigen den unterschiedlichen Einfluss von *CIP2A* in den Zelllinien BON1 und S2-007 in Bezug auf die Zellzyklusinhibitoren.

3.3.6 Claudin-4 als Repräsentant der Tight junctions

Bei den BON1-Zellen wurde in der Hälfte der Replikate eine erhöhte und in der anderen Hälfte der Replikate eine verringerte Expression von *Claudin-4* gezeigt. Insgesamt wurde im Mittel eine Erhöhung der relativen Expression auf 111 % der Kontrollprobe ermittelt. Die Standardabweichung lag bei 0,384 und die Ergebnisse ließen bei einem p-Wert von 0,403 keine statistische Signifikanz erkennen. Für die Zellen der Zelllinie S2-007 stellten sich ähnlich ambivalente Ergebnisse dar. Im Durchschnitt wurde eine Herunterregulation der Expression auf 98 % festgestellt. Die Standardabweichung betrug 0,563 und die Werte waren mit einem p-Wert von 0,909 nicht statistisch signifikant (siehe Abb.: 17 A).

Die Zelladhäsion nach einer Inhibition von *CIP2A* wurde mit dem Antikörper Anti-Claudin-4 getestet. In allen Replikaten zeigte sich nach der Behandlung mit TD52 eine erhöhte Expression des Proteins Claudin-4. Es wurde eine durchschnittliche Expression von 256 % und eine Standardabweichung von 1,56 gemessen. Mit einem p-Wert von 0,141 konnte keine statistische Signifikanz der Daten gezeigt werden. Durch die Hochregulation von Claudin-4 in allen

Replikaten konnte eine Tendenz erkannt werden (siehe Abb. 17 B). In den S2-007-Zellen konnte das Protein Claudin-4 mehrfach nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente eine Probe der BON1-Zellen.

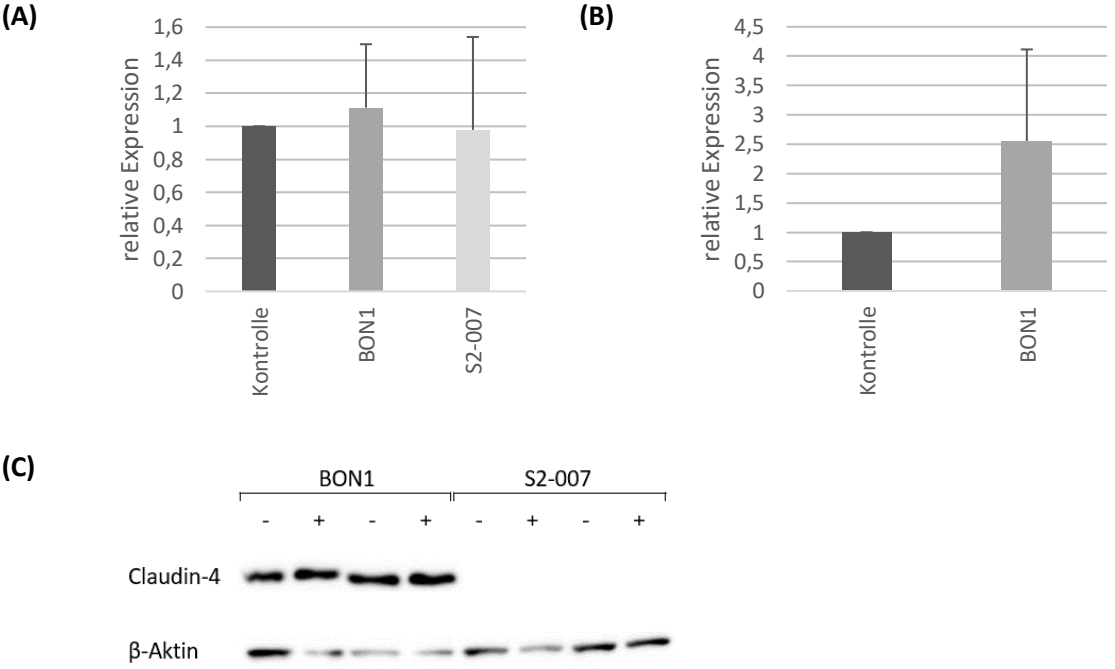


Abbildung 25: Expression der RNA *Claudin-4* und des Proteins Claudin-4 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von *Claudin-4* nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in BON1- und in S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von *Claudin-4* auf der RNA-Ebene wurde mittels qPCR und auf der Proteinebene in den BON1-Zellen mittels Western Blot gemessen. Die Zellen wurden mit 5 µM TD52 behandelt. Die Replikate wurden auf die Expression unter DMSO-Behandlung normiert. Die Säulen stellen die Mittelwerte dar und die Whisker zeigen die Standardabweichungen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. **(A)** RNA-Expression, n = je 9. **(B)** Proteinexpression, n = 4. **(C)** Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-).

Für *Claudin-4* konnten weder auf der RNA- noch auf der Proteinebene signifikante Ergebnisse nach der Inhibition von *CIP2A* durch TD52 beobachtet werden. Das Protein Claudin-4 konnte in den S2-007-Zellen gar nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen erneut die Komplexität des Einflusses von *CIP2A*, hier am Beispiel der Zelladhäsion.

3.3.7 GLI1 als Teil des Hedgehog-Signalwegs

GLI1 konnte weder in BON1-Zellen noch in S2-007-Zellen mittels einer qPCR detektiert werden. Sowohl in den mit TD52 behandelten als auch in den unbehandelten Zellen war kein Signal in der qPCR messbar. Zur Überprüfung wurden Zellen der Zelllinie RMS13 als Positivkontrolle verwendet, in denen innerhalb der AG Buchholz bereits *GLI1* auf der Ebene der RNA

nachgewiesen wurde. Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe verwendet, welche hier nicht dargestellt ist.

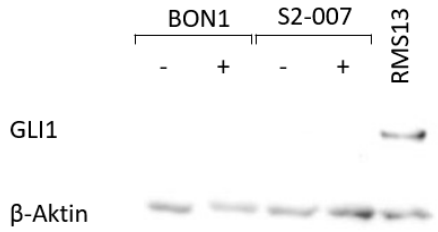


Abbildung 26: Expression des Proteins GLI1 in BON1- und S2-007-Zellen nach der Behandlung mit TD52

Die Expression von GLI1 nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 in BON1- und in S2-007-Zellen wird gezeigt. Die Expression von GLI1 wurde auf der Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Beispielblot nach der Behandlung mit TD52 (+) und Kontrollen (-). RMS13-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet.

3.3.8 Zwischenfazit

Insgesamt konnte *CIP2A* durch den Inhibitor TD52 spezifisch herunterreguliert werden. Sowohl auf der RNA- als auch auf Proteinebene konnten die Auswirkungen der Inhibition beobachtet werden. Unter den untersuchten RNA-Sequenzen und Proteinen befanden sich unter anderem die direkt von *CIP2A* beeinflussten Faktoren *PP2A* und AKT. *PP2A* wird auf der RNA- und der Proteinebene signifikant von *CIP2A* beeinflusst und zeigte durch TD52 Behandlung eine verminderte Expression. Zudem wurden Tight junctions, Proliferationsmarker, Cycline, Zellzyklusinhibitoren und *GLI1* als Teil des Hedgehog-Signalwegs bei den Zelllinien BON1 und S2-007 untersucht. Während sich bei der Untersuchung von *Claudin-4* als Repräsentant der Tight junctions kein signifikanter Einfluss durch *CIP2A* zeigte, wurde die Expression von RPS6 stark beeinflusst. Die Expressionen von RPS6 und p-RPS6 waren durch Inhibition von CIP2A signifikant vermindert. Für die Cycline und die Zellzyklusinhibitoren wurden heterogene Ergebnisse beobachtet. Für die S2-007-Zellen konnte festgehalten werden, dass die RNA der untersuchten Zellzyklusmodulatoren nach TD52 Inhibition signifikant gesteigert exprimiert wurde. Die einzige Ausnahme bildete hier p18, das signifikant vermindert exprimiert wurde. Für die BON1-Zellen zeigten sich gegenteilige Ergebnisse. Die Expressionen von Cyclin D1, Cyclin E, *p18* und *p27* waren nach Inhibition von *CIP2A* signifikant verringert. Diese Untersuchungen zeigen die Komplexität des Zellzyklus und den Einfluss von *CIP2A* auf diesen in verschiedenen Tumorentitäten. Im Folgenden werden die Ergebnisse in die aktuelle Literatur eingeordnet. Dafür werden besonders die Daten des Institute of Medical Systems Biology in Ulm berücksichtigt, die im Rahmen einer Kooperation entstanden sind.

4. Diskussion

Pankreaskarzinome stellen in der Medizin eine Herausforderung in der frühen Diagnostik und in der Therapie dar. In Zukunft wird die Zahl der Erkrankten voraussichtlich stetig steigen, da Risikofaktoren wie ein hohes Alter und prädisponierende Lebensstilfaktoren zunehmen. Aufgrund der steigenden Inzidenzen und der schlechten Prognose stehen Pankreaskarzinome im Interesse der Forschung (Hermann und Kraywinkel 2019; Hu et al. 2021). In der Vergangenheit wurde beobachtet, dass pNET und PDAC sich maßgeblich durch ihre Entstehungsmutationen unterschieden, aber pNEC und PDAC mehr Überschneidungen aufweisen als bisher vermutet wurde. Entstehungsmutationen in pNEC und PDAC sind häufig *KRAS*, *CDKN2A* und *TP53*, wohingegen bei pNET gehäuft Mutationen in *MEN1*, *DAXX* und *p53* vorkommen (Gao et al. 2020). Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit ist das tiefere Verständnis von pNET und deren Vergleich mit PDAC. Diese Einordnung soll anhand der Zielgene *PLAC8* und *CIP2A* erfolgen. Hier scheint der AKT-Signalweg eine tragende Rolle zu spielen, da er durch beide Zielgene beeinflusst wird (Deng et al. 2023; Liu et al. 2017b). Beide Zielstrukturen stellen wichtige Regulatoren des Zellzyklus, der Proliferation und Apoptose dar und scheinen für gesunde und Tumorzellen von Bedeutung zu sein.

In Vorarbeiten der AG Buchholz wurde ermittelt, dass in pNEN und in PDAC *PLAC8*-RNA einen wichtigen Faktor in der Tumorinitiation und -progression darstellt (Kaistha et al. 2016; Tatura et al. 2020). Das Protein PLAC8 hingegen ist nicht für das Zellüberleben notwendig (Kuhl 2019; Stark 2017). Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit weiter bekräftigt werden. Zudem zeigten sich Hinweise auf die Relevanz bestimmter Abschnitte von *PLAC8* für das Zellüberleben von den S2-007-Zellen eines PDACs. So wurde beobachtet, dass nicht alle Zellen das vollständige Exon 2 von *PLAC8* enthalten und dass einige Klone verschiedene Endpunkte aufweisen (Stark 2022). Daher ist fraglich, welche Rolle Exon 2 von *PLAC8* für die Pankreastumorzelllinien spielt und ob die Wahl verschiedener Endpunkte von *PLAC8* relevant ist.

4.1 Rekombinante ΔExon 2-Varianten können endogenes *PLAC8* nicht ersetzen

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Klone der Zelllinie BON1 generiert werden, die nach dem *PLAC8*-Knockout nur noch das rekombinante *PLAC8*-Konstrukt E1Δ2 oder E2Δ2 exprimierten. Zwar konnten nach einer ersten Transfektion Klone erzeugt werden, die eines der Konstrukte integriert hatten, jedoch enthielten sie weiterhin das endogene *PLAC8*. Vermutlich haben die Klone auf je einem Allel das endogene und das exogene *PLAC8* exprimiert. Zudem überlebten einige Klone, die augenscheinlich nur das endogene *PLAC8* exprimierten. Nach einer

Selektion mit den Selektionsantibiotika dürfte das nicht möglich sein, da für das Überleben der Einbau der Resistenzkassetten notwendig war. Die Resistenzkassetten müssen an einer anderen Stelle als an der Schnittstelle von Cas9 im Genom integriert worden sein, damit sie die Selektion überleben konnten. Eine Möglichkeit ist, dass die Resistenzkassetten an einem zufälligen Ort im Genom integriert und gegebenenfalls sogar mehrfach exprimiert wurden. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Banden für den Nachweis der integrierten Resistenzkassette in der Gelelektrophorese (siehe Abb. 3) sehr schwach ausgeprägt und dadurch kaum sichtbar waren. Falls dies der Fall war, hätte es keine weiteren Auswirkungen auf den Verlauf der Untersuchungen gehabt, da diese Klone nicht für weitere Experimente ausgewählt wurden. Auch nach der zweiten Transfektion war ein vollständiger Knockout des endogenen *PLAC8*s auf beiden Allelen nicht möglich. Hier zeigte sich sogar eine Rückentwicklung einiger Klone, die kein rekombinantes *PLAC8* mehr exprimierten. Das war unter anderem möglich, weil die Klone in der zweiten Transfektion die Resistenzen der ersten Selektion nicht mehr benötigten. Sie konnten ohne Puromycin- und G418-Resistenz die Selektion mit Blasticidin überleben. Diese Ergebnisse bestätigen zunächst die Hypothese, dass die Zellen ohne das endogene *PLAC8* nicht überleben können. Ähnliche Ergebnisse konnten in den Vorarbeiten innerhalb der AG Buchholz bereits gezeigt werden (Kuhl 2019, Stark 2022). Erweiternd wurde untersucht, welche Rolle Exon 2 von *PLAC8* spielt und ob verschiedene Endpunkte innerhalb von *PLAC8* möglich sind.

Insgesamt wurden 142 Klone (erste Transfektion: 71; zweite Transfektion: 71) untersucht, bei denen der Rescue-Versuch von *PLAC8* mit rekombinanten Konstrukten nicht erfolgreich war. Es ist davon auszugehen, dass dies eine ausreichend hohe Anzahl an Klonen darstellt, um eine Integration der Konstrukte auf beiden Allelen der BON1-Zellen zu ermöglichen. Es ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass bei einer höheren Anzahl an Klonen eine Integration möglich wäre. Aufgrund der Durchführung einer zweiten Transfektion bei bereits integriertem Konstrukt ist dieses Szenario jedoch sehr unwahrscheinlich. Es gibt verschiedene mögliche Erklärungsansätze für den nicht-erfolgreichen *PLAC8*-Knockout: (1) Die verwendeten Konstrukte weichen strukturell oder sequenziell zu stark von dem endogenen *PLAC8* ab, sodass sie es nicht ersetzen können. Ansatzpunkte stellen hier das fehlende Exon 2 und die Wahl der verschiedenen Endpunkte dar. (2) Durch den Einbau der XhoI-Schnittstelle innerhalb von Exon 4 wurden essenzielle Sequenzen der Konstrukte gestört. (3) *PLAC8* agiert in den Zellen als long non-coding RNA (lncRNA), sodass der Transkriptions- und Spleißprozess für das Überleben entscheidend ist. Der zweite Aspekt wird ausführlich im folgenden Kapitel 4.1 diskutiert.

Der erste Punkt lässt sich anhand von Vorarbeiten der AG Buchholz bewerten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *PLAC8* (inklusive Exon 2) nicht proteinkodierend und PLAC8 nicht für das

Zellüberleben notwendig ist (Kuhl 2019; Stark 2022). Bei einem Rescue-Versuch mit S2-007-Zellen eines PDACs zeigte die Sequenzierung der Klone, dass nicht alle *PLAC8*-exprimierenden Klone auch die gesamte Sequenz von Exon 2 exprimierten (Stark 2022). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass nicht alle Anteile von Exon 2 für das Zellüberleben notwendig sind. Möglicherweise haben in diesen Untersuchungen nur die Klone überlebt, die essenzielle Sequenzen von Exon 2 weiterhin exprimierten. Die Klone, bei denen eben diese Sequenzen gestört waren, zeigten sich apoptotisch. Das wäre ein Erklärungsansatz dafür, dass in der vorliegenden Arbeit keine Klone mit integrierten Konstrukten E1Δ2 oder E2Δ2 und Knockout des endogenen *PLAC8* erzielt werden konnten. In späteren Versuchen war auch bei den S2-007-Zellen ein vollständiger *PLAC8*-Knockout und Ersatz durch ein Konstrukt ohne Exon 2 nicht erfolgreich (Stark 2022). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass nicht alle Sequenzen von *PLAC8* lebensnotwendig für BON1-Zellen sind und ggf. notwendige Sequenzen bei einem kompletten Ersatz von Exon 2 fehlen. Hier scheint es Ähnlichkeiten zwischen den Zelllinien S2-007 und BON1 zu geben. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft und wird im folgenden Kapitel erneut aufgegriffen und diskutiert. Eine alternative Erklärung für die nicht-erfolgreiche Integration der Konstrukte E1Δ2 oder E2Δ2 könnte die Wahl der verkürzten Endpunkte sein. Möglicherweise konnten die Klone nach einer vollständigen Integration der Konstrukte nicht überleben, weil ihnen essenzielle Sequenzen fehlten, die downstream von den Endpunkten „Ende 1“ und „Ende 2“ lagen (d.h. im verlängerten 3‘-untranslatierten Bereich).

Der dritte Aspekt thematisiert die Möglichkeit von *PLAC8* als lncRNA. Unter lncRNA versteht man RNA-Moleküle, die eine Länge von > 200 Nukleotiden besitzen und nicht für Proteine kodieren. Dennoch haben sie durch Wechselwirkung mit DNA, RNA und Proteinen vielfältige Funktionen wie die Regulation der Genexpression durch epigenetische Modifikationen, Regulation von Signalwegen und dem Zellzyklus. Die Wirkungen sind vielfältig und unterscheiden sich je nach lncRNA (Gil und Ulitsky 2020; Yan und Bu 2021). LncRNA können als Suppressoren oder Onkogene eine wichtige Rolle in der Proliferation und Progression von Tumoren spielen. So entdeckten Xia et al. (2020), dass das Vorkommen der lncRNA *EPIC1* in Pankreaskarzinomen mit einer höheren Metastasierungsrate und einem verstärkten Tumorwachstum korrelierte. Eine spezifische Inhibition von *EPIC1* führte zu einem Zelluntergang in den Pankreaskarzinomzellen (Xia et al. 2020). Die Einteilung der lncRNAs erfolgt anhand ihres Transkriptionsortes und des Wirkortes. Trans-aktive lncRNA wirkt an einem anderen Ort als ihrem Transkriptionsort, meist im Zellkern oder im Zytoplasma. Cis-aktive lncRNA hingegen wird transkribiert und wirkt direkt an ihrem Entstehungsort durch Anreicherung in der Nähre von regulatorischen Sequenzen. Oft werden cis-aktive lncRNAs von proteinkodierenden Sequenzen flankiert und regulieren dessen Transkription (Gil und Ulitsky 2020). In S2-007-Zellen konnte bisher nicht beobachtet werden,

dass *PLAC8* seine flankierenden Sequenzen regulatorisch beeinflusst. Hier wurden die benachbarten Gene *E2F1*, *E2F2*, *E2F5*, *HYOU1*, *CHPT1*, *TGOLN2* und *B3GALT5* untersucht (Stark 2022). Damit ist es eher unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen, dass *PLAC8* als cis-aktive lncRNA in BON1-Zellen wirkt. Zum endgültigen Ausschluss sollten ähnliche Untersuchungen mit den Zellen eines pNETs wiederholt werden. Unter diesen Annahmen ist es möglich, dass *PLAC8* als trans-aktive lncRNA wirkt und durch CRISPR/Cas9 nicht am richtigen Ort im Zellkern oder im Zytoplasma eingebracht wurde. In anderen Experimenten konnte trans-aktive lncRNA bereits exogen zugeführt werden (Gil und Ulitsky 2020). Im vorliegenden Fall könnte, unter der Annahme *PLAC8* wirke als lncRNA, die Konzentration nicht ausreichend gewesen sein oder *PLAC8* hat den endgültigen Wirkort nicht erreicht. Zudem besteht die Möglichkeit, dass nicht die lncRNA selbst entscheidend für die Beeinflussung der Genexpression ist, sondern der Prozess der Transkription oder des Spleißens der lncRNA eine tragende Rolle spielt (Engreitz et al. 2016; Kopp und Mendell 2018). In diesem Fall würde ein Ersatz der lncRNA durch die Konstrukte nicht den gleichen Effekt auf die Genexpression haben wie der Entstehungsprozess der lncRNA.

Ergänzend sollten mögliche methodische Fehler berücksichtigt werden. Sie können in einer fehlerhaften Selektion, einer gestörten Guide-RNA oder einer misslungenen Integration der Zielsequenz mit CRISPR/Cas9 liegen. Für die erfolgreiche Selektion war eine Integration der Resistenzkassetten gegen Puromycin und G418 notwendig. Die Resistenzkassette gegen Puromycin wies den *PLAC8*-Knockout nach und die Resistenzkassette gegen G418 zeigte die erfolgreiche Konstruktintegration. Nur bei Integration beider Antibiotikaresistenzen konnten die Zellen die Selektion überleben. Abschließend wurde der Integrationserfolg der Blasticidin-Resistenz mit einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Daher ist ein Fehler in der Selektion sehr unwahrscheinlich. Nach der ersten Transfektion wurden die Klone sequenziert, um die Intaktheit der Bindungsstelle für die Guide-RNA 1 zu überprüfen. Es wurden nur mit Klonen mit einer ausreichenden Sequenz weitergearbeitet. Daher ist eine fehlerhafte Methodik auch an dieser Stelle sehr unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit stellt die misslungene Transfektion der Konstrukte mittels CRISPR/Cas9 dar. Dadurch hätte die Resistenzkassette nicht an der Schnittstelle von Cas9 integriert werden können, sondern wäre an einer zufälligen Stelle im Genom integriert worden. Dieser Aspekt ist ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da bereits andere Experimente in der AG Buchholz mit CRISPR/Cas9 durchgeführt wurden und die Methode sequenziell bestätigt wurde (Stark 2022). Zudem handelt es sich bei der Genom-Editierung um eine seit langem etablierte und vielfach verwendete Methode (Jinek et al. 2012). Insgesamt sind methodische Fehler in der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen, aber die Wahrscheinlichkeit des Einflusses möglicher Fehler auf die Ergebnisse ist eher gering.

4.2 Die Schnittstelle XhoI hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Im Folgenden wird der zweite Aspekt der o.g. Auflistung beleuchtet. Es wird diskutiert, ob bei den Versuchen relevante Abschnitte von *PLAC8* gestört wurden, die für das Überleben der Zellen relevant waren. Um auszuschließen, dass die Zellen aufgrund einer Störung der Genomsequenz innerhalb von Exon 4 durch Einfügen der Schnittstelle XhoI nicht überlebensfähig waren, wurde mit einer weiteren Schnittstelle gearbeitet. Die Konstrukte E1Nae und E2Nae enthalten im Gegensatz zum ersten Teil der Untersuchungen Exon 2. Zudem wurde hier die Schnittstelle NaeI zur Unterscheidung zwischen dem endogenen *PLAC8* und den Konstrukten integriert. NaeI liegt innerhalb von Exon 2, was laut vorangegangenen Arbeiten variable Anteile zu haben scheint. In den Konstrukten wurde die Schnittstelle NaeI an einer Stelle im Genom eingefügt, die in einigen Klonen völlig fehlte (Stark 2022). Daher ist zu vermuten, dass die NaeI-Schnittstelle keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Hier wurden erneut zwei Konstrukte verwendet, die die Endpunkte „Ende 1“ und „Ende 2“ aufweisen. Dass auch in diesem Versuchsteil keine Klone erzeugt werden konnten, kann ebenfalls verschiedene Ursachen haben. Die Möglichkeit methodischer Fehler (siehe Kapitel 4.1) besteht auch bei diesen Experimenten, ist aber unwahrscheinlich. Zusätzlich wurde hier eine qPCR durchgeführt, um Ablesefehler oder Ungenauigkeiten bei der Gelelektrophorese auszuschließen. Dadurch wurde eine mögliche Fehlerquelle überprüft und ausgeschlossen. Durch diese Untersuchungen wird die Hypothese wahrscheinlicher, dass die Zellen der Zelllinie BON1 ohne die vollständige Sequenz von *PLAC8* bzw. insbesondere von Exon 2 nicht überlebensfähig sind.

Insgesamt konnten keine Klone ohne endogenes *PLAC8* generiert werden, die stattdessen ein exogenes Konstrukt integriert hatten. Nach der Diskussion von alternativen Hypothesen scheinen zwei Hypothesen führend zu sein. Entweder waren die angebotenen *PLAC8*-Konstrukte strukturell nicht in der Lage das endogene *PLAC8* zu ersetzen oder *PLAC8* agiert in BON1-Zellen als cis- oder trans-aktive lncRNA. Hier ist möglicherweise der Transkriptions- oder Spleißprozess der RNA relevant. Dieser Zusammenhang wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen von S2-007-Zellen bestätigt. Auch hier war es nicht möglich, das endogene *PLAC8* durch Konstrukte ohne Exon 2 oder mit alternativen Endpunkten zu ersetzen.

4.3 CIP2A beeinflusst verschiedene Zellzyklusmodulatoren

Neben *PLAC8* stellt auch *CIP2A* einen wichtigen Regulator in der Tumorprogression von Pankreaskarzinomen dar. Eine hohe CIP2A-Expression geht mit einer schlechten Differenzierung, einer höheren Metastasierungsrate und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einher (Birkman et al. 2018; Nagelli und Westermarck 2023; Soofiyani et al.

2017; Xu et al. 2016; Zhu und Wei 2021). In Zusammenarbeit mit der AG Kestler des Institute of Medical Systems Biology der Universität Ulm wurden Hypothesen bezüglich der Beeinflussung von Zellzyklusmodulatoren nach der Inhibition von *CIP2A* aufgestellt. Die AG Kestler arbeitete hier mit dem Boole'schen Netzwerk zur Vorhersage von zellulären Prozessen (Kühlwein 2021; Schwab et al. 2020). Vor dem Hintergrund der in der Literatur beschriebenen Relevanz von *CIP2A* ist die weitergehende Erforschung von *CIP2A* ein Ziel dieser Arbeit. Zudem sollte der Einfluss von *CIP2A* auf verschiedene Zellzyklusmodulatoren auf RNA- und Proteinebene untersucht werden. Besonders interessiert hierbei der Vergleich von pNEN und PDAC und mögliche Unterschiede zwischen beiden Tumorentitäten. Aus der aktuellen Literatur ergibt sich die Möglichkeit für einen zukünftigen Therapieansatz durch die Störung der Proliferation von pNEN oder einer gesteigerten Chemosensitivität. Zudem werden kontinuierlich weitere Ähnlichkeiten zwischen pNEC und PDAC festgestellt, woraus sich die Frage eines gemeinsamen Therapieansatzes ergibt (Gao et al. 2020). Aus diesen Gründen wurde sowohl das Zielgen *CIP2A* untersucht als auch die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von pNEC und PDAC spezifiziert.

4.3.1 Der CIP2A/ PP2A/ AKT-Signalweg

Nach der Inhibition von *CIP2A* mit TD52 wurde der Inhibitionserfolg anhand eines MTT-Assays, einer qPCR und eines Western Blots signifikant bestätigt. Damit führt TD52 in den Zelllinien BON1 und S2-007 zu einer Herunterregulation von *CIP2A* auf RNA- und Proteinebene. Diese Ergebnisse wurden bisher ebenfalls an verschiedenen Zellen des hepatozellulären Karzinoms und im Mausmodell gezeigt (Chen et al. 2010; Yang et al. 2018; Yu et al. 2014). Durch den Verlust der Viabilität im MTT-Essay werden die proliferativen Effekte von *CIP2A* auf Tumorzellen gezeigt, was anhand von kolorektalen und hepatozellulären Karzinomzellen bestätigt werden konnte (Chen et al. 2020; Yang et al. 2018). *CIP2A* wirkt als Onkogen und dient als spezifischer Inhibitor des Tumorsuppressors PP2A. PP2A dephosphoryliert AKT an den Stellen Ser473 und Thr308, wodurch AKT gehemmt wird. Durch die Inhibition von AKT wird unter anderem die Zellproliferation inhibiert und die Apoptose stimuliert (Birkman et al. 2018; Liu et al. 2013; Luque et al. 2022). Zudem wird über die Stabilisierung von c-Myc Cyclin D1 stabilisiert, was zu einem Zellzyklusprogress und zur Zellproliferation führt (Birkman et al. 2018; Wan et al. 2023).

Bezüglich *PP2A* zeigten sich überraschende Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit. Es wurde eine signifikant deutlich verminderte Expression von *PP2A* auf RNA- und Proteinebene durch die Inhibition von *CIP2A* beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der aktuellen Literatur und stimmen nicht mit den Hypothesen der AG Kestler der Universität Ulm überein (Junttila et al. 2007; O'Connor et al. 2018; Chen et al. 2010). In beiden Zelllinien wird durch die Inhibition von *CIP2A* von einer erhöhten Expression von *PP2A* ausgegangen. Durch das

Wegfallen der *PP2A*-spezifischen Inhibition durch *CIP2A* müsste *PP2A* vermehrt exprimiert werden. Diese Ergebnisse zeigten sich bereits bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms, triple-negativem Brustkrebs und leukämischen Zellen (Chen et al. 2010; Liu et al. 2013; Liu et al. 2017b; Liu et al. 2017a). Eine Übertragung auf die Zellen des pNETs und des PDACs war hier experimentell nicht möglich. Strukturelle Faktoren von dem Protein PP2A sind hier ein möglicher Erklärungsansatz. In der Literatur werden drei Untereinheiten von PP2A beschrieben. Die Untereinheit PP2A-A bildet die Basis des Enzyms, PP2A-B wirkt regulatorisch und PP2A-C ist ein katalytischer Baustein. PP2A-B kommt in verschiedenen Isoformen vor und unterscheidet sich im Expressionslevel stark je nach Zelllinie und Gewebetyp (Chen et al. 2010; O'Connor et al. 2018). Möglicherweise ist im pankreatischen Gewebe bzw. in Zellen von pNET und PDAC eine Isoform von PP2A-B exprimiert, die durch die Inhibition von *CIP2A* weniger beeinflusst wird, sodass es trotzdem zu einer verringerten Expression von PP2A kommt. In einer Untersuchung von Chen et al. (2010) wurde ein Zellreihe eines hepatozellulären Karzinoms ermittelt, die eine Resistenz gegen den *CIP2A*-Inhibitor Bortezomib aufwies. Während in anderen Zelllinien durch den *CIP2A*-Inhibitor eine Hochregulation von PP2A beobachtet wurde, konnte dieser Effekt bei einer Zelllinie nicht nachgewiesen werden. Eine ähnliche Resistenz könnte auch in diesem Fall vorliegen (Chen et al. 2010). Hier wurde keine verminderte Expression von dem Protein PP2A nach der *CIP2A*-Inhibition durch Bortezomib beobachtet, obwohl p-AKT herunterreguliert wurde. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass dieser Effekt der Herunterregulation weder auf eine Verminderung des Proteinlevels von PP2A noch auf die Bindungsaffinität zwischen PP2A und AKT zurückzuführen ist. Stattdessen vermutete sie eine Verringerung der AKT-spezifischen PP2A-Aktivität, die zu einer verminderten Proteinexpression von AKT führt (Chen et al. 2010; Liu et al. 2017b). Diese Beobachtungen erklären noch nicht die in der vorliegenden Arbeit signifikant verringerte PP2A-Expression, aber sie eröffnen neue Möglichkeiten. Methodische Fehler in Form einer Dysfunktion von TD52 sind hier sehr unwahrscheinlich, da die Inhibition von *CIP2A* und damit die Wirksamkeit von TD52 durch MTT-Assays, qPCR und Western Blots gezeigt wurde. Diese Ergebnisse ergeben neue Forschungsansätze und zeigen, dass noch längst nicht alle Faktoren der Onkogenese bekannt sind. Vergleichend könnten ähnliche Experimente mit weiteren pankreatischen Karzinomzellen durchgeführt werden oder es könnte ein anderer *CIP2A*- Inhibitor getestet werden. Auch die Herunterregulation von *CIP2A* durch siRNAs stellt einen möglichen Forschungsansatz dar.

In der Literatur sind *CIP2A* und *AKT* als Onkogene beschrieben, die zu einem Proliferationsstopp bei verschiedenen Zelltypen führen (Liu et al. 2017a). Auch die Modell-gestützte Vorhersage für pNET- und PDAC-Zellen ging von einer verminderten Expression von AKT durch die Inhibition von *CIP2A* aus. Dadurch würde es zu einem Zellzyklusstopp und zu einer Enthemmung der

Apoptose durch AKT kommen. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Hypothesen nicht anhand signifikanter Ergebnisse belegt werden, doch sind bei den S2-007-Zellen Tendenzen einer Herunterregulation erkennbar. Diese Ergebnisse würden sich mit den Erwartungen der aktuellen Literatur decken. Für signifikante Ergebnisse sollten die Untersuchungen mit einer höheren Anzahl an biologischen Replikaten wiederholt werden.

Dadurch, dass *PP2A* die Aktivität von AKT durch die Dephosphorylierung an den Stellen Ser473 und Thr308 reguliert, ergibt sich eine weitere Arbeitshypothese. Auf dieser Grundlage wurde die Überlegung angestellt, dass die Untersuchung der Expression von p-AKT eine höhere Aussagekraft haben könnte. In mehreren Arbeiten wurde eine signifikante Herunterregulation von dem phosphorylierten Protein p-AKT nach der Inhibition von *CIP2A* gezeigt. Diese Ergebnisse konnten in Brustkrebszellen und Zellen des kolorektalen Karzinoms ermittelt werden (Chen et al. 2010; Chen et al. 2020; Luque et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit konnte p-AKT trotz mehrfacher Versuche in beiden Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Es wurde der p-AKT-Antikörper verwendet, der das Ser473-phosphorylierte Protein AKT nachweist. Bei Chen et al. (2010) wurde *CIP2A* mittels Bortezomib inhibiert und es konnte eine Herunterregulation der Ser473-Phosphorylierung beobachtet werden nicht aber der Thr308-Phosphorylierung (Chen et al. 2010). Diese Untersuchungen zeigen, dass auch eine separate Regulation der beiden Phosphorylierungsstellen möglich ist. Es könnte daher sein, dass in den untersuchten Zelllinien BON1 und S2-007 hauptsächlich die Phosphorylierung von AKT an Thr308 vorliegt und Ser473 unphosphoryliert bleibt. An Tumorzellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Thr308 ein Aktivitätsmarker für AKT sein kann (Vincent et al. 2011). Die Phosphorylierung an Ser473 könnte unterhalb der Nachweisgrenze liegen, sodass eine Messung mit dem Antikörper p-AKT (Ser473) nicht möglich war. Zudem sind methodische Fehler im Sinne einer Dysfunktion des Antikörpers nicht sicher auszuschließen. Insgesamt liefern die Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zur weiteren Erkenntnisgewinnung.

4.3.2 RPS6 und p-RPS6

RPS6 ist ein ribosomales Protein der kleinen Untereinheit und stellt somit einen wichtigen Regulator der Translation und der DNA-Reparatur von gesunden und Tumorzellen dar. RPS6 besitzt fünf Stellen, an denen es durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden kann. Die S6 Kinase 1 kann RPS6 an Ser235/236 phosphorylieren und damit zu p-RPS6 umwandeln. RPS6 wirkt tumorsuppressiv und leitet die Apoptose ein, wohingegen p-RPS6 die Zellproliferation fördert (Yi et al. 2021). Das hier untersuchte RPS6 wurde an Ser235/236 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Das Modell der Ulmer Arbeitsgruppe rechnete mit einer verringerten Expression der Proteine RPS6 und p-RPS6. Diese Hypothese konnten teilweise bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Inhibition von *CIP2A* in den S2-007-Zellen eine signifikant verringerte Expression von RPS6 gezeigt. In den Zellen BON1 konnten keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden, doch zeigte sich eine Tendenz zur Heraufregulation von RPS6 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum besseren Verständnis der Regulation und Aktivität von RPS6 wurde zusätzlich die Menge des phosphorylierten Proteins p-RPS6 ermittelt. Hier zeigte sich bei beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion nach der *CIP2A*-Inhibition.

In der Literatur wurde bereits eine Beeinflussung von RPS6 und dessen Phosphorylierung durch *PP2A* und AKT gezeigt. Über eine Aktivierung des PI3K/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegs kann die Phosphorylierung von RPS6 reguliert und gesteigert werden (Yi et al. 2021). In Tumorzellen führt die Hochregulation von p-RPS6 zu einer vermehrten Zellproliferation, zu gesteigertem Zellwachstum und einer höheren Translation. Durch die Phosphorylierung von RPS6 gilt p-RPS6 als spezifischer Marker der mTOR-Aktivität (Mohamed et al. 2022). In Studien korrelierten hohe Level von p-RPS6 zudem mit einer Medikamentenresistenz in Zellen von Magenkrebs und Brustkrebs (Hu et al. 2023; Yang-Kolodji et al. 2015). Im Gegensatz dazu führen hohe Level von dephosphoryliertem RPS6 zu einer Apoptose der Zelle. Insgesamt führen hohe AKT-Expressionen zu einer vermehrten Phosphorylierung von RPS6 und eine Inhibition von AKT führt zu einer Dephosphorylierung von RPS6 (Mohamed et al. 2022). Diese Beobachtungen stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da hier eine Herunterregulation von *CIP2A* und die damit einhergehende verminderte Expression von AKT ebenfalls zu einer Herunterregulation bzw. Dephosphorylierung von p-RPS6 führt. Diese Ergebnisse konnten für die BON1-Zellen in Form einer Hochregulation von RPS6 und für beide Zelllinien in einer Herunterregulation von p-RPS6 gezeigt werden. In der Literatur wurde in Zelllinien von Lungenkrebs eine Hochregulation von unphosphoryliertem RPS6 beobachtet, die zu einem Zellzyklusarrest führte. In diesem Zusammenhang wurde eine verringerte Expression von Cyclin D und erhöhte Expressionen der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 gemessen (Yi et al. 2021). Diese Daten unterstützen die tumorsuppressive Funktion von RPS6 und bestärken die Hypothese der vorliegenden Arbeit.

Durch diese Erkenntnisse lässt sich noch nicht die verringerte Proteinexpression von RPS6 in den Zellen S2-007 erklären. In Mäusen mit Ovarialkarzinomen wurden Mutationen in Form eines Funktionsverlusts von *Pten* und einer verstärkten Aktivierung von *Kras* beobachtet. Diese führen in den Ovarialkarzinomzellen zu einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegs, was zu einer vermehrten Expression von p-rps6 führt. Die Spiegel von rps6 werden gesenkt, da die Proteine zu p-rps6 phosphoryliert werden (Kinross et al. 2011). Beide Mutationen kommen ebenso in PDAC vor und könnten daher eine Überlebensstrategie des Tumors darstellen. Durch die Herunterregulation von RPS6 entgehen die Zellen dem Apoptosereiz und können

proliferieren. Guccini et al. (2023) beobachteten in Zellen eines PDACs bei den vorhandenen Mutationen *PTEN* und *KRAS* eine gestörte Regulation des PI3K/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegs. Auch in ihren Beobachtungen wurde eine verringerte Expression von RPS6 ermittelt, wodurch die vorliegenden Ergebnisse weiter gestützt werden (Guccini et al. 2023).

4.3.3 Cyclin D1 und Cyclin E

Die Cycline D1 und E spielen als Zellzyklusregulatoren eine wichtige Rolle in der Proliferation von gesunden und von Tumorzellen (Chu et al. 2021; Montalto und Amicis 2020). Dadurch ist das für Cyclin D1 kodierende Gen CCND1 in Tumoren häufig von Dysregulationen betroffen (Chu et al. 2021; Tchakarska und Sola 2020). Auf Grundlage der Daten der AG Kestler wurde eine verringerte Expression der Cycline erwartet. Diese Hypothesen konnten nur teilweise repliziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nach der Inhibition von *CIP2A* eine signifikant verminderte Expression der Proteine Cyclin D1 und Cyclin E in BON1-Zellen nachgewiesen. Für *Cyclin D1* wurden keine signifikanten Ergebnisse ermittelt. Die Herunterregulation der Cycline spricht für eine Hemmung des Zellzyklus. In den Zellen S2-007 wurde eine signifikante Hochregulation der RNA *Cyclin D1* gemessen. Zudem konnten für die Expression der Proteine Cyclin D1 und Cyclin E Tendenzen einer Hochregulation beobachtet werden. Eine vermehrte Expression der Cycline D1 und E geht mit einer Stimulation des Zellzyklus und mit einem Tumorprogress einher. Um Ausreißer auszugleichen und signifikante Ergebnisse zu erzielen, sollten die Untersuchungen mit einer größeren Stichprobe wiederholt werden.

4.3.4 Die Zellzyklusinhibitoren p18, p21 und p27

p18, p21 und p27 gehören zu den Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen und sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit wurde für *p18* bei beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der RNA-Expression nach der *CIP2A*-Inhibition beobachtet. In den BON1-Zellen zeigte sich eine signifikante Herunterregulation von *p27*. In den S2-007-Zellen wurde eine signifikante Hochregulation von *p21* und *p27* beobachtet. Auf der Proteinebene zeigten sich in beiden Zelllinien sowohl für p21 als auch für p27 keine signifikanten Ergebnisse. Bei alleiniger Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf eine Hoch- oder eine Herunterregulation zeigte die Untersuchung der Proteine p21 und p27 in den S2-007-Zellen in allen bzw. in einem Großteil der Replikate eine Hochregulation. Durch die breite Streuung der Ergebnisse ließ sich rechnerisch keine Signifikanz ermitteln. Dennoch zeigen die Ergebnisse deutliche Tendenzen. Bei den BON1-Zellen zeigte sich bei 100 % der Versuchsdurchführungen eine Herunterregulation des Proteins p21. Die AG Kestler aus Ulm vermutete eine Erhöhung aller Zellzyklusinhibitoren in beiden Zelllinien nach der Inhibition von *CIP2A*, was zu einer Inhibition des Zellzyklus führen würde. Für die Ermittlung eindeutigerer Daten sollten die Versuche mit einer höheren Replikatzahl

durchgeführt werden als in dieser Übersichtsarbeit. Zudem wird hier eine Limitierung der Statistik aufgezeigt, die es auch bei weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen gilt.

Bei den Untersuchungen fällt auf, dass sich die Ergebnisse hinsichtlich der verschiedenen Zelllinien bei den Cyclinen und den Zellzyklusinhibitoren unterscheiden. Ein Erklärungsansatz könnte das Vorkommen verschiedener Mutationen in pNEN und PDAC sein. Es besteht noch weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der Einflüsse beider Modulatoren auf pankreatische Karzinome, wie die vorliegende Arbeit verdeutlicht.

4.3.5 Claudin-4 als Repräsentant der Tight junctions

Claudin-4 kodiert für ein Transmembranprotein, das die parazelluläre und interzelluläre Permeabilität reguliert (Neesse et al. 2012; Wang et al. 2023). Die AG Kestler aus Ulm vermutete eine erhöhte Expression von *Claudin-4* nach einer Inhibition von *CIP2A*. Dadurch würde die Zelladhäsion durch Tight junctions verstärkt werden. Anhand der p-Werte ließ sich keine signifikante Überexpression von *Claudin-4* ermitteln, aber es ließen sich Tendenzen erkennen. Besonders in den BON1-Zellen zeigte sich in allen Versuchsdurchführungen (n = 4) eine Hochregulation von Claudin-4. Aufgrund einer breiten Verteilung der Hochregulation konnte keine Signifikanz festgestellt werden. In den Zellen S2-007 konnte Claudin-4 trotz mehrfacher Wiederholungen nicht nachgewiesen werden.

In der Literatur wurde eine Korrelation zwischen der Expressionshöhe von *Claudin-4* und dem histologischen Tumorgrad von IPMN und PanIN, den Vorstufen des Pankreaskarzinoms, beobachtet (Neesse et al. 2012). Weiterhin konnten ähnliche Ergebnisse einer Überexpression in Pankreaskarzinomen beobachtet werden (Nichols et al. 2004; Wang et al. 2023). Gleichzeitig wurde eine erhöhte Expression von Claudin-4 und damit eine verstärkte Zelladhäsion mit einer verminderten Invasion von pankreatischen Tumorzellen assoziiert. Dadurch verbesserte sich die Prognose bei einer geringeren Metastasierungsrate (Michl et al. 2003; Neesse et al. 2012; Torres et al. 2020). Somit scheint Claudin-4 ein protektiver Faktor bei Pankreaskarzinomen zu sein (Michl et al. 2003; Torres et al. 2020; Wang et al. 2023). Hier sind noch weitere Untersuchungen notwendig und diese Übersichtsarbeit liefert einen wertvollen Beitrag zur aktuellen Forschung.

4.3.6 GLI1 als Teil des Hedgehog-Signalwegs

GLI1 ist als Onkogen ein Teil des Hedgehog-Signalwegs und reguliert darüber den Zellzyklus (Avery et al. 2021; Henao-Restrepo et al. 2021). In der AG Kestler wurde die Hypothese eines Expressionsstopps nach der Inhibition von *CIP2A* aufgestellt, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. In beiden Zelllinien konnten weder in den behandelten Replikaten noch in den Kontrollen eine *GLI1*-Expression gezeigt werden. Zum Ausschluss methodischer

Fehler wurde die Untersuchung mit den Zellen RMS13 eines Rhabdomyosarkoms wiederholt. Hier wurde die Expression von *GLI1* auf RNA-Ebene bestätigt. In der Literatur sind bisher keine ähnlichen Untersuchungen mit den Zelllinien BON1 und S2-007 durchgeführt worden. Daher ist es möglich, dass *GLI1* keine Rolle in der Tumorprogression dieser Zelllinien spielt und deshalb nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Erkenntnisse werfen weitere Fragen auf und verdeutlichen die Komplexität der Pankreaskarzinome.

4.3.7 Fazit

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Pankreaskarzinome in der Pathologie und in der Wechselwirkung ihrer Mutationen noch nicht vollständig verstanden sind. Daher sollten sie auch zukünftig im zentralen Interesse der Forschung stehen. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zu einem tieferen Verständnis von pNET und PDAC in Bezug auf deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede. In den pNET finden sich eher Mutationen in *MEN1* und *DAXX/ATRX*, wohingegen in PDAC eher die Gene *KRAS*, *CDKN2A* und *TP53* mutieren. Dadurch kann es zu einem gegenteiligen Einfluss der *CIP2A*-Inhibtion auf die Zellproliferation und auf die Regulation der Zellzyklusmodulatoren kommen. Diesbezüglich konnte ein genauerer Einblick gewonnen werden als die bisherige Literatur liefert. Anhand der Untersuchung von *PLAC8* konnte gezeigt werden, dass sich beide Zelllinien in Bezug auf ihre Beeinflussung durch Schlüsselgene unterscheiden. So scheint die RNA *PLAC8* und dessen Unversehrtheit eine zentrale Rolle für das Überleben der BON1-Zellen zu spielen. Für S2-007-Zellen wurde hingegen gezeigt, dass *PLAC8* nicht vollständig für das Zellüberleben benötigt wird. Im Hinblick auf die klinische Praxis können *PLAC8* und *CIP2A* Angriffspunkte für zukünftige Therapien darstellen. Besonders die Sensibilisierung für Chemotherapeutika durch die Inhibition von *CIP2A* könnte künftig eine Rolle spielen. Zum einen sollten einige der Untersuchungen nach *CIP2A*-Inhibition mit einer größeren Fallzahl wiederholt werden, um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Zum anderen empfiehlt es sich, weitere Zelllinien und Tumorentitäten hinzuzuziehen, um eine größere Heterogenität der Pankreaskarzinome abzudecken. Auch die Erforschung von *PLAC8* liefert einen wichtigen Beitrag zur Therapieentwicklung. So könnte eine therapeutische Inhibition von *PLAC8* zu einem Proliferationsstopp des Tumors und damit zu einer verbesserten Prognose von Pankreaskarzinomen führen. Insgesamt ist eine weitere Erforschung dieser Schüsselgene notwendig und sinnvoll, um die Therapiemöglichkeiten für Pankreaskarzinome auszuschöpfen. An die Experimente *in vitro* sollten Folgeuntersuchungen angeschlossen werden. Anschließend sind Experimente *in vivo* notwendig, um die Ergebnisse zunächst auf Versuchstiere und schlussendlich auf den Menschen übertragen zu können.

5. Zusammenfassung

Pankreaskarzinome haben eine der schlechtesten Prognosen unter den Tumorerkrankungen. Sie werden meist nicht nur spät diagnostiziert, sondern bieten kaum Therapiemöglichkeiten. Aufgrund ihrer heterogenen klinischen Erscheinung sind pankreatisch neuroendokrine Neoplasien (pNEN) eine Herausforderung in der Medizin. Aber auch die größte Gruppe der Pankreaskarzinome, die pankreatisch duktalen Adenokarzinome (PDAC) bringen die Medizin durch ihre hohe Mortalität an ihre Grenzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist das tiefere Verständnis beider Tumorentitäten und deren Vergleich. Anhand der Zielgene *Cancerous/ cellular inhibitor of protein phosphatase 2A* (*CIP2A*) und *Placenta-specific 8* (*PLAC8*) wurden pNEN und PDAC einander gegenübergestellt. Beide Zielgene spielen nachweislich eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation von Pankreaskarzinomen und vielen weiteren Tumorentitäten. In dieser Arbeit wurde mit CRISPR/Cas9 in Zellen eines pankreatisch neuroendokrinen Tumors (pNET) ein *PLAC8*-Knockout erzeugt und alternative Konstrukte angeboten. Diese Konstrukte waren veränderte Varianten von *PLAC8* mit abweichenden und/oder fehlenden Sequenzen. Dass *PLAC8* in den Zellen nicht ersetzt werden konnte, zeigt die Relevanz der unveränderten *PLAC8*-Expression für das Zellüberleben. Hier spielt möglicherweise *PLAC8* in Form einer long non-coding RNA eine Rolle. In einer weiteren Untersuchung wurde *CIP2A* mittels TD52 in pNET- und PDAC-Zellen spezifisch herunterreguliert. Anschließend wurden die Expressionslevel von verschiedenen Zellzyklusmodulatoren auf RNA- und auf Proteinebene ermittelt. Diese Daten zeigen, dass *CIP2A* besonders über die Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression und -regulation einnimmt. Bei dem Vergleich beider Zelllinien stellten sich einige Unterschiede heraus, die sich durch verschiedene Entstehungsmutationen von pNEN und PDAC erklären lassen. Durch diese Mutationen wird es den Tumorzellen ermöglicht, die gesunde Zellzyklusregulation und eine damit verbundene Apoptose zu umgehen.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit viele Gemeinsamkeiten und Unterschiede von pNEN und PDAC anhand der Zelllinien BON1 und S2-007 ermittelt werden, die therapeutisch relevant werden können. Sowohl *PLAC8* als auch *CIP2A* können als Angriffspunkte für zukünftige Therapien genutzt werden, weshalb diese Zielgene weiterhin untersucht werden sollten. Die Pathomechanismen beider Tumorentitäten sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden, ebenso wie die Rolle der untersuchten Zielgene. Einen Beitrag zum Verständnis von Pankreaskarzinomen liefert die vorliegende Arbeit.

6. Summary

Pancreatic carcinomas have one of the worst prognoses among tumor diseases. They are usually diagnosed late and offer few therapy options. Due to their heterogeneous clinical appearance, pancreatic neuroendocrine neoplasms (pNEN) pose a challenge in medicine. But even the largest group of pancreatic carcinomas, pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC), push medicine to its limits due to their high mortality.

The aim of this study was to deepen the understanding of both tumor entities and compare them. pNEN and PDAC were juxtaposed using the target genes *Cancerous/ cellular inhibitor of protein phosphatase 2A* (*CIP2A*) and *Placenta-specific 8* (*PLAC8*). Both target genes play an important role in the cell cycle regulation of pancreatic carcinomas and many other tumor entities. In this study, a *PLAC8* knockout was generated in cells of a pancreatic neuroendocrine tumor (pNET) using CRISPR/Cas9, and alternative constructs were offered. These constructs were modified variants of *PLAC8* with different and/or missing sequences. The inability to replace *PLAC8* in the cells demonstrates the relevance of unaltered expression of *PLAC8* for cell survival. *PLAC8* may play a role in the form of an long non-coding RNA. In another study, *CIP2A* was specifically downregulated in pNET and PDAC cells using TD52. Subsequently, the expression levels of various cell cycle modulators were determined at the RNA and protein levels. These data show that *CIP2A* plays a key role in tumor progression and regulation, particularly through the regulation of the PI3K/AKT signaling pathway. A comparison of both cell lines revealed some differences, which can be explained by various initiation mutations of pNEN and PDAC. These mutations enable tumor cells to bypass healthy cell cycle regulation and associated apoptosis.

Overall, many similarities and differences between pNEN and PDAC were identified in this study using the cell lines BON1 and S2-007, which can become therapeutically relevant. Both *PLAC8* and *CIP2A* can be used as targets for future therapies, which is why these target genes should continue to be investigated. The pathomechanisms of both tumor entities are not yet fully understood, nor is the role of the target genes examined. This study contributes to the understanding of pancreatic carcinomas.

7. Literaturverzeichnis

Abdelgalil, Ahmed A.; Al-Kahtani, Hamad M.; Al-Jenoobi, Fahad I. (2020): Erlotinib. In: *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* 45, S. 93–117. DOI: 10.1016/bs.podrm.2019.10.004.

Avery, Justin T.; Zhang, Ruowen; Boohaker, Rebecca J. (2021): GLI1: A Therapeutic Target for Cancer. In: *Frontiers in oncology* 11, S. 673154. DOI: 10.3389/fonc.2021.673154.

Birkman, Eva-Maria; Elzagheid, Adam; Jokilehto, Terhi; Avoranta, Tuulia; Korkeila, Eija; Kulmala, Jarmo et al. (2018): Protein phosphatase 2A (PP2A) inhibitor CIP2A indicates resistance to radiotherapy in rectal cancer. In: *Cancer medicine* 7 (3), S. 698–706. DOI: 10.1002/cam4.1361.

Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical biochemistry* 112 (2), S. 195–203. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.

Chen, K-F; Liu, C-Y; Lin, Y-C; Yu, H-C; Liu, T-H; Hou, D-R et al. (2010): CIP2A mediates effects of bortezomib on phospho-Akt and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. In: *Oncogene* 29 (47), S. 6257–6266. DOI: 10.1038/onc.2010.357.

Chen, Wei; Liang, Jing-Lin; Zhou, Kai; Zeng, Qing-Li; Ye, Jun-Wen; Huang, Mei-Jin (2020): Effect of CIP2A and its mechanism of action in the malignant biological behavior of colorectal cancer. In: *Cell communication and signaling : CCS* 18 (1), S. 67. DOI: 10.1186/s12964-020-00545-6.

Chu, Chen; Geng, Yan; Zhou, Yu; Sicinski, Piotr (2021): Cyclin E in normal physiology and disease states. In: *Trends in cell biology* 31 (9), S. 732–746. DOI: 10.1016/j.tcb.2021.05.001.

Deng, Boya; Zhang, Siyang; Zhou, Yingying; Zhu, Ying; Fei, Jing; Li, Ailin (2023): PLAC8 contributes to the malignant behaviors of cervical cancer cells by activating the SOX4-mediated AKT pathway. In: *Histochem Cell Biol* 159 (5), S. 439–451. DOI: 10.1007/s00418-022-02175-0.

Engreitz, Jesse M.; Haines, Jenna E.; Perez, Elizabeth M.; Munson, Glen; Chen, Jenny; Kane, Michael et al. (2016): Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. In: *Nature* 539 (7629), S. 452–455. DOI: 10.1038/nature20149.

Evers, B. M.; Ishizuka, J.; Townsend, C. M.; Thompson, J. C. (1994): The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 733, S. 393–406. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb17289.x.

Feng, Xuan; Wei, Zhi; Tao, Xiang; Du, Yan; Wu, Jing; Yu, Yinhua et al. (2021): PLAC8 promotes the autophagic activity and improves the growth priority of human trophoblast cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (3), e21351. DOI: 10.1096/fj.202002075RR.

Gao, He-Li; Wang, Wen-Quan; Yu, Xian-Jun; Liu, Liang (2020): Molecular drivers and cells of origin in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic neuroendocrine carcinoma. In: *Exp Hematol Oncol* 9 (1), S. 28. DOI: 10.1186/s40164-020-00184-0.

Gil, Noa; Ulitsky, Igor (2020): Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. In: *Nature reviews. Genetics* 21 (2), S. 102–117. DOI: 10.1038/s41576-019-0184-5.

Grant, T. J.; Hua, K.; Singh, A. (2016): Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. In: *Progress in molecular biology and translational science* 144, S. 241–275. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2016.09.008.

Guccini, Ilaria; Tang, Guanghui; To, Trang Thuy; Di Rito, Laura; Le Blanc, Solange; Strobel, Oliver et al. (2023): Genetic ablation of ketohexokinase C isoform impairs pancreatic cancer development. In: *iScience* 26 (8), S. 107368. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107368.

Halbrook, Christopher J.; Lyssiotis, Costas A.; Di Pasca Magliano, Marina; Maitra, Anirban (2023): Pancreatic cancer: Advances and challenges. In: *Cell* 186 (8), S. 1729–1754. DOI: 10.1016/j.cell.2023.02.014.

Henao-Restrepo, Julián; Caro-Urrego, Yudys Anggelly; Barrera-Arenas, Lina Marcela; Arango-Viana, Juan Carlos; Bermudez-Munoz, Maria (2021): Expression of activator proteins of SHH/GLI and PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathways in human gliomas is associated with high grade tumors. In: *Experimental and molecular pathology* 122, S. 104673. DOI: 10.1016/j.yexmp.2021.104673.

Hermann, Silke; Kraywinkel, Klaus (2019): Epidemiologie des Pankreaskarzinoms in Deutschland. In: *Onkologe* 25 (8), S. 647–652. DOI: 10.1007/s00761-019-0623-0.

Hu, Chun-Ting; Pei, Shao-Jun; Wang, Jing-Long; Zu, Li-Dong; Shen, Wei-Wei; Yuan, Lin et al. (2023): Quantitative proteomics profiling reveals the inhibition of trastuzumab antitumor efficacy by phosphorylated RPS6 in gastric carcinoma. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 92 (5), S. 341–355. DOI: 10.1007/s00280-023-04571-2.

Hu, Jian-Xiong; Zhao, Cheng-Fei; Chen, Wen-Biao; Liu, Qi-Cai; Li, Qu-Wen; Lin, Yan-Ya; Gao, Feng (2021): Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. In: *World Journal of Gastroenterology* 27 (27), S. 4298–4321. DOI: 10.3748/wjg.v27.i27.4298.

Huang, Mao-Ling; Qi, Cheng-Lin; Zou, You; Yang, Rui; Jiang, Yang; Sheng, Jian-Fei et al. (2020): Plac8-mediated autophagy regulates nasopharyngeal carcinoma cell function via AKT/mTOR pathway. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 24 (14), S. 7778–7788. DOI: 10.1111/jcmm.15409.

Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Junttila, Melissa R.; Puustinen, Pietri; Niemelä, Minna; Ahola, Raija; Arnold, Hugh; Böttzauw, Trine et al. (2007): CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. In: *Cell* 130 (1), S. 51–62. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.044.

Kaistha, Brajesh P.; Lorenz, Holger; Schmidt, Harald; Sipos, Bence; Pawlak, Michael; Gierke, Berthold et al. (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. In: *Cancer research* 76 (1), S. 96–107. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0216.

Kinross, Kathryn M.; Brown, Daniel V.; Kleinschmidt, Margarete; Jackson, Susan; Christensen, James; Cullinane, Carleen et al. (2011): In vivo activity of combined PI3K/mTOR and MEK inhibition in a Kras(G12D);Pten deletion mouse model of ovarian cancer. In: *Molecular cancer therapeutics* 10 (8), S. 1440–1449. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0240.

Kinsey, Conan; Balakrishnan, Vijaya; O'Dell, Michael R.; Huang, Jing Li; Newman, Laurel; Whitney-Miller, Christa L. et al. (2014): Plac8 links oncogenic mutations to regulation of

autophagy and is critical to pancreatic cancer progression. In: *Cell reports* 7 (4), S. 1143–1155. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.061.

Kopp, Florian; Mendell, Joshua T. (2018): Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. In: *Cell* 172 (3), S. 393–407. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.011.

Krejs, Guenter J. (2010): Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. In: *DDI* 28 (2), S. 355–358. DOI: 10.1159/000319414.

Kuhl, Anna (2019): CRISPR/Cas9 basiertes Genome Editing im PLAC8-Genlokus neuroendokriner Pankreastumorzellen. In: Masterthesis – Philipps-Universität Marburg

Kühlwein, Silke Daniela (2021): Modelling pathway crosstalk and dynamics with qualitative models. Universität Ulm. Online verfügbar unter https://oparu.uni-ulm.de/xmlui/handle/123456789/36472.

Lee, HyunJeong; Kim, Joo-Il; Park, Jin-Sung; Roh, Jae-Il; Lee, Jaehoon; Kang, Byeong-Cheol; Lee, Han-Woong (2018): CRISPR/Cas9-mediated generation of a Plac8 knockout mouse model. In: *Laboratory animal research* 34 (4), S. 279–287. DOI: 10.5625/lar.2018.34.4.279.

Liu, Chun-Yu; Huang, Tzu-Ting; Huang, Chun-Teng; Hu, Ming-Hung; Wang, Duen-Shian; Wang, Wan-Lun et al. (2017a): EGFR-independent Elk1/CIP2A signalling mediates apoptotic effect of an erlotinib derivative TD52 in triple-negative breast cancer cells. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 72, S. 112–123. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.11.012.

Liu, Chun-Yu; Shiau, Chung-Wai; Kuo, Hsin-Yu; Huang, Hsiang-Po; Chen, Ming-Huang; Tzeng, Cheng-Hwai; Chen, Kuen-Feng (2013): Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A determines bortezomib-induced apoptosis in leukemia cells. In: *Haematologica* 98 (5), S. 729–738. DOI: 10.3324/haematol.2011.050187.

Liu, H.; Qiu, H.; Song, Y.; Liu, Y.; Wang, H.; Lu, M. et al. (2017b): Cip2a promotes cell cycle progression in triple-negative breast cancer cells by regulating the expression and nuclear export of p27Kip1. In: *Oncogene* 36 (14), S. 1952–1964. DOI: 10.1038/onc.2016.355.

Lou, Xin; Ye, Zeng; Xu, Xiaowu; Jiang, Minglei; Lu, Renquan; Jing, Desheng et al. (2022): Establishment and characterization of the third non-functional human pancreatic neuroendocrine tumor cell line. In: *Human Cell* 35 (4), S. 1248–1261. DOI: 10.1007/s13577-022-00696-3.

Lucas, Claire M.; Scott, Laura J.; Carmell, Natasha; Holcroft, Alison K.; Hills, Robert K.; Burnett, Alan K.; Clark, Richard E. (2018): CIP2A- and SETBP1-mediated PP2A inhibition reveals AKT S473 phosphorylation to be a new biomarker in AML. In: *Blood advances* 2 (9), S. 964–968. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017013615.

Luque, Melani; Cristóbal, Ion; Sanz-Álvarez, Marta; Santos, Andrea; Zazo, Sandra; Eroles, Pilar et al. (2022): CIP2A as a Key Regulator for AKT Phosphorylation Has Partial Impact Determining Clinical Outcome in Breast Cancer. In: *Journal of clinical medicine* 11 (6). DOI: 10.3390/jcm11061610.

Ma, Zu-Yi; Gong, Yuan-Feng; Zhuang, Hong-Kai; Zhou, Zi-Xuan; Huang, Shan-Zhou; Zou, Yi-Ping et al. (2020): Pancreatic neuroendocrine tumors: A review of serum biomarkers, staging, and management. In: *World Journal of Gastroenterology* 26 (19), S. 2305–2322. DOI: 10.3748/wjg.v26.i19.2305.

Mao, Misha; Cheng, Yifan; Yang, Jingjing; Chen, Yongxia; Xu, Ling; Zhang, Xun et al. (2021): Multifaced roles of PLAC8 in cancer. In: *Biomarker research* 9 (1), S. 73. DOI: 10.1186/s40364-021-00329-1.

Michl, Patrick; Barth, Claudia; Buchholz, Malte; Lerch, Markus M.; Rolke, Monika; Holzmann, Karl-Heinz et al. (2003): Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. In: *Cancer research* 63 (19), S. 6265–6271. Online verfügbar unter https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14559813/.

Mohamed, Esraa; Kumar, Anupam; Zhang, Yalan; Wang, Albert S.; Chen, Katharine; Lim, Yunita et al. (2022): PI3K/AKT/mTOR signaling pathway activity in IDH-mutant diffuse glioma and clinical implications. In: *Neuro-Oncology* 24 (9), S. 1471–1481. DOI: 10.1093/neuonc/noac064.

Montalto, Francesca Ida; Amicis, Francesca de (2020): Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. In: *Cells* 9 (12). DOI: 10.3390/cells9122648.

Nagelli, Srikar; Westermarck, Jukka (2023): CIP2A coordinates phosphosignaling, mitosis, and the DNA damage response. In: *Trends in cancer*. DOI: 10.1016/j.trecan.2023.09.001.

Neesse, A.; Griesmann, H.; Gress, T. M.; Michl, P. (2012): Claudin-4 as therapeutic target in cancer. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 524 (1), S. 64–70. DOI: 10.1016/j.abb.2012.01.009.

Nichols, Lynette S.; Ashfaq, Raheela; Iacobuzio-Donahue, Christine A. (2004): Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. In: *American journal of clinical pathology* 121 (2), S. 226–230. DOI: 10.1309/K144-PHVD-DUPD-D401.

O'Connor, Caitlin M.; Perl, Abbey; Leonard, Daniel; Sangodkar, Jaya; Narla, Goutham (2018): Therapeutic targeting of PP2A. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 96, S. 182–193. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.10.008.

Park, Wungki; Chawla, Akhil; O'Reilly, Eileen M. (2021): Pancreatic Cancer: A Review. In: *JAMA* 326 (9), S. 851–862. DOI: 10.1001/jama.2021.13027.

Perren, A.; Schmitt, A.; Komminoth, P.; Pavel, M. (2009): Klassifikation gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren. In: *Radiologe* 49 (3), S. 198–205. DOI: 10.1007/s00117-008-1781-z.

Robert Koch Institut (2023): Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom), in: Zentrum für Krebsregisterdaten (07.12.2023), https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs.html, letzter Zugriff: 18.02.2024.

Rogulski, Kenneth; Li, Youjun; Rothermund, Kristi; Pu, Lixia; Watkins, Simon; Yi, Fenghua; Prochownik, Edward V. (2005): Onzin, a c-Myc-repressed target, promotes survival and transformation by modulating the Akt-Mdm2-p53 pathway. In: *Oncogene* 24 (51), S. 7524–7541. DOI: 10.1038/sj.onc.1208897.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732), S. 1350–1354. DOI: 10.1126/science.2999980.

Schott, Christina; Graab, Ulrike; Cuvelier, Nicole; Hahn, Heidi; Fulda, Simone (2015): Oncogenic RAS Mutants Confer Resistance of RMS13 Rhabdomyosarcoma Cells to Oxidative Stress-Induced Ferroptotic Cell Death. In: *Frontiers in oncology* 5, S. 131. DOI: 10.3389/fonc.2015.00131.

Schwab, Julian D.; Kühlwein, Silke D.; Ikonomi, Nensi; Kühl, Michael; Kestler, Hans A. (2020): Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? In: *Computational and structural biotechnology journal* 18, S. 571–582. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.03.001.

Scott, Aaron T.; Howe, James R. (2019): Evaluation and Management of Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. In: *The Surgical clinics of North America* 99 (4), S. 793–814. DOI: 10.1016/j.suc.2019.04.014.

Soofiyani, Saiedeh Razi; Hejazi, Mohammad Saeid; Baradaran, Behzad (2017): The role of CIP2A in cancer: A review and update. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 96, S. 626–633. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.146.

Stark, Maren (2017): Die Lokalisation und Funktion des Plac8-Proteins in verschiedenen transformierten und nicht-transformierten Zelllinien. In: Masterthesis – Philipps-Universität Marburg.

Stark, Maren (2022): Molecular biological analysis of the role of placenta-specific 8 in the context of tumour progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: Dissertation – Philipps-Universität Marburg.

Sun, Jian (2017): Pancreatic neuroendocrine tumors. In: *Intractable & rare diseases research* 6 (1), S. 21–28. DOI: 10.5582/irdr.2017.01007.

Takeshi IWAMURA; Taketo KATSUKI; Katsuhiko IDE (1987): Establishment and Characterization of a Human Pancreatic Cancer Cell Line (SUIT-2) Producing Carcinoembryonic Antigen and Carbohydrate Antigen 19-9. In: *Japanese Journal of Cancer Research GANN* 78 (1), S. 54–62. DOI: 10.20772/cancersci1985.78.1_54.

Taniguchi, S.; Iwamura, T.; Katsuki, T. (1992): Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) and sublines. In: *Clin Exp Metast* 10 (4), S. 259–266. DOI: 10.1007/BF00133561.

Tatura, Marina; Schmidt, Harald; Haijat, Mikail; Stark, Maren; Rinke, Anja; Diels, Ramona et al. (2020): Placenta-Specific 8 Is Overexpressed and Regulates Cell Proliferation in Low-Grade Human Pancreatic Neuroendocrine Tumors. In: *Neuroendocrinology* 110 (1-2), S. 23–34. DOI: 10.1159/000500541.

Tchakarska, Guergana; Sola, Brigitte (2020): The double dealing of cyclin D1. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 19 (2), S. 163–178. DOI: 10.1080/15384101.2019.1706903.

Torres, Julia Baguña; Mosley, Michael; Koustoulidou, Sofia; Hopkins, Samantha; Knapp, Stefan; Chaikuad, Apirat et al. (2020): Radiolabeled cCPE Peptides for SPECT Imaging of Claudin-4 Overexpression in Pancreatic Cancer. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 61 (12), S. 1756–1763. DOI: 10.2967/jnumed.120.243113.

Vincent, E. E.; Elder, D. J. E.; Thomas, E. C.; Phillips, L.; Morgan, C.; Pawade, J. et al. (2011): Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. In: *Br J Cancer* 104 (11), S. 1755–1761. DOI: 10.1038/bjc.2011.132.

Wan, Ledong; Lin, Kuan-Ting; Rahman, Mohammad Alinoor; Ishigami, Yuma; Wang, Zhikai; Jensen, Mads A. et al. (2023): Splicing Factor SRSF1 Promotes Pancreatitis and KRASG12D-Mediated Pancreatic Cancer. In: *Cancer discovery* 13 (7), S. 1678–1695. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-1013.

Wang, Chen; Wu, Na; Pei, Beibei; Ma, Xiaoyan; Yang, Wenhui (2023): Claudin and pancreatic cancer. In: *Frontiers in oncology* 13, S. 1136227. DOI: 10.3389/fonc.2023.1136227.

Wang, Jingxuan; Liu, Jianhua; He, Chao; Sun, Tiantian; Yan, Yan; Che, Gang et al. (2021): Trends in Incidence and Survival of Patients with Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm, 1987-2016. In: *Journal of oncology* 2021, S. 4302675. DOI: 10.1155/2021/4302675.

Wolf, med. Andrej (2019): Info für Zuweiser - neuroendokrine pankreastumore. Online verfügbar unter http://www.neuroendokrine-pankreastumore.de/arztinfo.html, zuletzt aktualisiert am 09.10.2019, zuletzt geprüft am 03.06.2023.

Wood, Laura D.; Canto, Marcia Irene; Jaffee, Elizabeth M.; Simeone, Diane M. (2022): Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. In: *Gastroenterology* 163 (2), 386-402.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.

Xia, Peng; Liu, Pan; Fu, Qiang; Liu, Chuanjiang; Luo, Qiankun; Zhang, Xu et al. (2020): Long noncoding RNA EPIC1 interacts with YAP1 to regulate the cell cycle and promote the growth of pancreatic cancer cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 522 (4), S. 978–985. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.11.167.

Xu, Peng; Yao, Jie; He, Jin; Zhao, Long; Wang, Xiaodong; Li, Zhennan; Qian, Jianjun (2016): CIP2A down regulation enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. In: *Oncotarget* 7 (12), S. 14831–14840. DOI: 10.18632/oncotarget.7447.

Yan, Huiwen; Bu, Pengcheng (2021): Non-coding RNA in cancer. In: *Essays in Biochemistry* 65 (4), S. 625–639. DOI: 10.1042/EBC20200032.

Yang, Xue; Qu, Kai; Tao, Jie; Yin, Guozhi; Han, Shaoshan; Liu, Qingguang; Sun, Hao (2018): Inhibition of CIP2A attenuates tumor progression by inducing cell cycle arrest and promoting cellular senescence in hepatocellular carcinoma. In: *Biochemical and biophysical research communications* 495 (2), S. 1807–1814. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.124.

Yang-Kolodji, Gloria; Mumenthaler, Shannon M.; Mehta, Arjun; Ji, Lingyun; Tripathy, Debu (2015): Phosphorylated ribosomal S6 (p-rpS6) as a post-treatment indicator of HER2 signalling targeted drug resistance. In: *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 20 (5), S. 313–322. DOI: 10.3109/1354750X.2015.1068865.

Yi, Yong Weon; You, Kyu Sic; Park, Jeong-Soo; Lee, Seok-Geun; Seong, Yeon-Sun (2021): Ribosomal Protein S6: A Potential Therapeutic Target against Cancer? In: *International journal of molecular sciences* 23 (1). DOI: 10.3390/ijms23010048.

Yu, H-C; Hung, M-H; Chen, Y-L; Chu, P-Y; Wang, C-Y; Chao, T-T et al. (2014): Erlotinib derivative inhibits hepatocellular carcinoma by targeting CIP2A to reactivate protein phosphatase 2A. In: *Cell Death Dis* 5 (7), e1359. DOI: 10.1038/cddis.2014.325.

Zhang, Yanqin; Hu, Qianghua; Li, Guixin; Li, Lili; Liang, Shoulei; Zhang, Yun et al. (2018): ONZIN Upregulation by Mutant p53 Contributes to Osteosarcoma Metastasis Through the CXCL5-MAPK Signaling Pathway. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48 (3), S. 1099–1111. DOI: 10.1159/000491976.

Zhu, Z.; Wei, Z. (2021): CIP2A silencing alleviates doxorubicin resistance in MCF7/ADR cells through activating PP2A and autophagy. In: *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 23 (8), S. 1542–1548. DOI: 10.1007/s12094-021-02616-7.

8. Anhang

8.1 Sequenz des Volllängenkonstrukts *PLAC8*

5‘ -

aagcttagcagaggagacccaggggtcccagagctgggctggcgggaggcgtaatccggcggggtgagggttgatcgaagagccccg
cgcgcagctgccgctcacagccccttcccgagtgcagagcgggcagagaagtccactgcttttaaggccctgcactgaaaatgcaagct
caggcgccggtgcgttgtgacccaacctggagtcggtcccggtccggcccccagaactccaactggcagacaggcatgtgtgactgtt
tcagcgactgcggagtctgtctctgtggcacattttgtttcccgtgccttgggtgtcaagttgcagctgatatgaatgaatgctgtctgtgtg
gaacaagcgtcgcaatgaggactctctacaggacccgatatggcatccctggatctatttgtgatgactatatggcaactctttgctgtcc
tcattgtactctttgccaaatcaagagagatatcaacagaaggagagccatgcgtactttctaaaaactcgagtggtgaaaagctcttac
cgaagcaacaaaattcagcagacacctcttcagcttgagttcttcaccatcttttgcaactgaaatatgatggatatgcttaagtacaact
gatggcatgaaaaaaatcaaatttttgatttattataaatgaatgttgtccctgaacttagctaaatggtgcaacttagtttctccttgcttt
catattatcgaattcgaatttcctggcttataaacttttaaattacatttgaaatataaaccaaatgaaatattttactgataagattcttc
atgcttctttgctctccttaaaatgtcttttttcactagttagttccaagggtcagtctcataattttgttcttatactttgatttccttttttcttttt
ttttttttttaatagagttgggggatctttctttctttttttttttttttttttgagatagagtctcgctctgttgcccaggctggagtgcagtggc
gtgatctcagctcactgcaacctccacctcctggatacaagcgattctgctgcctcagtctcccgagtagctgggattacaggttcccgcc
accatgcccagctaatttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatcttggtcaggctggtctcgaactcctgacctcgtgatccacc
tgcctcggcatcacaaaatgctgggattacaggcatgagccaccgcgtccagcctagagttgggggtctttctatgttgcccaggctggt
cttgaactccgggcctctagcaagcctctcatctcagcctcccaaggtgctggaattacaggtgtgagccactgcaccatactttggtttc
ttagcaggagattttggttcacagtaacccagctctctttcatctaagaactttagatgagaaaaaaaaaaaatagactacagataact
attcccaggcagttatggtacatttagccaacacttttgcctcttctcatgttatctgttagtattaatgctgacaaagcaagatttttgcg
aaacaacacaccaagccttgcttttacactgcattcctcaggaggttgtttattgtgttgttgattttctttccctttttgaatatgagatatca
gagtaagaaaactctgatcagagttttctgaaaactcttatcagagtaagaaaaatttgatcaatgatcaaattcagtgactcaattttg
gttaaattttatccatcaatagatggataaaagtgtaaaatgatttttttcacatttcttgtcccatttgatccgtcagcatcattttgccctg
atgaaaatctcacttcctaatttcccctagttctcctcctacacttctgattccatttcatttgttggggtgggggaagtaagaggcaaaac
tatttatcttatacacttattgtgaaatctcagtgagacaaaatgtcaaagcacctggaacttagtaggcactcaacaaattcaagcact
ctgccctttcctccacttaccctatagctgtgggtgctttgcagggttctagcttgagtccactcctttcacatctcacgttcctagatagcat
catctactcccatggttctaactgcctcttaggaccccaaagtctgtacttccagtttctcccttactattgatcttcagaatgtctctcttgc
tagctgtgaaaatgagtccatctggatgtcccctagaccttgtctacccaacaagtccaatgatatcacttagttgttcaaggtgaaaaat
ccaggtaccaatgacccctgaattgcctcatcgcacctttctccttttccccgatatccaatcagacacccactctgtcaccgatactccac
ttgaaagccccaaggggtgatctattttgtttgctgctgtattcccagtgcctagaacaatgcctgacaccagtaggtatctactcaatcat
tttgtttgctgctgtattcccagtgcctagaacaatgcctgacaccagtaggtatctactcaatcacttattgaatgaattaatctgtcctct
cctctttgctgacataaatgtagtccaaaccttattacctctttggcaaatcatgttcataccctctaaactaaccttcctgcctctagaaac
tccagcttcccttgccttctctccagtccatcctatacactgtgtaccatgagttaaattgtgaatttttgttctttttcttttttcttttttcttttctt
tctgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttgagacatagtttcgctcttgttgcccaggctggagtgcaatggcgtgatctctgctc
actgcaacctccacctcccgggttcaagcaattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggaatacaggcatgtgccaccaccccagtt
aattttgtatttttggtacagacacggtttctccatgttggtcaggctggtcttgaactcctgacctcaggtgatccacctgcctcggcctcc
caaagtgctgggattacaggcatgagccactgcgcccagccaaattgtgaattttctaaaacaaacagaccccagtattttccttggttc
ttcacagtgtagcctcattttacctctttagcccactctcctgccaattcttcactcataaaattcccaatcttccctgccttcaacatacata
ctttttttaaaatttcaaattccaattgttcattgctggtatataggaaagcaattgacttttgtacattaaccttatatcctgtgaccttgcca
taactgcttattagtttcaggagacttttgtatgtgtttctatatagacaatcatgttgactgtgaacaaagacagttttattcctccttccc
aatctgtataaagctacatttccttatctggtcttattagctaggattctggtatgatattaaataggaacatgagagtaaacatctttgcc
ttgttcctgacctaggggaaaatcatatagtctctcatcattaagtatgatgtaggttttttgtagatattctgtatatgattgatgaagatc
ccctctatttcaagtatactgagcatttttttttttttttgaaatggagtcttgctctgtcgcccgggctggagggcagtggcgcggtctcagc
tcactgcaagctctgcctcccaggttcacgtcattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggactacaggcgcctgccaccacgcccgg
ctaatttttttgtatttttagtagagacggggtttcactgtgttagccaggatggtcttgatctcctgacctcgtgatccactcaccttggcct
cccaaagggctgggattacaggcgtgagccaccgcacccagccttttttttttttttttttaattagagacggggtcttgttttgttgcccag

gctggtctcaaactcccgagctcaagtgatcctcctgccttggcctccaaaagtgctgggattacatgcatacctggcctactgagcattt
ttatcttgaatgagtgttggattttgtcaaatgctttttctgtacctattaatacaatcatgatttttttcctctttagtatgttgatatgatgggt
tacattaattgattttcaaatgttgaatcagtcttgcatacctggaataaatcccacttggtcataatatatcattctttttacacattattgc
atttgatttgctaatattttgttaaggatttttgcatctatgtttatgagagactgtagttttccctttcttgtcatgtctttatctgattttagta
ttagagtaatgctggtctcctagagtcagttagggtgtgttcccttagcttctatttttttggaagctattgtagagaattggtatgatttctt
tcttagaaaaaaaaattttaaggaaatatttctgggtcaaagatttatttcttaaatgtttgatcaatcatcagtgaacccatctaagcctgg
tgctttctattatagaaggttattagttattgatttagtttaacaggtataggcctattcaaattttctatttctccttgtgtgagttatggaac
actattcctttcaaagaactggcccattgcatgggtttgggccataatcccaaaagacacaatcttgaatgttataatcccaaatgatga
aatcctgaaagatcaaaatccctgaagtccaaaatccccaaaattccaatcccaaatgattaaaatcctgaaaatataattcttgacaa
aataattttaaaaattctttaaaattctttatttatatttttttaaaggagatttgagaaacataaaaacacaacagagcacttcatagacc
attttagacaataaaacaggaaataataacatacttttttttatttttatttttttattgagacagggtctcactttgtcacccaggctggagtg
cagtggtacaatctcagctcactccaacctccgcctcctgggctcaagtgttaatttttgtatttttactacagacagggtttcactatgttg
gccaggcaggtctccaactcctaacctcaagtgatccgcccacttcagcctctcaaagtcagggattacaggtgtgagccactgtgcccg
gcctcctcagtccatttttaatactgaaggtataaattgtataaagatgtttagaaagttctaattcattttatgcatttttgcaaatttgact
ccatgaaagtgcattatcacgaagctgaatttgtgtaagcattgtgcatgtatgtaaaaacattgcaacttcctcaataaaatatcttctttt
ttgtacatccatagggccc- 3‘

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer:innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Prof. Dr. Detlef K. Bartsch, Prof. Dr. Stefan Bauer, Prof. Dr. Annette Becker, Prof. Dr. Katja Becker, Prof. Dr. Stephan Becker, Prof. Dr. Sven Bogdan, Prof. Dr. Stefan Bösner, Prof. Dr. Yalcin Cetin, Prof. Dr. Ho Ryun Chung, Prof. Dr. Frank Czubayko, Prof. Dr. Niels Decher, Dr. Werner de Cruppé, Prof. Dr. Carsten Denkert, Prof. Dr. Dr. Reinhard B. Dettmeyer, Prof. Dr. Rita Engenhart-Cabillic, Prof. Dr. Max Geraedts, Prof. Dr. Thomas Gress, Prof. Dr. Frank Günther, Prof. Dr. Oliver Hantschel, Prof. Dr. Susanne Herold, Prof. Dr. Michael Hertl, Prof. Dr. Rainer Hofmann, Prof. Dr. Joachim Hoyer, Prof. Dr. Dr. Johannes Huber, Prof. Dr. André Kemmling, Prof. Dr. Ralf Kinscherf, Prof. Dr. Tilo Kircher, Prof. Dr. Johannes Kruse, Prof. Dr. Roland Lill, Prof. Dr. Michael Lohoff, Prof. Dr. Markus Luster, Prof. Dr. Andreas H. Mahnken, PD Dr. Hans-Helge Müller, Prof. Dr. Rolf Müller, Prof. Dr. Dr. Andreas Neff, Prof. Dr. Andreas Neubauer, Prof. Dr. Bernhard Neumüller, Prof. Dr. Christopher Nimsky, Prof. Dr. Johannes Oberwinkler, Prof. Dr. Dominik Oliver, Prof. Dr. Axel F. Pagenstecher, Prof. Dr. Timothy D. Plant, Prof. Dr. Tanja Pommerening, PD Dr. Regina Preisig-Müller, Prof. Dr. Ardawan Rastan, Prof. Dr. Harald Renz, Dr. Birgit Rost, Prof. Dr. Steffen Ruchholtz, Dr. Martin Schäfer, Prof. Dr. Bernhard Schieffer, Prof. Dr. Joachim Schneider, Prof. Dr. Johannes Schumacher, Dr. Anja Schwarz, Prof. Dr. Guido Seitz, Prof. Dr. Walter Sekundo, Prof. Dr. Ulf Sibelius, Prof. Dr. Boris A. Stuck, Prof. Dr. Kati Thieme, Prof. Dr. Lars Timmermann, Prof. Dr. Alexander Torossian, Prof. Dr. Claus Franz Vogelmeier, Prof. Dr. Uwe Wagner, Prof. Dr. Stefanie Weber, Prof. Dr. Eberhard Weihe, Prof. Dr. Thomas Worzfeld, , Dr. Christian Wrocklage, Prof. Dr. Hinnerk Wulf.

8.3 Danksagung

Ich möchte hiermit allen Personen danken, die mich während meiner Forschungszeit und dem Abfassen meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Prof. Dr. Malte Buchholz für die Möglichkeit, meine Forschung zu betreiben und meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Buchholz anfertigen zu können. Deine Denkanstöße und Anregungen haben mich stets motiviert weiterzuarbeiten und haben wesentlich zu meinem fachlichen Fortschritt beigetragen. Zudem möchte ich die persönliche Betreuung und ständige Unterstützung an dieser Stelle besonders hervorheben.

Ich danke allen Personen der Arbeitsgruppe Buchholz für die ereignisreiche und lustige Zusammenarbeit. An dieser Stelle möchte ich besonders Harald Schmidt für die Unterstützung und Geduld danken. Zudem danke ich Ramona Diels für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich Sara Brockmann von ganzem Herzen für die Korrekturarbeit und den Austausch von Ideen bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit. Deine Vorschläge haben mir sehr geholfen.

Schlussendlich danke ich meiner Familie und meinem Umfeld für die emotionale Bestärkung, die Motivation und immer ein offenes Ohr.