

**Funktionelle Auswirkungen der SERPINB2-Mutation in
tumorassoziierten
Fibroblasten beim Pankreaskarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jenny Baumann

Betreuer: Prof. Dr. med. Jörg Kleeff

Gutachter: Prof. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)
PD Daniel Hartmann, Tübingen

Datum der Verteidigung: 10.10.2025

Referat

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas zeichnet sich durch eine Vielfalt an Mutationen aus. Diese könnten zukünftig in zielgerichteten Therapien berücksichtigt werden, um die sehr schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms zu verbessern. Neben Mutationen in den Pankreaskarzinomzellen könnten dabei auch Mutationen in Pankreassternzellen relevant sein, da diese im Pankreaskarzinom als tumorassoziierte Fibroblasten wirksam sind.

In dieser Arbeit wurde an einer humanen Fibroblastenzelllinie die zuvor in Pankreassternzellen entdeckte Loss-of-Function-Mutation im SERPINB2-Gen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Fibroblasten selbst sowie auf ko-kultivierte Pankreaskarzinomzellen untersucht.

Dafür wurden die Fibroblasten zunächst stabil transfiziert und es wurde mittels CRISPR/Cas9 ein Knockout des SERPINB2-Gens herbeigeführt. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand von qPCR und Western Blot nachgewiesen. Die transfizierten Fibroblasten wurden auf Veränderungen in ihrer Proliferation, Migration und der Fähigkeit zur Kontraktion eines Kollagengels untersucht. Zudem erfolgte eine Sequenzierung von RNA aus Pankreaskarzinomzellen, die mit den transfizierten Fibroblasten in indirekter Ko-Kultur kultiviert worden waren. Mit den Daten aus der RNA-Sequenzierung wurden Gen-Set-Enrichment-Analysen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Proliferation als auch die Migration von Fibroblasten mit SERPINB2-Knockout signifikant vermindert sind. Hinsichtlich der Fähigkeit zur Kontraktion eines Kollagengels waren keine Veränderungen zu beobachten. Die Ergebnisse der Gen-Set-Enrichment-Analysen wiesen auf eine vermehrte proliferative Aktivität von Pankreaskarzinomzellen bei Ko-Kultivierung mit SerpinB2-negativen Fibroblasten hin. Es zeigte sich eine signifikante Anreicherung von stärker exprimierten Genen in 12 Gen-Sets, die Gene zu Transkription, Translation, DNA-Replikation und oxidativer Phosphorylierung zusammenfassen.

Diese Ergebnisse bestätigen die funktionelle Relevanz einer SERPINB2-Mutation in Fibroblasten. Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnis auf Pankreassternzellen und die Situation *in vivo* sowie der genaue Wirkmechanismus der Auswirkungen der SERPINB2-Mutation müssen Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Baumann, Jenny: Funktionelle Auswirkungen der SERPINB2-Mutation in tumorassoziierten Fibroblasten beim Pankreaskarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 61 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1. Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.3 Diagnostik und Prognose	2
1.4 Therapie	3
1.5 Desmoplastische Reaktion	3
1.6 PSCs und ihre Rolle im PDAC	4
1.7 Mutationen im PDAC	5
1.8 SerpinB2	6
2. Zielstellung	8
3. Material und Methodik	9
3.1 Material	9
3.1.1 Chemikalien	9
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	10
3.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen	11
3.1.4 Zellen	11
3.1.5 Antikörper	11
3.1.6 Primer und Plasmide	11
3.1.7 Kits	12
3.1.8 Geräte	12
3.1.9 Software	13
3.2 Methodik	14
3.2.1 Zellkultur	14
3.2.2 Bestimmung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion	15
3.2.3 Transfektion	15
3.2.4 RNA-Extraktion und Messung der RNA-Konzentration	18
3.2.5 Reverse Transkription	18
3.2.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)	19
3.2.7 Immunzytochemie	20
3.2.8 Proteinextraktion und Messung der Proteinkonzentration	22
3.2.9 Western Blot	22
3.2.10 MTT-Test	25
3.2.11 Wound-Healing-Test	26

3.2.12	Kollagenegel-Kontraktions-Test.....	27
3.2.13	Ko-Kultur	27
3.2.14	RNA-Sequenzierung	28
3.2.15	Patientenmaterial	30
3.2.16	Statistik.....	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion	32
4.2.	Transfektion und Auswahl geeigneter Klone für funktionelle Analysen	33
4.3.	Funktionelle Analysen.....	35
4.3.1	Proliferation.....	35
4.3.2	Migration	36
4.3.3	Kollagenegel-Kontraktion.....	38
4.4	SerpinB2 in PSCs und Pankreasgewebe bei chronischer Pankreatitis und PDAC.....	40
4.5	Ko-Kultur und RNA-Sequenzierung.....	41
4.5.1	Menge und Qualität der <i>reads</i>	41
4.5.2	Differentielle Genexpression und GSEA	43
5.	Diskussion.....	49
6.	Literaturverzeichnis.....	55
7.	Thesen	61
	Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	V
	Danksagung.....	VI

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser, lat. <i>aqua bidestillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare, engl. <i>base pairs</i>
bzw.	beziehungsweise
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein
cDNA	Komplementäre DNA, engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Gruppierte palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen, engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DMEM	Standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur, engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSEA	Gen-Set-Enrichment-Analysen
HBSS	Hank's Salzlösung, engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCl(aq)	Salzsäure
HDI	Index der menschlichen Entwicklung, engl. <i>Human Development Index</i>
IL	Interleukin
l	Liter
mA	Milliampere
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid

NES	Normalisierter Enrichment-Score
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas, engl. <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PSCs	Pankreassternzellen, engl. <i>pancreatic stellate cells</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, engl. <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, engl. <i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USA	Vereinigte Staaten von Amerika, engl. <i>United States of America</i>
α -SMA	Alpha-Aktin der glatten Muskulatur, engl. <i>alpha-smooth muscle actin</i>
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Im Jahr 2020 entsprach die Anzahl an Todesfällen durch Pankreaskarzinome nahezu der Anzahl der neuen Pankreaskarzinomfälle (Sung et al. 2021). Diese alarmierenden Zahlen rücken das Pankreaskarzinom immer mehr in den Fokus der Tumorforschung. Die vorliegende Arbeit wird sich im Folgenden mit dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC, engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*) beschäftigen, das aus dem exokrinen Pankreas hervorgeht und 90% aller Pankreaskarzinome ausmacht (Gupta et al. 2021).

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Weltweit entfielen 2020 auf das Pankreaskarzinom 2,6% aller neuen Tumorerkrankungen, was in absoluten Zahlen 496.000 Fällen entspricht. Interessanterweise sind dabei die Fallzahlen in Ländern mit höherem HDI-Wert teilweise fünfmal so hoch wie in Ländern mit niedrigem HDI-Wert (Sung et al. 2021). Dies hängt unter anderem stark mit den modulierbaren Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom zusammen. Neben dem Hauptfaktor Rauchen zählen Adipositas, Bewegungsmangel und eine fettreiche Ernährung mit viel rotem Fleisch dazu. Nicht oder nur indirekt modulierbar sind dagegen die Risikofaktoren zunehmendes Lebensalter, männliches Geschlecht, genetische Prädisposition, Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis (Khalaf et al. 2021; Gupta et al. 2021).

Der vergleichsweise niedrigen Inzidenz stehen 466.000 Todesfälle im Jahr 2020 gegenüber. Damit gingen in diesem Jahr 4,7% der tumorbedingten Todesfälle auf das Pankreaskarzinom zurück, was es zur Nummer Sieben unter den tödlichsten Tumoren machte (Sung et al. 2021). In den USA gilt das Pankreaskarzinom aktuell sogar als der dritt-tödlichste Tumor (National Cancer Institute 2024).

Wie auch bei anderen Krebserkrankungen üblich, tritt das Pankreaskarzinom meist erst im fortgeschrittenen Alter auf. Unter 50-Jährige machen nur 7% der Patienten mit diagnostiziertem PDAC aus (Khalaf et al. 2021).

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms nimmt in den meisten Ländern zu und Prognosen lassen bis zum Jahr 2040 einen Anstieg der Fallzahl um über 60% erwarten (Gupta et al. 2021). Weiterhin wird vermutet, dass bis 2040 das Pankreaskarzinom auf Platz zwei der tödlichsten Tumorerkrankungen aufgestiegen sein wird (Rahib et al. 2021).

1.3 Diagnostik und Prognose

Nach wie vor hat das Pankreaskarzinom eine sehr schlechte Prognose, genau genommen die schlechteste 5-Jahres-Überlebensrate der von der American Cancer Society gelisteten Tumore (Rahib et al. 2014). Dies ist unter anderem durch den meist späten Diagnosezeitpunkt begründet. In den USA werden über 50% der Pankreaskarzinome erst im fortgeschrittenen und nur 10% bereits im lokalen Stadium diagnostiziert, dabei ist der wichtigste Prognosefaktor beim Pankreaskarzinom das Tumorstadium bei Diagnose (Khalaf et al. 2021). Denn eine Diagnose im lokalen operablen Stadium kann die 5-Jahres-Überlebensrate von <5% auf 15-25% steigern (Kleeff et al. 2016).

Die verzögerte Diagnosestellung kann durch die erst spät auftretende und zudem häufig unspezifische Symptomatik (Oberbauchschmerzen, Übelkeit, Gewichtsverlust, Ikterus, neu auftretender Diabetes mellitus) erklärt werden (Kleeff et al. 2016). Umso wichtiger erscheinen adäquate Screening-Untersuchungen. Trotz umfassender Forschung konnte jedoch bis heute keine Screening-Methode etabliert werden, die sensitiv und spezifisch genug wäre, um sie auf die breite Bevölkerung anzuwenden (Gupta et al. 2021). Allerdings scheint ein Screening für bestimmte Risikogruppen trotzdem sinnvoll zu sein, wie zum Beispiel bei Patienten mit Pankreatitis oder neu aufgetretenem Diabetes mellitus oder auch bei positiver Familienanamnese (Khalaf et al. 2021). Dafür können die Detektion der Biomarker CA19-9 und PAM4 in Kombination mit bildgebenden Verfahren wie Multidetektor-Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Positronen-Emissions-Tomographie und die Endosonografie eingesetzt werden (Gupta et al. 2021).

1.4 Therapie

Die einzige kurative Therapie für das Pankreaskarzinom ist bis heute die operative Resektion. Voraussetzung für eine erfolgreiche Resektion ist in der Regel allerdings, dass der Tumor keine Fernmetastasen ausgebildet hat und dass keine großen Arterien in den Tumor involviert sind, was nur auf weniger als 20% der Patienten bei Diagnosestellung zutrifft (Kleeff et al. 2016). Je nach Lokalisation des Tumors wird bei diesen Patienten eine partielle Duodenopankreatektomie oder eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie durchgeführt. Bei beiden Verfahren hat sich in Studien die laparoskopische Technik durch einen geringeren intraoperativen Blutverlust und kürzeren Klinikaufenthalt bei gleichwertigen oder weniger postoperativen Komplikationen behauptet (Gupta 2021). Für die generell empfohlene adjuvante Chemotherapie wird häufig das mFOLFIRINOX-Schema oder Gemcitabin/Capecitabin verwendet (Springfield et al. 2023). Nur selten muss eine totale Pankreatektomie durchgeführt werden.

Kommt aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums keine Operation in Frage, wird eine systemische palliative Chemotherapie mit FOLFIRINOX bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand, sonst mit Gemcitabin mit oder ohne nab-Paclitaxel eingeleitet (Gupta et al. 2021).

1.5 Desmoplastische Reaktion

Ein besonders ausgeprägtes Merkmal mit weitreichenden Folgen ist beim Pankreaskarzinom die desmoplastische Stromareaktion. Generell sind desmoplastische - also mit starker Bindegewebsbildung verbundene - Tumoren oftmals mit einer schlechten Prognose assoziiert (Gkretsi et al 2018).

Schon 1995 wiesen Gress et al. im Pankreaskarzinom eine gegenüber normalem Pankreasgewebe erhöhte Expression von Genen, die für extrazelluläre-Matrix-Proteine codieren, nach (Gress et al. 1995). Beim Pankreaskarzinom sorgt die große Menge an Hyaluronsäure und typischerweise an den malignen Pankreasgängen ausgerichteter Kollagenfasern für eine erhöhte Steifigkeit des Gewebes (Stopa et al. 2020). Dies regt einerseits die Krebszellen zur Proliferation an, gleichzeitig kollabieren durch den mechanischen Druck Blutgefäße, was zu einer verminderten Erreichbarkeit des

Tumorgewebes für Chemotherapeutika und zu Hypoxie im Tumor führt (DuFort et al. 2016; Sahai et al. 2020).

Für die Produktion dieser tumorfördernden extrazellulären Matrix (EZM) sind tumorassoziierte Fibroblasten verantwortlich. Lange Zeit wurde angenommen, dass diese im Pankreaskarzinom zum größten Teil aus den ortsansässigen Pankreassternzellen (PSCs, engl. *pancreatic stellate cells*) hervorgehen (Stopa et al. 2020). Zwar wurde diese These von Helms et al. infrage gestellt, die zeigten, dass nur ein kleinerer Anteil der tumorassoziierten Fibroblasten im PDAC tatsächlich PSCs als Ursprungszellen hat. Trotzdem wird diesen weiterhin eine wichtige Rolle in der EZM-Regulation im PDAC zugesprochen (Helms et al. 2022).

1.6 PSCs und ihre Rolle im PDAC

PSCs wurden erstmalig im Jahr 1982 von Watari et al. beschrieben. Die Forschungsgruppe entdeckte im Pankreas Zellen mit sternähnlicher Form, die in Lipidtropfen Vitamin A speicherten (Watari et al. 1982). Heute weiß man, dass diese Zellen etwa 4-7% des normalen Pankreasparenchyms ausmachen und dort durch die Sekretion von Metalloproteinasen und Metalloproteinase-Inhibitoren für die Aufrechterhaltung einer physiologischen EZM sorgen (Allam et al. 2017). Schon Apte et al. bemerkten 1998, dass PSCs durch äußere Einflüsse in einen aktivierten Zustand übergehen können (Apte et al. 1998). Dieser zeichnet sich durch einen Verlust an Lipidtropfen, die Expression von Desmin und α -SMA (engl. *alpha-smooth muscle actin*), sowie durch eine verstärkte Proliferation der Zellen aus (Allam et al. 2017). Sobald sie aktiviert worden sind, beginnen die PSCs, EZM-Komponenten wie Kollagen I, III und IV, Fibronectin sowie Laminin zu sezernieren (Hessmann et al. 2020). Neben der unter 1.5 beschriebenen Folge der Fibrosierung hat dies noch mehrere weitere Konsequenzen: Die Migrationsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen und deren Proliferationsrate steigt, die Angiogenese im Tumor wird gefördert und das Eindringen von Immunzellen wird erschwert (Koenig et al. 2006; Drifka et al. 2015; Stopa et al. 2020; Kaur et al. 2019). Die EZM-Proteine können sogar den Karzinomzellen als Nährstoffreservoir dienen und ihnen dadurch das Überleben auch bei schlechter Versorgung ermöglichen (Olivares et al. 2017). Außerdem tragen aktivierte PSCs durch Zytokinsekretion zu vermehrter

Proliferation, Invasivität, Metastasierung und verminderter Apoptose der Pankreaskarzinomzellen bei (Fujita et al. 2010; Drifka et al. 2015; Bynigeri et al. 2017). Interessant ist weiterhin, dass aktivierte PSCs mit Pankreaskarzinomzellen zu Metastasierungsorten wandern können und vielleicht sogar erst die Einnistung der zirkulierenden Karzinomzellen durch die Bereitstellung eines geeigneten Mikromilieus möglich machen (Xu et al. 2010).

Die Aktivierung der PSCs kann durch verschiedene Faktoren, unter anderem durch oxidativen Stress, Zytokine wie TGF- β und TNF- α oder mechanischen Druck erfolgen und geschieht bereits in einem frühen Stadium von Vorläuferläsionen des PDAC (Bynigeri et al. 2017). Es wird angenommen, dass die desmoplastische Reaktion zu Beginn der Tumorentwicklung der Eingrenzung und Isolation von Karzinomzellen dienen soll. Durch wechselseitige Interaktion werden die PSCs jedoch von den Karzinomzellen weiter aktiviert und für ihre Zwecke „rekrutiert“ (Bynigeri et al. 2017; Kleeff et al. 2016; Allam et al. 2017).

Aktivierte PSCs interagieren nicht nur mit den Karzinomzellen, sie haben auch großen Einfluss auf die übrigen Stromazellen: Sie veranlassen die Endothelzellen zu vermehrter Proliferation und Gangbildung, aktivieren Mastzellen und haben auf T-Zellen eine hemmende Wirkung, was der Tumorprogression weiter entgegenkommt (Bynigeri et al. 2017).

1.7 Mutationen im PDAC

Im Pankreaskarzinom liegt eine große Vielfalt an somatischen Mutationen vor. Im Durchschnitt sind es pro Patient 26 (Biankin et al. 2005). Dabei ist die aktivierende KRAS-Mutation die häufigste, sie ist in >90% der Pankreaskarzinome nachweisbar (Bailey et al. 2016). Daneben gehören die TP53- und CDKN2A-Mutation, involviert in die G/S1 Checkpoint-Maschinerie, und die SMAD4-Mutation, die auf den TGF- β -Signalweg Einfluss hat, zu den häufigsten Mutationen im Pankreaskarzinom (Bailey et al. 2016). Darüber hinaus wurden bisher noch viele weitere Mutationen beschrieben, die allerdings jeweils nur in einem prozentual kleinen Anteil der Pankreaskarzinome vorliegen (Waddell et al. 2015). Diese Vielfalt an genetischen Veränderungen trägt zu einem großen Teil dazu bei, dass konventionelle Chemotherapien nach

Standardschemata beim Pankreaskarzinom mitunter wenig Wirkung zeigen. Pishvaian et al. fanden heraus, dass das mittlere Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom durch eine auf die individuellen Mutationen zugeschnittene Therapie um ein Jahr verlängert werden kann (Pishvaian et al. 2020). Diese Daten machen Hoffnung und bestätigen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung von Mutationen im Pankreaskarzinom.

Bisher waren auf der Suche nach relevanten tumortreibenden Mutationen die Pankreaskarzinomzellen selbst im Fokus. Als Böker et al. aber aus Pankreaskarzinomen stammende PSCs auf genetische Veränderungen untersuchten, wurden tatsächlich einige relevante Mutationen gefunden, unter anderem eine Stop-Gain-Mutation (d.h. Loss-of-Function-Mutation) im SERPINB2-Gen (Böker et al. 2022). Mit den funktionellen Auswirkungen dieser Mutation soll sich diese Arbeit beschäftigen.

1.8 SerpinB2

SerpinB2 ist ein Protein aus der Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren. Ursprünglich in Plazentaextrakt entdeckt, wurde SerpinB2 seitdem auch in vielen anderen Geweben nachgewiesen (Kruithof et al. 1995). Die Expression von SerpinB2 wird durch verschiedenste Faktoren wie TGF- β , EGF, Vitamin D3, TNF- α und Angiotensin II reguliert (Nagamine et al. 2005). SerpinB2 ist auch bekannt als PAI-2 (Plasminogen Aktivator Inhibitor 2), was auf seine Rolle im Plasminogen-Aktivator-System hinweist. Zu diesem gehören die beiden Plasminogen-Aktivatoren tPA und uPA (engl. *tissue-type & urokinase-type plasminogen activator*), welche Plasminogen zu Plasmin spalten. Sie können von PAI-1 und PAI-2 (=SerpinB2) inhibiert werden.

Das Plasminogen-Aktivator-System ist verantwortlich für die Fibrinolyse und trägt durch den Abbau von EZM-Proteinen und die Aktivierung von Kollagenasen zu Gewebeumbauprozessen und zur Wundheilung bei. Außerdem ist es in die proteolytische Aktivierung mehrerer Zytokine involviert (Kugaevskaya et al. 2019; Mahmood et al. 2018). Gerade im Kontext eines Karzinoms ist eine gute Regulierung des Plasminogen-Aktivator-Systems durch SerpinB1 und SerpinB2 unbedingt notwendig, da ansonsten ein übermäßiger EZM-Abbau droht, bei dem Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, die die Proliferation der Karzinomzellen sowie Angiogenese fördern. Darüber

hinaus ist der EZM-Abbau mit einer Erleichterung des invasiven Wachstums für den Tumor verbunden (Danø et al. 2005; Mahmood et al. 2018).

Für die Inhibition von Plasmin-Aktivatoren ist die extrazelluläre Form des SerpinB2 verantwortlich. Interessanterweise kommt SerpinB2 aber größtenteils intrazellulär vor, nur ein kleiner Anteil wird sezerniert (Croucher et al. 2008). Die Funktion dieses intrazellulären SerpinB2 ist bis heute nicht abschließend geklärt. Übereinstimmende Untersuchungen ergaben aber, dass SerpinB2 das Retinoblastom-Protein vor dem Abbau schützen und somit dessen tumorsuppressive und zellregulierende Funktion unterstützen kann (Darnell et al. 2003; Macaluso et al. 2006). Vermutet wird außerdem eine Beteiligung von SerpinB2 bei der Proteostase (Lee et al. 2015). Dagegen wird die Rolle von SerpinB2 bei der Apoptose kontrovers diskutiert (Dickinson et al. 1995; Fish et al. 2006).

Bei mehreren Tumorentitäten ist SerpinB2 als prognostischer Faktor bekannt. Eine starke SerpinB2-Expression ist beim Endometriumkarzinom mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben, beim Pankreaskarzinom und beim Adenokarzinom der Lunge dagegen mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Nordengren et al. 2002; Smith et al. 2007; Ramnefjell et al. 2017). Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gelten SerpinB2-positive Fibroblasten als ein positiver prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben, wenn die Karzinomzellen uPA-negativ sind (Shiomi et al. 2000). Ferner erhöht SerpinB2 beim Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses vermutlich die Sensitivität gegenüber der Cisplatin-basierten Chemotherapie (Zhiquan et al. 2014).

Um diese teilweise sehr konträren Einflüsse des SerpinB2 in verschiedenen Tumoren zu erklären, bedarf es weiterer intensiver Forschung.

2. Zielstellung

Die vielfältigen Mutationen im PDAC tragen maßgeblich zur schlechten 5-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patienten bei. Neben Mutationen in den Pankreaskarzinomzellen selbst könnten dabei auch Mutationen in den PSCs als tumorassoziierte Fibroblasten von höchster Relevanz sein.

Diese Arbeit nimmt Bezug auf die in PSCs entdeckte Loss-of-Function-Mutation im SERPINB2-Gen (Böker et al. 2022).

Es soll untersucht werden,

- a) ob ein SERPINB2-Knockout in Fibroblasten funktionelle Auswirkungen auf diese hat, und wenn ja, welche.
- b) ob ein SERPINB2-Knockout in Fibroblasten einen Einfluss auf ko-kultivierte Pankreaskarzinomzellen hat, und wenn ja, welchen.
- c) In welcher Quantität SerpinB2 in PSCs und im Gesamtpankreasgewebe bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und mit PDAC exprimiert wird.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Bezugsquelle</i>
1,4-Dithiothreitol (DTT), ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane (CHAPS)	EMD Biosciences, Inc., La Jolla, USA
Aceton ≥99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Albumin aus Rinderserum, heat shock fraction, pH 5,2, ≥96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS), ≥98 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Antibody diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau Natriumsalz wasserlöslich Indikator ACS	Merck KGaA, Darmstadt
cOmplete™, Mini, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DEPC-behandeltes und steril filtriertes Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure Rotipuran® 100%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol ≥99,8%	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Ethanol 70% verg.	WALTER-CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), 5x	Solis BioDyne OÜ, Tartu (Estonia)
L-Glutamin (146,15 g/mol)	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	TSI Consumer Goods GmbH, Berlin
Mayers Hämaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol, ≥99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methylcellulose, 4,000 cP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Bioscience AB, Uppsala, Schweden
Natriumhydroxid, ≥98 %, p.a., ISO, in Plätzchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Puffer (1X, Dulbecco's) - Pulver	AppliChem GmbH, Darmstadt

PCR-grade water (DNase-, RNase-, Phosphatasefrei)	Jena Bioscience GmbH, Jena
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (2N)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thiourea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS Pufferan® >99,3 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Th. Geyer & Co. KG, Renningen
Urea	Amersham Bioscience AB, Uppsala, Schweden

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Bezugsquelle</i>
12-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Well PCR Platte	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren
96-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Amersham Hybond PVDF Blotting Membrane	GE Healthcare GmbH, Solingen
Ampliseal™, Transparente Microplatten Abdeckfolie	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CRYO.S™ Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen 22 mm ø, Stärke 1	Th. Geyer & Co. KG, Renningen
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filter Top Zellkulturflasche, 25/75/125 cm², CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterpapier MN 615 1/4 70mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Objektträger 90°	Süsse Labortechnik, Gudensberg
PARAFILM® M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischale, 94x16 mm, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen Sapphire Filterspitzen, 10 µl, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen Sapphire Filterspitzen, 100 µl, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 1000 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen CELLSTAR®, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Stabpipetten 5/10/25/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen 5/10/20 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenversatzfilter, 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Thin Cert® Zellkultureinsatz 6-Well, 1 µm Poren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber steril, 28cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
0,05% Trypsin-EDTA (1X)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Bambaker Einfriermedium, BB01	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM high glucose, D5796	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FBS Superior, S0615	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (1X)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Opti-MEM® I (1X) Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Penicillin-Streptomycin, 15140122	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Pferdeserum, S-30-L	c.c.pro GmbH, Oberdorla
Puromycin 10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

3.1.4 Zellen

<i>Zelllinie</i>	<i>Bezugsquelle</i>
SV80-Zellen; SV-40 transformierte humane Zelllinie aus Hautfibroblasten, Geschlecht: weiblich	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim
PANC-1-Zellen; humane Tumorzelllinie aus Adenokarzinom des Pankreas, Geschlecht: männlich, Alter bei Entnahme: 56 J.	ATCC, Manassas, USA

3.1.5 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Anti-Alpha-Tubulin Monoclonal Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Anti-SerpinB2-Antikörper (PA5-27857)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Cytokeratin 19 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody, 1mg/ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Goat-anti-mouse IgG-HRP 200 µg /0,5 ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Goat-anti-rabbit IgG-HRP 200 µg/0,5 ml	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

3.1.6 Primer und Plasmide

<i>Primer / Plasmid</i>	<i>Sequenz 5'-3'</i>	<i>Bezugsquelle</i>
18S human 151bp as	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	metabion international AG, Planegg
18S human 151bp s	GTA ACC CGR TGA ACC CCA TT	metabion international AG, Planegg
SerpinB2 human as	AAG CTC GCA GAC TTC TCA CC	metabion international AG, Planegg
SerpinB2 human s	TGA TGC GAT TTT GCA GGC AC	metabion international AG, Planegg

β-Aktin human 51bp as	GCC CAC ATA GGA ATC CTT CTG AC	metabion international AG, Planegg
β-Aktin human 51bp, s	AGG CAC CAG GGC GTG AT	metabion international AG, Planegg
PAI-2 Double Nickase Plasmid (h) sc-402054-NIC		Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Control Double Nickase Plasmid sc-437281		Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

3.1.7 Kits

<i>Kit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Bio-Rad Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Cell Contraction Assay, CBA 201	Cell Biolabs, Inc., Eching
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468	Agilent Technologies GmbH, Darmstadt
Dako LSAB [®] 2 System-HRP, K0690	Agilent Technologies GmbH, Darmstadt
Direct-zol RNA Microprep Kit, R2062	ZYMO RESEARCH EUROPE GMBH, Freiburg
Direct-zol RNA Miniprep Kit, R2050	ZYMO RESEARCH EUROPE GMBH, Freiburg
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368814	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
WesternBright™ ECL Western blotting detection Kit	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

3.1.8 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Magnetrührer mit Heizfunktion RH3	VEB MLW, Leipzig
Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Analysewaage ABS-N	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Biometra [®] T3 Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena
BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Einfrierbox für Zellen, CellCamper [®]	NeoLab [®] , Heidelberg
Glas-Deckgläser für Neubauer Zählkammer	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG,
Heracell 150i CO2 Zellinkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis for Handcast Gels (1.0 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Pipetten Eppendorf Reference® 2	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
PowerPac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Präzisionswaage CP 3202 S	Sartorius AG, Göttingen
QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Thermo Heraeus Sicherheitswerkbank Klasse II	HERAsafe®, Thermo Electron Corporation, Dreieich
Thermoschüttler ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® transfer cell Tank-Blot-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Umlaufkühler WK 230	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Vortexer Vortex-Genie™ 1	Scientific Industries SI™, New York, USA
Wasserbad, WNB7	Memmert GmbH, Schwabach
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Zentrifuge VWR Micro1207	VWR International GmbH, Darmstadt

3.1.9 Software

<i>Software</i>	<i>Bezugsquelle</i>
GraphPad PRISM	GraphPad Software Inc, San Diego, USA
GSEA-Software & Gen-Sets	Open Source (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp)
Image Lab™ V 6.0.0 build 25	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
ImageJ	Open source (https://imagej.nih.gov/ij/index.html)
Magellan V 7.1	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Software AxioVision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

3.2 Methodik

3.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden Zellen der Zelllinien SV80 und PANC-1 verwendet. Die durch das SV40-Virus immortalisierten SV80-Zellen stammen von gesunden Hautfibroblasten einer erwachsenen Frau. Die PANC-1-Zellen sind Pankreaskarzinomzellen, die ursprünglich aus einem Adenokarzinom des Pankreas eines 56-jährigen Mannes isoliert wurden.

Die SV80- und PANC-1-Zellen wurden in ihren jeweiligen Medien (s. Tab. 1) in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Dabei erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Je nach Wachstum der Zellen wurde etwa alle drei Tage das Medium gewechselt. Sobald die Zellschicht am Boden der Zellkulturflasche 70-80% Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA (0,05%) passagiert. Die Zentrifugation wurde dabei für 10 min bei 340 x g durchgeführt. Zellkulturarbeiten erfolgten stets unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank.

Zellzahlbestimmungen wurden mithilfe einer Neubauer Zählkammer vorgenommen. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl/ml mit der Formel

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10.000$$

bestimmt.

Tab. 1: Kulturmedien der SV80- und PANC-1-Zellen

SV80-Kulturmedium	89% DMEM high glucose 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin
PANC-1-Kulturmedium	89% DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham 5% FBS 5% Pferdeserum 1% Penicillin-Streptomycin 0,292 g/l L-Glutamin (146,15 g/mol), in Medium gelöst und steril filtriert

3.2.2 Bestimmung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion

Um die optimale Antibiotika-Konzentration für die Selektion transfizierter SV80-Zellen zu ermitteln, wurden vor der Transfektion SV80-Zellen verschiedenen Konzentrationen an Puromycin ausgesetzt (s. Tab. 2). Dafür wurden zunächst 1×10^5 SV80-Zellen in je ein Well einer 24-Well-Platte in normalem Kulturmedium ausgesät. Am nächsten Tag waren die Zellen in den Wells zu 80-90% konfluent, sodass das reine Kulturmedium durch mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen ergänztes Kulturmedium ausgetauscht werden konnte. Es folgte eine Woche der Beobachtung der Toxizitätswirkung, während derer alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Dabei wurde für jedes Well wieder das jeweilige Medium mit der entsprechenden Puromycinkonzentration verwendet.

Als optimale Antibiotikakonzentration für die Selektion wurde die geringste Konzentration an Puromycin, bei der alle Zellen nach einer Woche antibiotischer Selektion abgestorben waren, ermittelt.

Tab. 2: Schema der Zugabe von Puromycin zu SV80-Zellen in einer 24-Well-Platte

	1	2	3	4	5	6
A	0 µg/ml	0,1 µg/ml	0,15 µg/ml	0,2 µg/ml	0,25 µg/ml	0,3 µg/ml
B	0 µg/ml	0,1 µg/ml	0,15 µg/ml	0,2 µg/ml	0,25 µg/ml	0,3 µg/ml

3.2.3 Transfektion

Das CRISPR/Cas9-System stammt ursprünglich aus Bakterien und dient diesen als Abwehrmechanismus gegen Viren: CRISPR/Cas9 kann die Viren-DNA zerschneiden und sie damit unschädlich machen. Dafür muss das CRISPR-assoziierte Protein (=Cas9), eine Endonuklease, in räumliche Nähe mit der Ziel-DNA gebracht werden. Dies geschieht mithilfe des CRISPR-Systems, das zur Ziel-DNA komplementäre RNA enthält, die sogenannte *guide-RNA*. Neben der Zielsequenz muss außerdem noch ein *protospacer adjacent motif* (PAM) liegen, ein kurzer Abschnitt aus zwei Guanin-Basen und einer beliebigen Base, damit Cas9 an die DNA binden kann.

Auch in menschlichen Zellen kann das CRISPR/Cas9-System verwendet werden, um gezielt DNA zu schneiden und somit Gene auszuschalten. Dabei kann es aber auch

vorkommen, dass das CRISPR/Cas9-System nicht das Zielgen, sondern ein anderes Gen schneidet, dessen Sequenz nicht perfekt, aber ausreichend zur *guide-RNA* passt. Für eine höhere Spezifität kann das Zusammenspiel aus zwei CRISPR/Cas9-Systemen verwendet werden, deren Cas9-Proteine D10A mutiert sind, sodass sie nur den zur *guide-RNA* komplementären DNA-Strang anstatt beider Stränge schneiden. Die *guide-RNAs* werden dann so gewählt, dass beide DNA-Stränge im Bereich des Zielgens versetzt geschnitten werden.

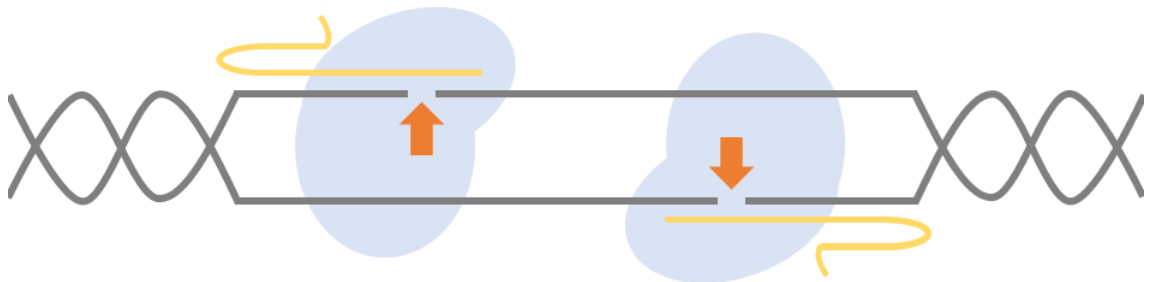


Abb. 1: Gen-Knockout mit D10A-mutierten CRISPR/Cas9-Systemen. Die D10A-mutierten Cas9-Proteine (blau) schneiden jeweils nur den zur *guide-RNA* (gelb) komplementären DNA-Strang (grau). Die *guide-RNAs* werden so gewählt, dass die Schnittstellen versetzt sind.

Um ein Knockout im SERPINB2-Gen von SV80-Zellen zu verursachen, wurden Plasmide, die für gegen dieses Gen gerichtete D10A-mutierte CRISPR/Cas9-Systeme codieren, per Lipofektion in die Zellen eingebracht. Als Kontrolle diente ein Plasmid, das für ein defektes CRISPR/Cas9-System codiert. Bei der Lipofektion werden die lipophoben Plasmide mit einer lipophilen Hülle ummantelt, sodass sie die Zellmembran überwinden und in die Zelle eingeschleust werden können. Dank eines nukleären Lokalisationssignals werden sie sogleich in den Zellkern weitergeleitet.

Außer für das D10A-mutierte CRISPR/Cas9-System codierte die eine Hälfte der Plasmide noch für GFP, die andere Hälfte enthielt zusätzlich ein Puromycin-Resistenzgen. So konnte der Erfolg der Transfektion durch die Beobachtung von Fluoreszenz und das Überleben der Zellen in Selektionsmedium überprüft werden.

Am Vortag der Transfektion wurden 1×10^5 SV80-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, sodass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80-90% vorlag.

Die Transfektion wurde mit drei verschiedenen Plasmid-Lipofectamine™ 2000-Verhältnissen durchgeführt (s. Tab. 3). Zunächst wurden dafür die DNA und das Lipofectamine™ 2000 in Opti-MEM® I (1X) Reduced Serum Medium gelöst. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die entsprechenden Konzentrationen an DNA und Lipofectamine™ 2000 vorsichtig zusammengeführt und gemischt und für weitere zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Liposomen-Komplexe in die Wells mit den SV80-Zellen und 500 µl normalem Kulturmedium pipettiert und durch sanftes Schwenken vermischt. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

Tab. 3: Kombinationen von Plasmid und Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz für jeweils drei verschiedene Transfektionsansätze mit Knockout- und Kontrollplasmid.

Ansatz	PAI-2 Double Nickase Plasmid in 50 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium		Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz in 50 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium
1	1 µg	+	2µl
2	1 µg	+	3µl
3	1 µg	+	4µl
	Control Double Nickase Plasmid in 50 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium		Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz in 50 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium
4	1 µg	+	2µl
5	1 µg	+	3µl
6	1 µg	+	4µl

Danach wurden die Zellen eines Wells auf je zehn Wells gesplittet. Weitere 24 Stunden später wurde das Medium durch Selektionsmedium mit 0,15 µg/ml Puromycin ersetzt. Als Zellhaufen erkennbare Zellklone, die aus einer Ursprungszelle hervorgegangen waren und Fluoreszenz sowie trotz Selektionsmedium eine gute Proliferation zeigten, wurden vom Wellboden abgespült, in ein eigenes Well einer 6-Well-Platte mit Selektionsmedium überführt und dort weiter kultiviert. Es wurden weiterhin regelmäßig Medienwechsel mit dem Selektionsmedium durchgeführt.

3.2.4 RNA-Extraktion und Messung der RNA-Konzentration

Für die Extraktion von RNA wurde das QIAzol Lysis Reagent in Kombination mit dem Direkt-zol™ RNA Miniprep Kit verwendet. Das QIAzol wurde zum Lysieren der Zellen entweder direkt auf die zuvor mit HBSS gewaschenen Zellen gegeben oder auf ein Zellpellet, das aus den gewaschenen und trypsinierten Zellen durch Zentrifugation erhalten wurde. Die Lösung aus QIAzol und Zellen wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und es wurde das gleiche Volumen an 96%igem Ethanol hinzugefügt, wie zuvor QIAzol auf die Zellen gegeben worden war. Nach gründlichem Vortexen wurde die RNA anschließend mit dem Direkt-zol™ RNA Miniprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Die extrahierte, in RNase-freiem Wasser gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der in RNase-freiem Wasser gelösten RNA wurde mithilfe des NanoDrop™ One ermittelt. Der NanoDrop™ One misst die Absorption der Probe bei 230 nm, 260 nm und 280 nm Wellenlänge, wobei aus dem Absorptionswert bei 260 nm die Konzentration der Nukleinsäure in der Probe berechnet werden kann. Um eine Aussage nicht nur über die Quantität, sondern auch über die Qualität der Probe tätigen zu können, werden die Messungen bei 230 nm für die Detektion von organischen Substanzen und bei 280 nm für die Detektion von Proteinen und Phenolen herangezogen. Bei einer reinen Nukleinsäure-Probe sollte der A260/A280-Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen, sowie der A260/A230-Quotient bei $\geq 2,0$. Proben, die diesen Qualitätsmerkmalen entsprachen, wurden für weitere Analysen verwendet.

3.2.5 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mithilfe eines bestimmten Enzyms, der reversen Transkriptase, aus RNA cDNA synthetisiert, was die weitere Untersuchung der Proben per qPCR ermöglicht.

Die reverse Transkriptase verwendet die RNA als Vorlage, um einen RNA-DNA-Hybridstrang herzustellen. Daraufhin wird die RNA abgebaut und der verbliebene DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang komplettiert.

Es wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet, um jeweils 500 ng RNA in cDNA umzuschreiben. Zunächst wurde dafür ein Mastermix vorbereitet (s. Tab. 4), der auf Eis gelagert wurde. In 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde nun das 500 ng RNA enthaltende Volumen an RNA-Lösung gegeben und mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nachdem 10 µl des Mastermixes hinzupipettiert wurden, wurde die Lösung gevortext, kurz zentrifugiert und die Eppendorf-Reaktionsgefäße im Thermocycler platziert. Es folgte ein Zyklus mit drei Phasen: eine zehnminütige Phase bei 25°C, eine zweistündige Phase bei 37°C und zuletzt eine Phase bei 85°C für fünf Minuten. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tab. 4: Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription

10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix 100mM	0,8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
DEPC-H ₂ O	4,2 µl

3.2.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Mithilfe der qPCR lassen sich Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchführen. Um diese Analyse vornehmen zu können, wird zunächst die RNA in cDNA umgewandelt (siehe 3.2.5) und anschließend spezifisch die gesuchte cDNA vervielfältigt. Dies ist möglich durch die 1983 von Kary Mullins entwickelte Methode der Polymerasekettenreaktion, kurz PCR. Hierfür wird ein Reaktionsansatz hergestellt, zu dem außer der DNA noch eine hitzebeständige Polymerase, spezifische Primer und Oligonukleotide gehören. Dieser Ansatz durchläuft dann vielfach einen Zyklus aus Denaturierung der DNA bei 95°C, Anlagerung der Primer bei 60-65°C und Elongation bei 72°C. Dabei steigt die Zahl der Kopien des von den Primern eingerahmten DNA-Abschnitts exponentiell an.

Im Falle der qPCR, der quantitativen Echtzeit-PCR, wird dieser Anstieg der Amplifikate in Echtzeit mitverfolgt und gemessen. Dies funktioniert dank der Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs (EvaGreen®), dessen Fluoreszenz im an Doppelstrang-DNA gebundenen Zustand ansteigt. Somit kann nach jedem Zyklus eine Veränderung der

Fluoreszenzstärke gemessen werden, die mit der Quantität der PCR-Produkte korreliert. Dabei gilt: je mehr gesuchte cDNA bei Beginn in der Probe enthalten ist, desto früher kommt es zum exponentiellen Anstieg des Signals. Als Ct-Wert (engl. *cycle threshold*) wird der Amplifikationszyklus angegeben, bei dem die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt, er ist proportional zur Menge der eingesetzten cDNA. Da der Fluoreszenzfarbstoff auch mit unspezifischen PCR-Produkten binden kann, werden die Amplifikate am Ende der qPCR in einer Schmelzkurvenanalyse abschließend erhitzt und es wird die Temperatur gemessen, bei der eine Änderung der Fluoreszenz registriert wird, welche die Denaturierung der Amplifikate anzeigt. Dieser Schmelzpunkt hängt von der Länge und Basenzusammensetzung des DNA-Produkts ab und hilft daher, spezifische PCR-Produkte von z.B. Primerdimeren zu unterscheiden.

Zur Durchführung der qPCR wurde der HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) und das QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System verwendet. Pro Probe wurden 4 µl des qPCR Mixes, jeweils 0,5 µl des Forward- und Reverse-Primers und 13 µl Wasser in PCR-Qualität zu einem Mastermix zusammenpipettiert, kurz gevortext und zentrifugiert. Von diesem Mastermix wurden 18 µl in je ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt, in welche dann jeweils 2 µl cDNA hinzupipettiert wurden. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt, bei 2.000 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend in das QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System gegeben. Es wurde eine initiale Aktivierung bei 95°C für 12 min durchgeführt, danach folgten 41 Zyklen aus 95°C für 15 s, 60°C für 20 s und 72°C für 20 s. Die Auswertung erfolgte mit der QuantStudio™ Design & Analysis Software. Für jede Probe wurde mindestens ein Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle und Referenz mituntersucht (18S und/oder β-Aktin); es erfolgten immer Doppelbestimmungen. Als Negativkontrolle diente auf jeder Well-Platte Wasser in PCR-Qualität.

3.2.7 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen, die in einer 6-Well-Platte ausgelegt worden waren, in ihrem Wachstumsmedium ausgesät. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit kaltem, steril filtriertem PBS (1X) gewaschen und anschließend mit 4% PFA für 10-15 Minuten fixiert.

Nachdem das PFA abgesaugt wurde, wurden die Deckgläschen mit den fixierten Zellen dreimal mit steril filtriertem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml steril filtriertem PBS bedeckt. Die Deckgläschen konnten so bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Der Primärantikörper wurde in Antibody Diluent auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt (Anti-SerpinB2-Antikörper 1:200) und auf die Deckgläschen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung zunächst von den Deckgläschen abgekippt und diese wurden für 2 Minuten in PBS (1X) gewaschen. Im Folgenden wurde das Dako LSAB[®]2 System-HRP Kit verwendet. 1-2 Tropfen Biotinylated link wurden auf die Deckgläschen getropft und für eine halbe Stunde in der Feuchtkammer inkubiert, bevor die Lösung wieder abgekippt und die Deckgläschen für 2 Minuten in PBS gewaschen wurden. Daraufhin wurden 1-2 Tropfen Streptavidin-HRP aufgetropft, wieder für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert und anschließend abgekippt. Nachdem die Deckgläschen für 2 Minuten in PBS gewaschen wurden, wurde nun das Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System Kit verwendet und die Substratlösung, bestehend aus DAB+Chromogen und DAB+Substrate Buffer im Verhältnis 1:50, auf die Deckgläschen gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Lösung abgekippt und die Deckgläschen wurden für 2 Minuten in Aqua monodest gewaschen. Es folgte die Kernfärbung mit Hämalaunlösung (1:5 in Aqua bidest) für 2 Minuten, dann wurde die Hämalaunlösung abgekippt und die Deckgläschen für 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Vor dem Eindecken mit Aquatex[®] wurden die Deckgläschen kurz mit Aqua monodest gespült. Bis zur Mikroskopie wurde eine Trocknungszeit von mindestens 24 Stunden gewahrt.

Bis zum Eindecken wurde stets eine ausreichende Bedeckung der Deckgläschen mit Flüssigkeit sichergestellt, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.2.8 Proteinextraktion und Messung der Proteinkonzentration

Die Zellen einer 25 cm² Zellkulturflasche wurden zunächst mit kaltem, steril filtriertem PBS gewaschen, bevor 150-350 µl Lysepuffer auf die Zellen pipettiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und mitsamt des Lysepuffers in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde bei 10°C und 12.000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verwendung abpipettiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tab. 5: Zusammensetzung des Protein-Lysepuffers

Urea	4,2 g
Thiourea	1,524 g
CHAPS	0,4 g
DTT	0,0616 g
Proteinaseinhibitor	1 Tablette
Aqua bidest.	auf 10 ml auffüllen

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit II nach Protokoll des Herstellers verwendet. Dieses bedient sich des Farbumschlags von Coomassie-Brillantblau G-250 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration in einer wässrigen Lösung. Während der Farbstoff in ungebundener Form ein Absorptionsmaximum bei 470 nm aufweist und somit rot erscheint, verschiebt sich das Absorptionsmaximum durch Komplexbildung mit Proteinen auf 595 nm, der Farbstoff erscheint blau.

Der Farbumschlag wurde mithilfe des Absorptions-Mikroplatten-Readers Sunrise gemessen. Als Standardprotein zur Kalibrierung diente dabei BSA, sodass die Proteinkonzentration in den Proben abhängig von diesem Standard berechnet werden konnte.

3.2.9 Western Blot

Western Blotting ist eine Methode, bei der die Proteinbanden elektrophoretisch aufgetrennter komplexer Proteingemische auf eine Membran übertragen und anschließend immunologisch detektiert und identifiziert werden. Mithilfe dieses

Verfahrens können die aus einer qPCR gewonnenen Erkenntnisse über die Expression eines gesuchten Gens auf Proteinebene verifiziert werden.

Dafür müssen die Proteine zuerst in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden, woraufhin sie auf eine Trägermembran übertragen werden. Die Proteinbanden auf der Membran werden mithilfe eines Erst- und Zweitantikörpers sowie eines Chemilumineszenz-Substrats sichtbar gemacht. Es wird immer ein Marker mitgeführt, um die Höhe der Bande einer Proteingröße (Molekulargewicht) zuordnen zu können.

Tab. 6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel	
Aqua bidest	3,3 ml
30% Acrylamide mix	4,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
Sammelgel	
Aqua bidest	1,4 ml
30% Acrylamide mix	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra-Vertical-Electrophoresis-for-Handcast-Gels-System verwendet, mit dem Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, von 1 mm Dicke hergestellt wurden. Es wurden jeweils das 40 µg Protein enthaltende Volumen einer Probe zusammen mit 5 µl Ladepuffer zunächst für fünf Minuten bei 95°C inkubiert, anschließend kurz gevortext, zentrifugiert und vorsichtig in eine bereits mit Laufpuffer gefüllte Geltasche pipettiert. Als Marker wurde der Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker verwendet. Für die Elektrophorese wurde zunächst eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt. Sobald sich alle Proben auf der gleichen Höhe befanden, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht und so lange belassen, bis sich die Markerbanden ausreichend aufgetrennt hatten. Die Proteine

wurden mithilfe des mit Transferpuffer gefüllten Trans-Blot®-transfer-cell-Tank-Blot-Systems auf eine Amersham Hybond PVDF Blotting Membrane übertragen. Dies erfolgte bei 6°C bei einer Stromstärke von 1 A für mindestens zwei Stunden. Nach kurzem Spülen in TBS wurde die Membran dann für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer (3% Milch in TBS/T) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (SerpineB2-Antikörper 1:500 in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran nach drei Waschschritten à 10 min in TBS/T für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Goat-anti-Rabbit-Antikörper 1:10.000 in TBS/T) inkubiert. Nach weiteren drei zehnminütigen Waschschritten in TBS/T wurde das WesternBright™-ECL-Western-blotting-detection-Kit nach Protokoll des Herstellers und das ChemiDoc™Touch-Imaging-System verwendet, um die Banden sichtbar zu machen. Um eine Referenz für die Bandenstärke zu haben, wurden nach zehnminütigem Waschen der Membran in Strippingpuffer anschließend die α -Tubulin Banden detektiert (α -Tubulin-Antikörper 1:5.000 in Blockpuffer; Goat-anti-Mouse-Antikörper 1:10.000 in TBS/T). Für die Auswertung wurde die Image Lab™ V 6.0.0 Software genutzt.

Tab. 7: Zusammensetzung des Laufpuffers (10X) für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, dieser wurde mit Aqua bidest auf das Einfache verdünnt.

TRIS	30 g
Glycin	144 g
SDS	6 g
Aqua bidest.	Auf 1 Liter auffüllen

Tab. 8: Zusammensetzung des Transferpuffers für das Blotten

Glycin	42 g
TRIS	9 g
Methanol	600 ml
Aqua bidest.	Auf 3 Liter auffüllen

Tab. 9: Zusammensetzung des Strippingpuffers zum Entfernen der gebundenen Antikörper auf der Blotting-Membran

Glycin	15g
HCl	pH auf 2,5 einstellen
Tween 20	500 µl
Aqua bidest.	Auf 1 Liter auffüllen

Tab. 10: Zusammensetzung des TBS-Puffers (10X), dieser wurde mit Aqua bidest auf das Einfache verdünnt.

TRIS	24,2 g
NaCl	80 g
HCl(aq)	pH auf 7,5 einstellen
Aqua bidest.	Auf 1 Liter auffüllen

Tab. 11: Zusammensetzung des TBS/T-Puffers

TBS (10X)	100 ml
Tween 20	1 ml
Aqua bidest.	Auf 1 Liter auffüllen

3.2.10 MTT-Test

Der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in metabolisch aktiven Zellen zu blauen Formazankristallen reduziert. Die metabolische Aktivität korreliert stark mit der Zellviabilität, daher eignet sich der MTT-Test, um die Viabilität von Zellen unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen. Führt man den Test außerdem nach unterschiedlich langer Inkubationszeit der Zellen durch, lassen sich Rückschlüsse auf die Zellproliferation ziehen.

Um den Einfluss des SERPINB2-Knockouts in SV80-Zellen auf deren Proliferation zu untersuchen, wurde der MTT-Test mit einem Kontroll- und drei Knockout-Klonen durchgeführt.

Dafür wurden zunächst in jeweils 12 Wells einer 24-Well-Platte 25×10^3 Zellen in 500 μl Selektionsmedium ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden in jedes Well 50 μl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in HBSS) zugegeben, dann folgte eine Inkubationszeit von vier Stunden. Anschließend wurde alle Flüssigkeit aus den Wells abgekippt und die Well-Platten wurden vorsichtig auf Zellstoff trockengeklopft. Sodann konnten pro Well 100 μl DMSO hinzugegeben werden, um die Zellen zu lysieren und die Formazankristalle freizusetzen. Die Platten wurden vorsichtig gerüttelt, bis alle Kristalle in Lösung gegangen waren, woraufhin am Absorptions-Mikroplatten-Reader Sunrise die optische Dichte der Lösungen bei einer Messwellenlänge von 570 nm gemessen wurde.

3.2.11 Wound-Healing-Test

Mit dem Wound-Healing-Test sollte die Auswirkung des SERPINB2-Knockouts in SV80-Zellen auf deren Migrationsfähigkeit untersucht werden. Bei diesem Test wird beobachtet, wie schnell die Zellen eine zugefügte „Wunde im Zellrasen“ schließen können.

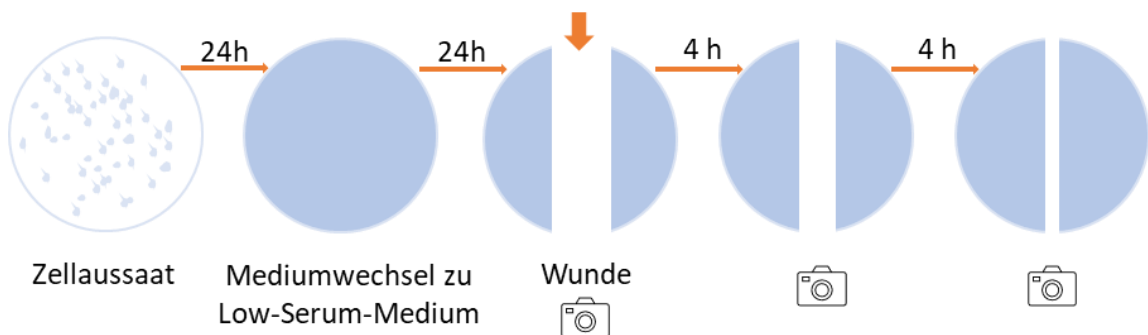


Abb. 2: Arbeitsablauf Wound-Healing-Test

Je 3×10^5 Zellen von einem Kontroll- und drei Knockoutklonen wurden in jeweils 3 Wells einer 12-Well-Platte in normalem Selektionsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium durch serumreduziertes Selektionsmedium mit nur 1% FBS ersetzt. Dies erfolgte, damit bei diesem Versuch tatsächlich die Migration mit einem möglichst geringen Einfluss der Proliferation

untersucht werden konnte. Weitere 24 Stunden später wurde mit einer sterilen 100µl-Pipettenspitze eine Wunde durch den Zellrasen vom oberen bis zum unteren Rand eines jeden Wells gekratzt. Um Zelldebris zu entfernen, wurden daraufhin 80% des Mediums abgesaugt und durch frisches serumreduziertes Selektionsmedium ersetzt. Der Abstand zwischen den Wundrändern wurde durch Fotos zum Zeitpunkt 0, nach 4 Stunden und nach 8 Stunden dokumentiert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ausgewertet.

3.2.12 Kollagengel-Kontraktions-Test

Die Fähigkeit von Zellen, die Kontraktion der extrazellulären Matrix zu beeinflussen, kann mithilfe eines Kollagengel-Kontraktions-Tests beobachtet werden. Auch hier sollte wieder der Einfluss des SERPINB2-Knockouts in SV80-Zellen untersucht werden, weshalb der Versuch mit einem Kontroll- und drei Knockoutklonen durchgeführt wurde. Es wurde das Cell Contraction Assay Kit von Cell Biolabs verwendet und dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Auf Eis wurde eine Kollagen-Arbeitslösung hergestellt, die im Verhältnis 4:1 mit einer 3×10^5 Zellen enthaltenden Zellsuspension gemischt wurde. Das zellbeladene Kollagen (Gesamtvolumen = 500 µl) wurde in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit polymerisierte das Gel und konnte anschließend mit 1 ml Selektionsmedium bedeckt werden. Nach zwei Tagen Inkubation wurden die Gelränder mit einem sterilen Spatel vom Rand des Wells gelöst, um die Kontraktion der Gele zu ermöglichen. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. An den Tagen 1, 3 und 5 nach dem Lösen der Gelränder wurden die Gele fotografiert, um Veränderungen der Gelflächen zu dokumentieren. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ.

3.2.13 Ko-Kultur

PANC-1-Zellen und transfizierte SV80-Zellen wurden in Ko-Kultur kultiviert. In Vorversuchen wurde dafür die optimale auszusäende Zellzahl für eine gute RNA-Ausbeute bestimmt. Außerdem wurden versuchsweise beide Zelllinien im Wachstumsmedium der jeweils anderen Zelllinie kultiviert. Da sowohl die PANC-1-Zellen

als auch die SV80-Zellen weiterhin gut proliferierten, wurden während der Ko-Kultivierung beide Medien verwendet, obwohl über die Membran der Zellkultureinsätze ein Austausch dieser stattfinden kann.

Schließlich wurden die Zellen zunächst separat bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert: PANC-1-Zellen wurden zu 15x10⁴ Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte in 2 ml ihres normalen Wachstumsmediums ausgesät, während die transfizierten SV80-Zellen (ein Kontroll- und drei Knockoutklone) in Thin Cert® Zellkultureinsätzen für 6-Well-Platten mit 1 µm Poren ebenfalls zu 15x10⁴ Zellen pro Einsatz ausgesät wurden. In die Einsätze sowie in die darunterliegenden Wells wurden jeweils 2 ml ihres normalen Wachstumsmedium (ohne Puromycin) gegeben. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Medien, woraufhin die Zellkultureinsätze mit den SV80-Zellen in die mit PANC-1-Zellen bewachsenen Wells umgesetzt wurden. Nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation der Ko-Kulturen bei 37°C und 5% CO₂ wurde jeweils die RNA der PANC-1-Zellen wie in 3.2.4 beschrieben isoliert. Es wurde zu jedem Zeitpunkt auch die RNA aus PANC-1-Zellen isoliert, die parallel zu den Ko-Kulturen in der 6-Well-Platte, aber ohne Zellkultureinsatz mit SV80-Zellen, kultiviert worden waren.

3.2.14 RNA-Sequenzierung

Alle Zellen eines Menschen haben dasselbe Genom, lesen aber nicht alle die gleichen Gene ab. Eine RNA-Sequenzierung gibt Aufschluss darüber, welche Gene in welcher Stärke transkribiert werden. So kann auch das Transkriptom von Zellen unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden.

Bevor die Sequenzierung durchgeführt werden kann, ist zunächst eine *library preparation* erforderlich. Dafür wird die mRNA einer jeden Probe durch Poly-A-Enrichment angereichert. Die RNA wird dann fragmentiert, bevor sie per Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wird. Über Adapter binden die denaturierten cDNA-Fragmente anschließend an Oligonukleotide in der *flow cell*, wo im nächsten Schritt die Amplifikation der Fragmente per Brücken-PCR folgt. So entstehen Cluster von gleichen Fragmenten, die nun sequenziert werden können. Dies erfolgt per *sequencing by synthesis*. Dabei wird ein zum Fragment komplementärer Strang mit speziellen

Nukleotiden synthetisiert. Diese Nukleotide sind fluoreszenzmarkiert und behindern die weitere Synthese so lange, bis das Fluoreszenzsignal ausgelesen und die Fluoreszenzmarkierung entfernt worden ist. Somit kann das Fragment Nukleotid für Nukleotid abgelesen und seine Basenfolge registriert werden, da jeder Farbe eine bestimmte Base zugeordnet ist. Dabei werden jeweils die Fragmente eines Clusters als ein gemeinsames Signal ausgelesen, da das Signal eines einzelnen Fragments zu schwach wäre. Die so erfasste Information über die Basenabfolge der Fragmente eines Clusters wird als *read* bezeichnet. Die Gesamtheit der *reads* einer Probe wird beim sogenannten „Mapping“ mit einem Referenzgenom abgeglichen und ihren Ursprungsgenen zugeordnet, wodurch Analysen zur Genexpression vorgenommen werden können.

Die Sequenzierung von RNA-Proben von den PANC-1-Zellen in Ko-Kultur mit transfizierten SV80-Zellen wurden von der Firma Novogene übernommen. Es wurden mindestens 200 ng pro Probe eingeschickt, die vor der weiteren Verarbeitung einer Qualitätskontrolle unterzogen wurden. Die Integrität und Reinheit der RNA wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese, NanoDrop™ und Agilent 2100 Bioanalyzer sichergestellt. Es folgte die *library preparation* und eine weitere Qualitätskontrolle, bevor die eigentliche *paired-end* Sequenzierung der 150 bp großen Fragmente mit der Illumina PE150-Technologie durchgeführt wurde. Pro Probe wurden mindestens 20 Millionen *reads* ausgelesen.

Die Rohdaten wurden anschließend von Novogene hinsichtlich ihrer Fehlerraten für einzelne Basen und der GC-Verteilung überprüft. Nur *reads* von hoher Qualität wurden für die weiteren Schritte berücksichtigt. Für das Abgleichen der *reads* mit dem Referenzgenom GRCh38/hg38 wurde das HISAT2-Programm verwendet. Da die ermittelten *readcounts* pro Gen allerdings nicht nur von dessen Expressionsstärke, sondern auch von dessen Länge und der Gesamtmenge der *reads* pro Probe abhängig sind, wurde noch die Normalisierung auf „Fragments per kilobase of transcript sequence per million base pairs sequenced“ (= FPKM) vorgenommen. Ab einem FPKM-Wert von über 1 wurde ein Gen als exprimiert angesehen.

Für die Analyse differentiell exprimierter Gene zwischen Interventions- und Kontrollgruppe verwendete Novogene die Software DESeq2. Ab einem $\log_2(\text{FoldChange}) \geq 1$ und einem adjustierten p-Wert $\leq 0,05$ galt ein Gen als differentiell

exprimiert.

Gen-Set-Enrichment-Analysen (GSEA) wurden mit der freundlichen Unterstützung von Dr. rer. nat. Markus Glaß (Institut für Molekulare Medizin der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Es wurden die GSEA-Software und die „hallmark“- und „canonical pathways“-Gen-Sets der Molecular Signature Database (MSigDB) verwendet.

Bei der GSEA werden für jede Probe die Gene nach ihrem $\log_2(\text{FoldChange})$ geordnet und es wird analysiert, ob die Gene eines bestimmten Gen-Sets in der Liste der geordneten Gene am oberen oder unteren Ende angereichert sind. Diese Gen-Sets sind so zusammengestellt, dass sie einen bestimmten biologischen Prozess oder auch eine bestimmte Lage auf einem Chromosom repräsentieren. Mit dieser Methode werden auch jene Gene in die Analyse mit einbezogen, die nicht signifikant differentiell exprimiert sind. So werden auch viele kleine Unterschiede in der Genexpression, die aber alle dem gleichen Prozess zugeordnet werden und somit in der Gesamtheit entscheidende Hinweise auf die Auswirkung einer Intervention geben können, erfasst.

3.2.15 Patientenmaterial

Per qPCR wurden insgesamt 82 RNA-Proben aus PSCs sowie aus Pankreasgewebe auf ihre SerpinB2-Expression untersucht. Diese Proben entstammten an chronischer Pankreatitis oder PDAC erkrankten Patienten, die ihre Einwilligung zur Verwendung des Materials für Forschungszwecke gegeben hatten. Ein Ethikvotum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität liegt vor (Bearbeitungs-Nummer 2019-037).

Tab. 12: Patientenproben. Geschlecht, Alter und TNM-Status (bei RNA aus PDAC) der Patienten, deren RNA-Proben auf die SerpinB2-Expression untersucht wurden.

	Pankreatitis				PDAC					
	PSCs		Gewebe		PSCs				Gewebe	
	m/w	Alter	m/w	Alter	m/w	Alter	TNM	m/w	Alter	TNM
1	m	56	m	58	w	80	pT2 pN0 M0	w	65	pT3 pN1 Mx
2	m	51	m	52	w	88	pT2 pN1 M0	w	62	pT2 pN1 Mx
3	m	41	m	39	w	83	pT2 pN0 M0	w	58	pT3 pN1 Mx
4	w	72	w	63	m	79	pT3 pN0 M0	w	70	pT1 pN0 Mx
5	m	56	m	45	m	60	pT2 pN2 M0	m	77	pT3 pN1 Mx
6	m	61	m	63	w	68	pT3 pN2 M0	m	71	pT3 pN1 Mx
7	m	36	w	47	m	82	pT2 pN2 M0	w	73	pT3 pN1 Mx
8	m	47	m	42	m	60	pT3 pN2 M0	m	58	pT3 pN0 Mx
9	m	60	w	75	m	61	pT3 pN2 M0	m	65	pT3 pN1 Mx
10	m	53	m	43	m	57	pT2 pN1 M0	m	68	pT2 pN0 Mx
11	m	54	m	38	m	58	pT2 pN1 M0	w	61	pT3 pN0 Mx
12	w	77	m	53	w	78	pT2 pN1 M0	m	67	pT3 pN0 Mx
13	m	45	m	33	w	68	pT2 pN1 M0	m	57	pT4 pN1 Mx
14	m	62	w	29	m	73	pT2 pN0 M0	m	64	pT2 pN1 M0
15	m	37	m	46	m	75	pT2 pN0 M0	m	74	pT4 pN0 M0
16			m	59	w	57	pT2 pN2 M0	w	57	pT3 pN1 M0
17			m	74	m	66	pT3 pN1 Mx	m	66	pT3 pN1 Mx
18			m	65	w	78	pT2 pN2 M0	w	61	pT3 pN0 Mx
19			w	51	w	60	pT3 pN2 M0	w	67	pT4 pN1 M0
20			m	37	m	79	pT3 pN1 M0	w	70	pT3 pN0 Mx
21			m	36	m	68	pT2 pN2 M0	w	69	pT3 pN1 M1
22					m	76	pT2 pN1 M0	w	64	pT4 pNx Mx
23								m	57	pT3 pN1 M1
24								m	64	pT3 pN1 Mx

3.2.16 Statistik

Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Biologische Replikate wurden zusammengefasst. In Abbildungen wurde jeweils der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die Überprüfung der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte in Abhängigkeit der Datenverteilung mittels parametrischen t-Tests oder nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests (jew. *two-tailed*). Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert <0,05 angenommen. Dieser wurde mit der Software GraphPad PRISM berechnet.

4. Ergebnisse

Die unter 4.1 bis 4.3 aufgeführten Ergebnisse wurden bereits in der Publikation „Analysis of genomic alterations in cancer associated human pancreatic stellate cells“ (Böker et al. 2022) veröffentlicht.

4.1 Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion

Das in dieser Arbeit zur Transfektion verwendete Plasmid enthielt unter anderem ein Puromycin-Resistenzgen, was die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mittels Puromycin ermöglichen sollte.

Zunächst musste dafür die geringste zum Abtöten nicht transfizierter Zellen notwendige Konzentration von Puromycin ermittelt werden. So konnten die transfizierten Zellen anschließend selektioniert werden, ohne sie einer unnötig hohen, möglicherweise schädlichen Puromycinkonzentration auszusetzen.

Nach siebentägiger Inkubation mit puromycinhaltigem Wachstumsmedium überlebten bei einer Puromycinkonzentration von 0,1 µg/ml noch einige SV80-Zellen. Dagegen waren ab einer Puromycinkonzentration von 0,15 µg/ml nach sieben Tagen alle Zellen abgestorben. Daher wurde diese Konzentration als optimal zur antibiotischen Selektion angenommen. Um ein Selektionsmedium für die transfizierten SV80-Zellen herzustellen, wurden demnach fortan 0,15 µg/ml Puromycin dem normalen SV80-Wachstumsmedium zugegeben.

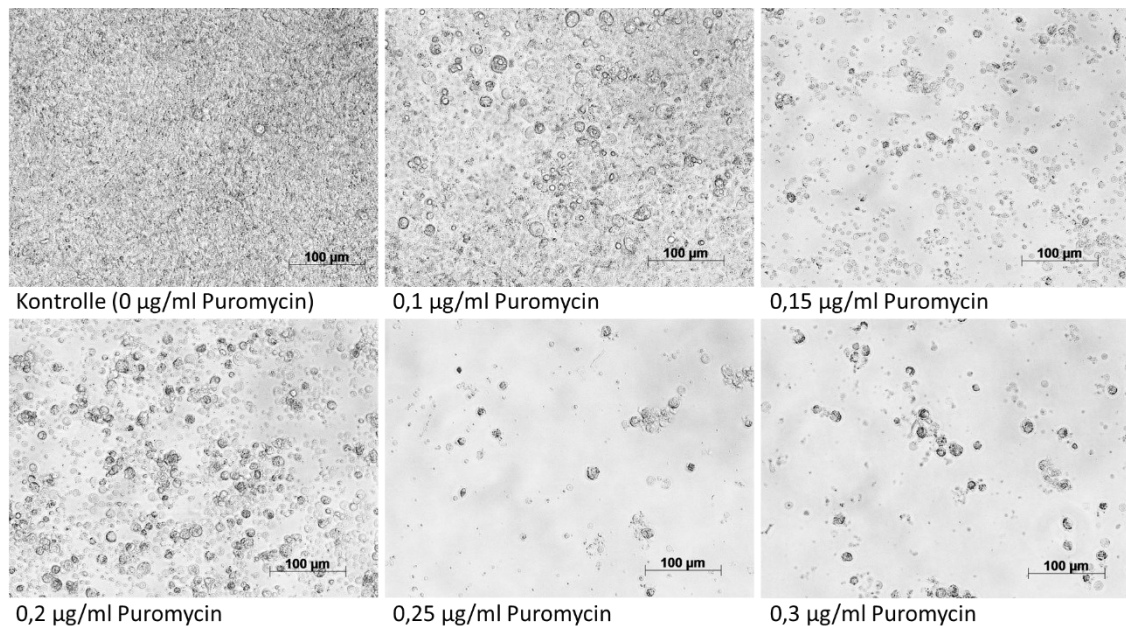


Abb. 3: SV80-Zellen nach siebentägiger Inkubation mit puromycinhaltigem Wachstumsmedium. Im Kontrollwell ohne Puromycinzugabe sowie in dem Well mit einer Puromycinkonzentration von 0,1 µg/ml sind lebende Zellen zu finden, während in den Wells mit einer Puromycinkonzentration von $\geq 0,15$ µg/ml Puromycin nur noch abgestorbene Zellen schwimmen. Daher wurde 0,15 µg/ml Puromycin als die zur Selektion optimale Konzentration ausgewählt.

4.2. Transfektion und Auswahl geeigneter Klone für funktionelle Analysen

Nach der Transfektion mussten die erfolgreich transfizierten Zellen selektioniert werden. Am fünften Tag nach der Transfektion und Inkubation in Selektionsmedium zeigten erste Zellen Fluoreszenz. Dies bewies, dass die Transfektion mit dem Plasmid, welches auch ein GFP-Gen enthielt, in diesen Zellen erfolgreich war. Weiterhin stellte das Überleben und Proliferieren im Selektionsmedium dank des im Plasmid enthaltenen Puromycin-Resistenzgens einen Beweis für den Erfolg der Transfektion dar. So konnten einzelne, aus jeweils einer Ursprungszelle hervorgegangene Zellklonhaufen beobachtet werden, die gut proliferierten. Dabei zeigten sich alle drei Transfektionsansätze mit den verschiedenen Verhältnissen von Plasmid zu Transfektionsreagenz erfolgreich. Zwei Wochen nach der Transfektion waren die Zellklonhaufen so stark gewachsen, dass sie gepickt und in ein eigenes Well zur weiteren Kultivierung überführt werden konnten.

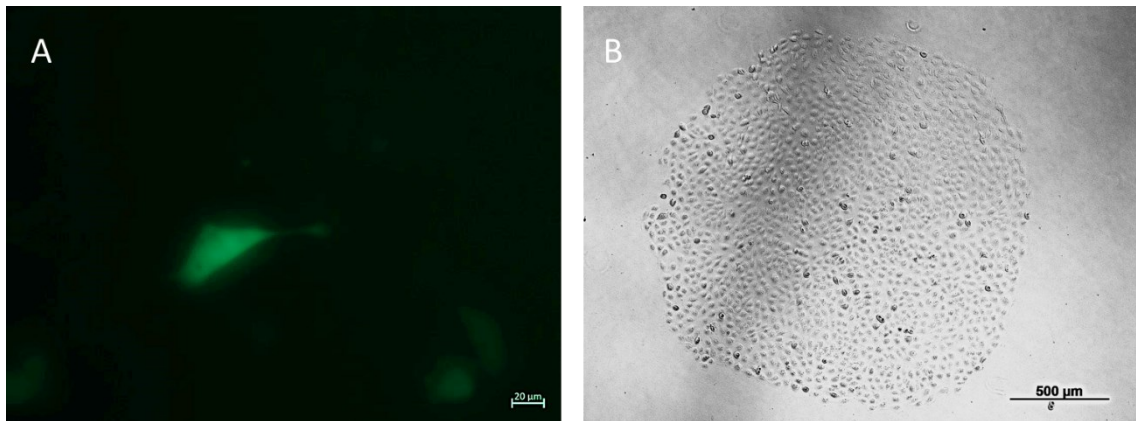


Abb. 4: Transfizierte SV80-Zellen. **A:** Die erfolgreiche Transfektion ist anhand des fluoreszierenden GFP zu erkennen. **B:** Auch aus einer Ursprungszelle hervorgegangene und trotz Selektionsmedium proliferierende Zellklonhaufen bezeugen den Erfolg der Transfektion.

Die vereinzelt Klone wurden weiter in Selektionsmedium kultiviert, sodass von 49 Klonen, davon 14 Kontrollklone und 35 Knockoutklone, RNA isoliert werden konnte. Nach Reverser Transkription wurden diese RNA-Proben per qPCR auf die Expression von SerpinB2 untersucht. Dadurch konnte die Auswahl auf vier Klone (ein Kontrollklon und drei Knockoutklone), die besonders für weitere Analysen geeignet schienen, eingegrenzt werden. Bei diesen wurde die SerpinB2-Expression zusätzlich zur qPCR noch per Immunzytochemie und Western Blot überprüft. Diese Überprüfung bestätigte eine gute SerpinB2-Expression im Kontrollklon sowie die Abwesenheit von SerpinB2 in den Knockoutklonen auch auf Proteinebene.

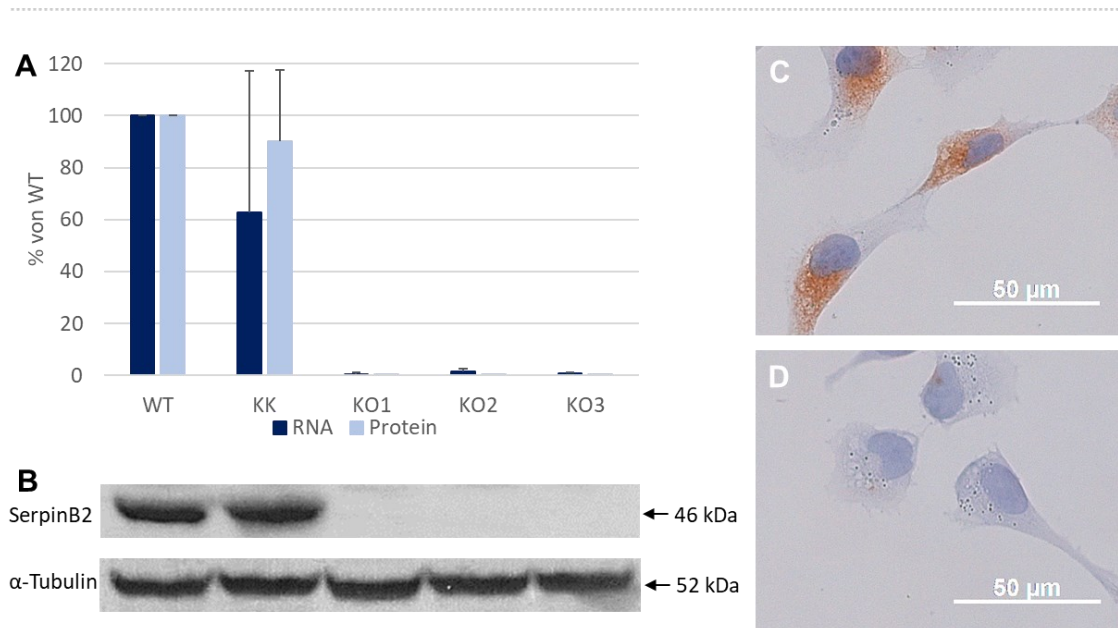


Abb. 5: SERPINB2-Knockout in SV80-Zellen. **A:** Im Vergleich zum Wildtyp (WT) ist die SerpinB2-mRNA im transfizierten Kontrollklon (KK) auf 62% reduziert, während in den Knockoutklonen (KO1-3) kaum bis gar keine SerpinB2-mRNA nachweisbar ist. **B:** Auch im Western Blot weist der Kontrollklon eine deutliche SerpinB2-Expression von 90% im Vergleich zum WT auf (Densitometrie aufgeführt in **A**). In Kontrast dazu wurde in den Knockoutklonen auch auf Proteinebene kein SerpinB2 detektiert. Immunzytochemische Färbungen mit einem SerpinB2-Antikörper zeigen eine starke Färbung des Kontrollklons (**C**) und nur schwache bis keine Färbung in den Knockoutklonen (**D**).

4.3. Funktionelle Analysen

Für die Auswertung der funktionellen Analysen wurden die Daten der Knockoutklone zusammengefasst, um sie dem Kontrollklon gegenüberzustellen. Dies soll für eine bessere Übersichtlichkeit sorgen.

4.3.1 Proliferation

Mit dem MTT-Test sollten mögliche Unterschiede in der Proliferation zwischen dem Kontrollklon und den Knockoutklonen aufgezeigt werden. Tatsächlich wurden zu allen drei Messzeitpunkten mehr vitale Kontrollklonzellen als Knockoutklonzellen nachgewiesen. Dabei war der Unterschied der gemessenen optischen Dichte nach 24

Stunden nur gering, nach 48 und 72 Stunden hingegen schon signifikant. Insgesamt nahm der Wert bei den Kontrollklonellen im Zeitraum vom ersten bis zum letzten Messzeitpunkt um den Faktor 3,6 zu, während er sich bei den Klonen mit SERPINB2-Knockout lediglich verdreifachte. Dies deutet auf einen abschwächenden Effekt des SERPINB2-Knockouts auf die Proliferation der SV80-Zellen hin.

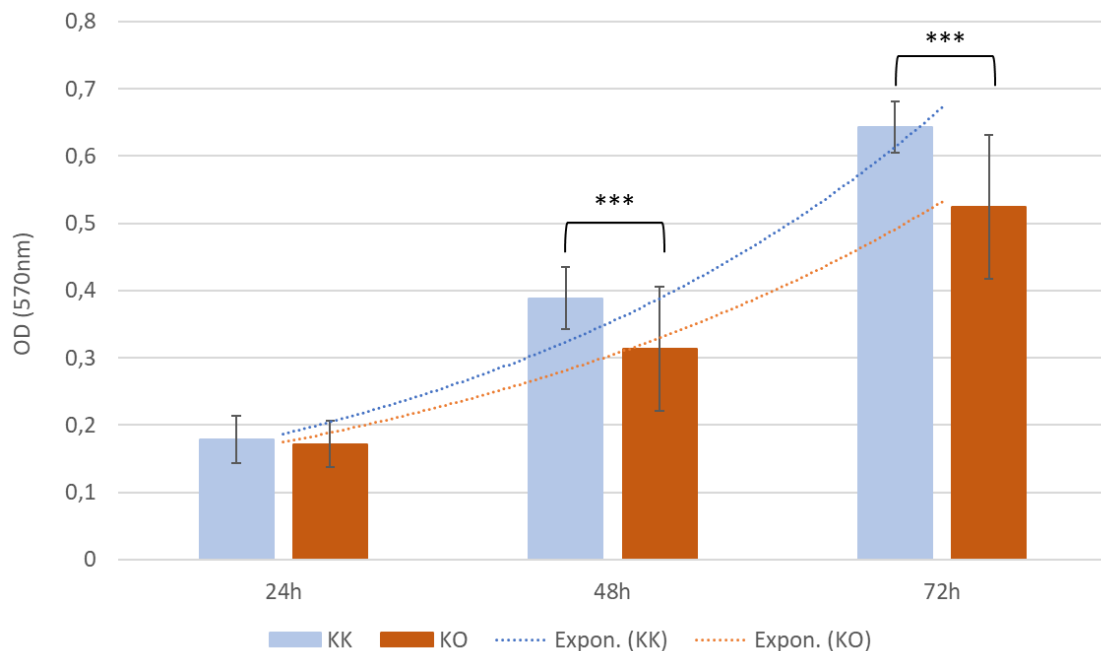


Abb. 6: MTT-Test zum Überprüfen der Proliferation transfizierter SV80-Zellen: Die Anzahl vitaler Zellen ist beim Kontrollklon (KK) zu allen drei Zeitpunkten höher als bei den Knockoutklonen (KO). Auch nimmt sie innerhalb der gemessenen Zeit beim Kontrollklon stärker zu als bei den Knockoutklonen, die Knockoutklone zeigen im Vergleich zum Kontrollklon folglich eine geringere Proliferation.

4.3.2 Migration

Der Wound-Healing-Test wurde durchgeführt, um die Fähigkeit zur Migration zwischen Kontrollklon und Knockoutklonen zu vergleichen. Mit einer sterilen 100µl-Pipettenspitze ließen sich Wunden von einheitlicher Breite in die Zellrasen kratzen. Bereits nach 4 Stunden zeigte sich in beiden Gruppen ein Wundschluss von über 30%, wobei dieser beim Kontrollklon signifikant stärker war als bei den Knockoutklonen. Nach 8 Stunden bestätigte sich der Trend, dass der Kontrollklon die Wunde durch Migration schneller zu

schließen vermochte als die Knockoutklone; hier betrug der Unterschied im Wundschluss schon fast 10%. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein SERPINB2-Knockout zu verminderter Migrationsfähigkeit in den SV80-Zellen führt.

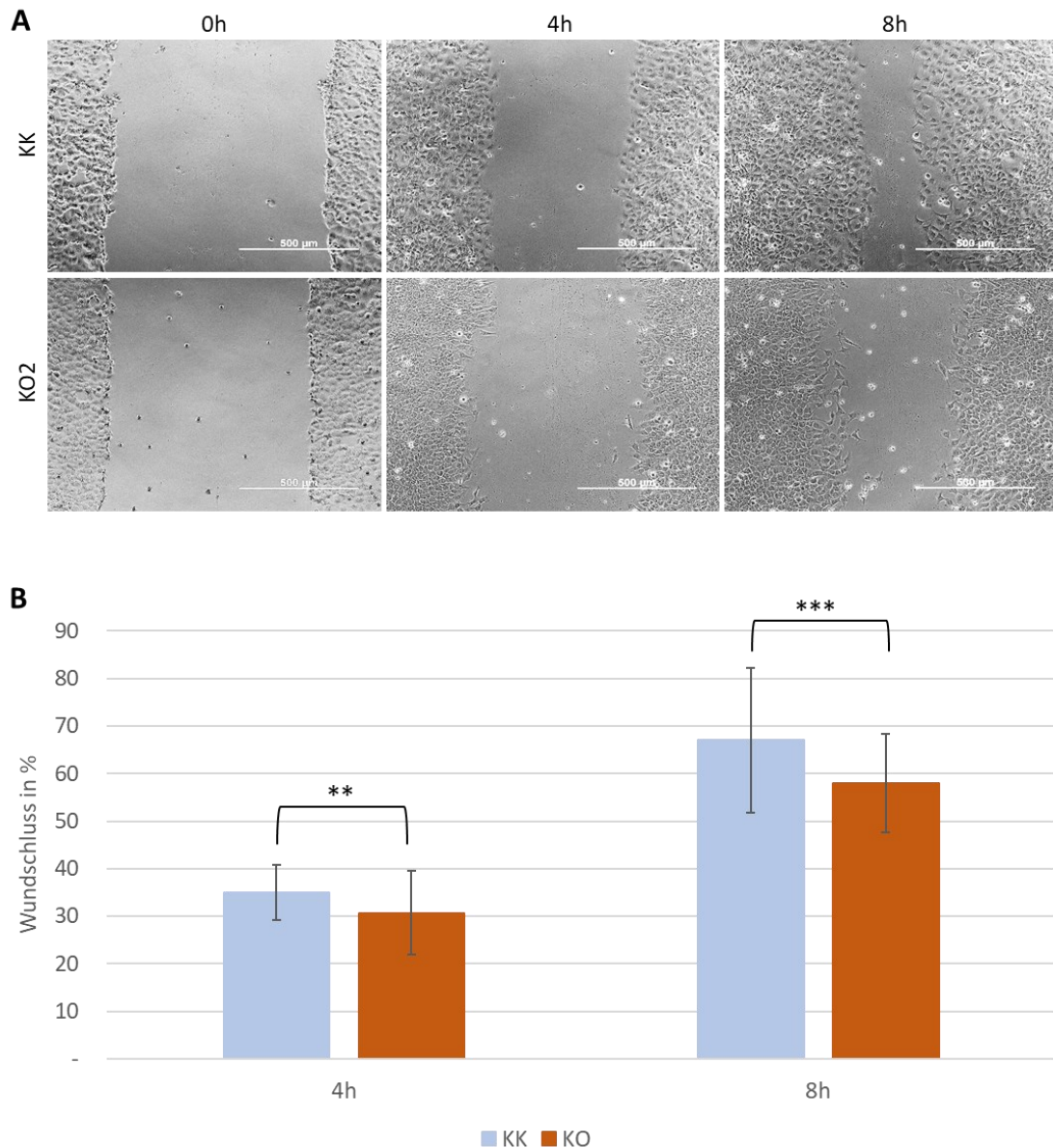


Abb. 7: Wound-Healing-Test zur Überprüfung der Migrationsfähigkeit transfizierter SV80-Zellen. **A:** Die mit einer sterilen 100µl-Pipettenspitze zugefügte Wunde wird von den Zellen durch Migration geschlossen. **B:** 4 Stunden nach Zufügen der Wunde hat der Kontrollklon (KK) diese bereits um 35% geschlossen, die Knockoutklone (KO) hingegen nur um 30,5%. Nach 8 Stunden hat der Kontrollklon einen Wundschluss von 67% erreicht im Vergleich zu 58% Wundschluss bei den Knockoutklonen.

4.3.3 Kollagengel-Kontraktion

Mithilfe des 3D-Kollagengel-Kontraktions-Tests wurde untersucht, inwieweit die transfizierten SV80-Zellen in der Lage waren, ein Kollagengel, in das sie eingebettet waren, zu kontrahieren. Auch hier sollten mögliche Unterschiede im Verhalten der Kontroll- und Knockoutklone detektiert werden. Bereits am ersten Tag nach dem Lösen der Gele von den Wellrändern zeigte sich eine deutliche Kontraktion dieser gegenüber ihrer Ursprungsfläche. Die Beobachtung und Messung der Gelfläche wurde bis zum fünften Tag nach Lösen der Gele fortgeführt, danach begannen die Zellen aus den Gelen auf den Wellboden auszuwachsen. Innerhalb dieser Zeit war zwar eine weitere Kontraktion der Gele zu beobachten, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollklon und den Knockoutklonen. In diesem Versuch zeigte sich demnach keine Auswirkung eines SERPINB2-Knockouts auf das Kontraktionsvermögen der SV80-Zellen.

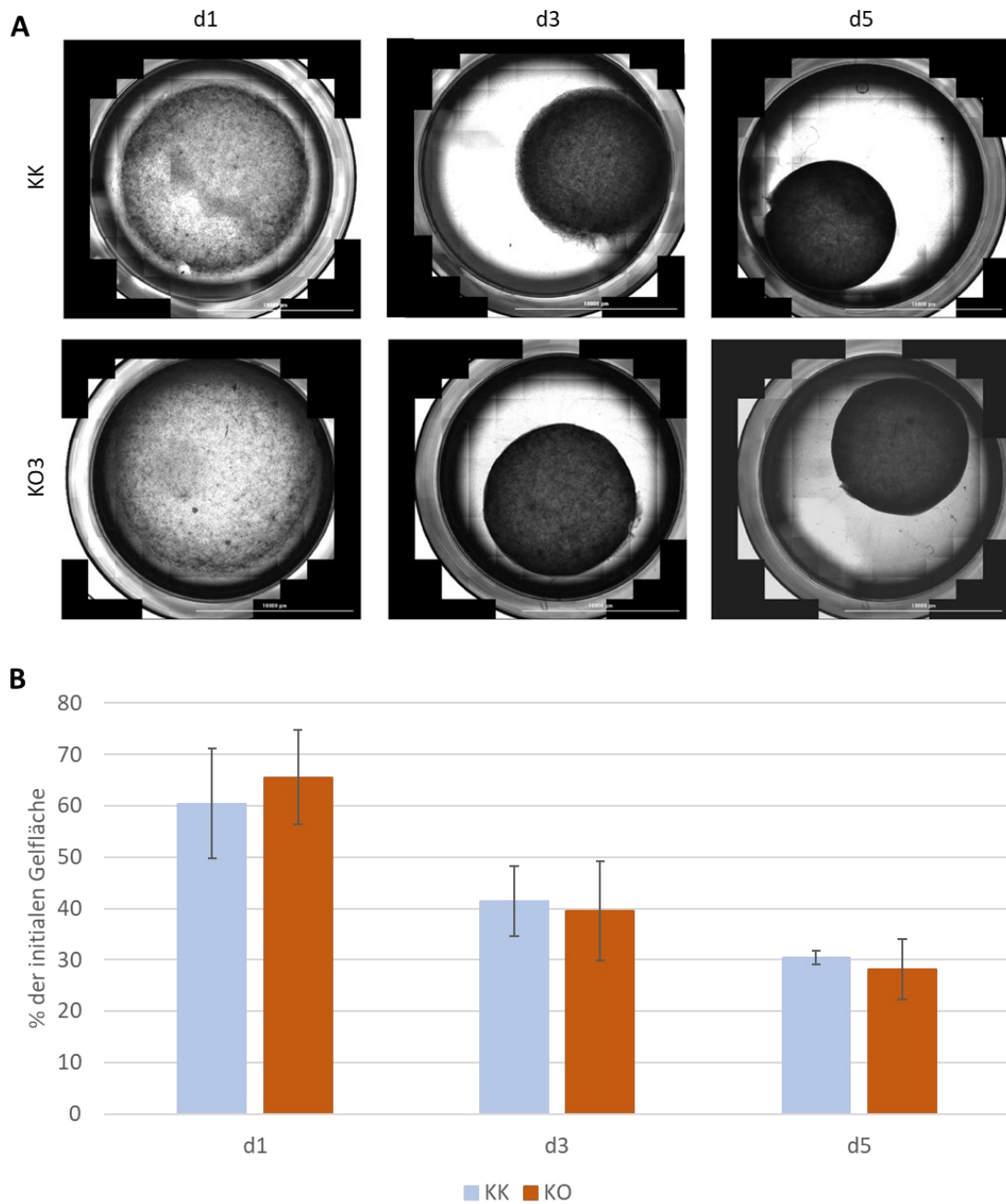


Abb. 8: Kollagengel-Kontraktions-Test. **A:** Die Fläche der Kollagengele nimmt immer weiter ab, da die darin eingebetteten SV80-Zellen die Gele kontrahieren. **B:** Bereits am ersten Tag nach dem Lösen der Gele von den Wellrändern beträgt die Gelfläche nur noch 60% (Kontrollklon=KK) bzw. 65% (Knockoutklone=KO) der Ursprungsfläche, am dritten Tag 40% und nach fünf Tagen 30% in beiden Klongruppen.

4.4 SerpinB2 in PSCs und Pankreasgewebe bei chronischer Pankreatitis und PDAC

Mit qPCR-Analysen sollte der Frage nachgegangen werden, in welchem Ausmaß SerpinB2 in PSCs im Vergleich zum Gesamt-Pankreasgewebe exprimiert wird und das sowohl bei der chronischen Pankreatitis als auch beim PDAC. Es wurden 37 RNA-Proben aus PSC-Zellen untersucht (darunter 15 aus chronischer Pankreatitis und 22 aus PDAC) und 45 RNA-Proben aus Pankreasgewebe (darunter 21 aus chronischer Pankreatitis und 24 aus PDAC).

Zunächst fiel auf, dass in PSCs, egal ob bei der chronischen Pankreatitis oder beim PDAC, SerpinB2 insgesamt sehr viel stärker exprimiert wurde als im Gesamtgewebe. Dabei war die SerpinB2-Expression in den PSCs beim PDAC tendenziell schwächer als bei der chronischen Pankreatitis, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Dagegen ergaben die Analysen der Pankreasgewebe-RNA signifikant höhere SerpinB2-Werte beim PDAC gegenüber der chronischen Pankreatitis. Allerdings lagen diese Werte in einem so niedrigen Bereich, dass der Unterschied trotz Signifikanz insgesamt keine große Rolle spielen dürfte. Aus diesen Daten lässt sich allerdings schlussfolgern, dass die PSCs bei der chronischen Pankreatitis stärker zum Gesamt-SerpinB2-Gehalt im Gewebe beitragen als beim PDAC.

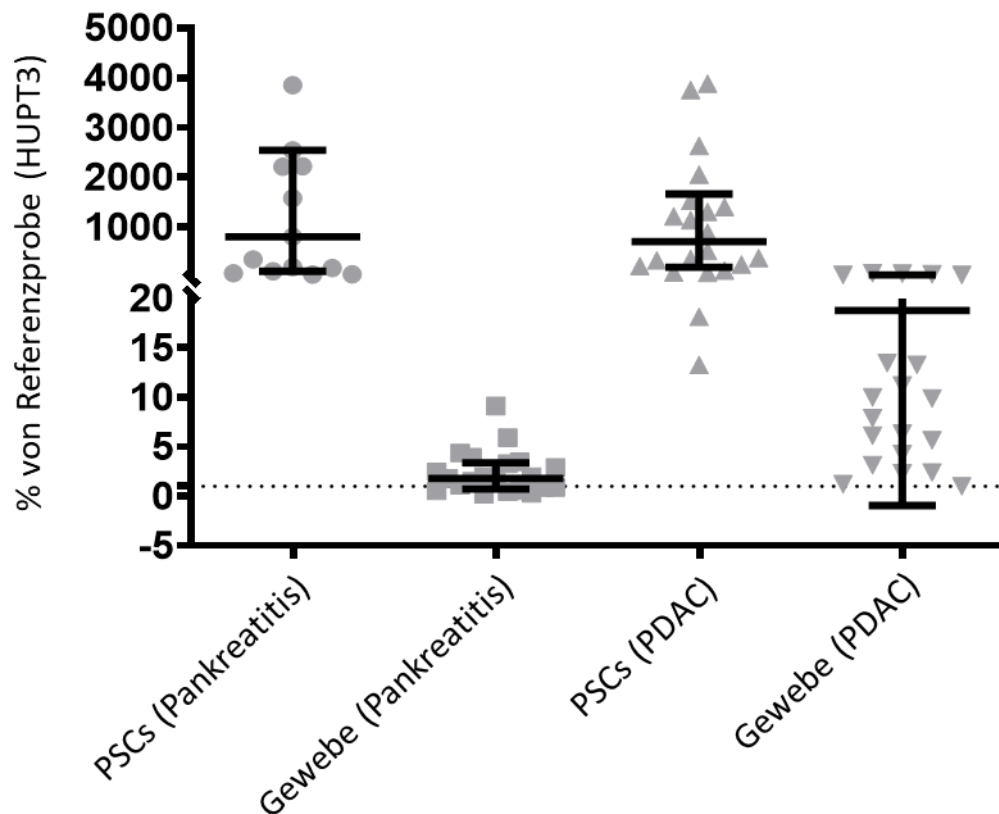


Abb. 9: SerpinB2-Expression in PSCs und in Pankreasgewebe bei chronischer Pankreatitis und bei PDAC. Im Vergleich zu PSCs ist SerpinB2 im Pankreasgewebe kaum exprimiert.

4.5 Ko-Kultur und RNA-Sequenzierung

PANC-1-Zellen wurden mit transfizierten SV80-Zellen ko-kultiviert, um mögliche Auswirkungen des SERPINB2-Knockouts in den Fibroblasten auf die Karzinomzellen untersuchen zu können. Dafür wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur RNA aus den PANC-1-Zellen extrahiert, um diese zu sequenzieren.

4.5.1 Menge und Qualität der *reads*

Die Sequenzierung der RNA-Proben ergab durchschnittlich 69 Millionen *reads* pro Probe. Von diesen musste im Durchschnitt nur 1% aufgrund von Qualitätsmangel aussortiert werden. Über 95% der *reads* einer Probe erreichten einen QPhred-Wert von 20, der einer Fehlerrate von 1% entspricht, und bei über 89% lag ein QPhred-Wert von über 30 vor (Fehlerrate von 0,1%). Dies spricht für eine hohe Qualität der

Sequenzierung. Von den nach der Filterung verbliebenen *reads* konnten durchschnittlich 90% einem einzelnen Genabschnitt des Vergleichsgenoms zugeordnet werden.

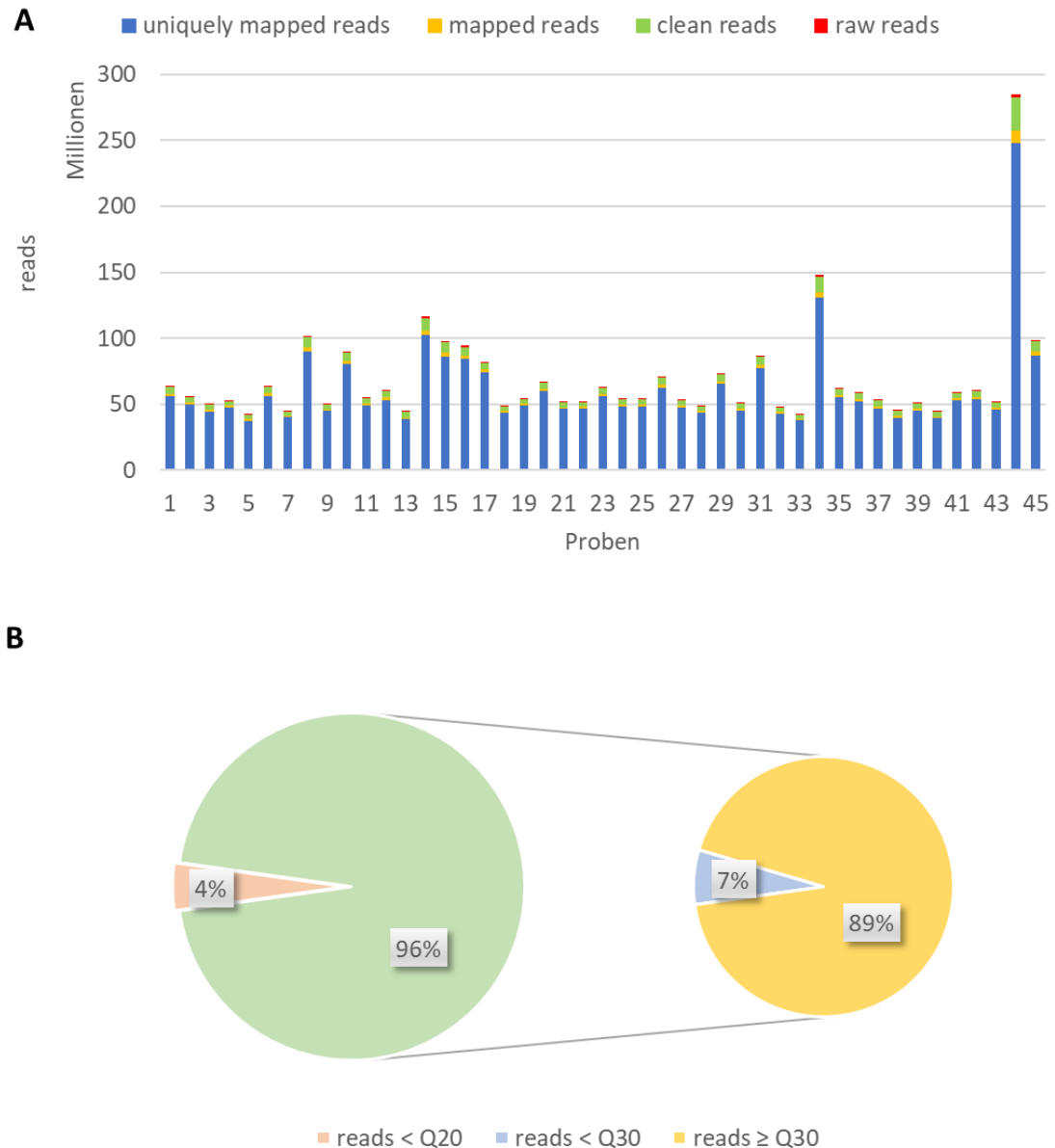


Abb. 10: Reads der sequenzierten RNA aus PANC-1-Zellen ko-kultiviert mit transfizierten SV80-Zellen. A: Dargestellt sind für jede Probe die insgesamt gezählten *reads* und davon anteilig jeweils die *clean reads*, die *reads*, die dem Referenzgenom zugeordnet werden konnten und die *reads*, die einem einzigen Abschnitt zugeordnet werden konnten. **B:** Die QPhred-Werte waren bei > 89% der *reads* ≥ 30.

4.5.2 Differentielle Genexpression und GSEA

Durch die RNA-Sequenzierung konnten einige zwischen den Interventions- und Kontrollzellen differentiell exprimierte Gene aufgezeigt werden. Allerdings blieben die Unterschiede bei keinem Gen nach Korrektur für multiples Testen signifikant.

Tab. 13: In den PANC-1-Zellen aus Ko-Kultur mit SerpinB2-negativen Fibroblasten am stärksten hoch- (A) bzw. herunterregulierte (B) Gene gegenüber PANC-1-Zellen aus Ko-Kultur mit Kontrollfibroblasten nach 72h Stunden Ko-Kultur; Ergebnisse nach 24h und 48h ebenfalls aufgeführt.

A			
Gen	Log2FoldChange 24h <i>adjustierter p-Wert</i>	Log2FoldChange 48h <i>adjustierter p-Wert</i>	Log2FoldChange 72h <i>adjustierter p-Wert</i>
LINC01691	0,3075 > 0,99	0,2431 > 0,99	4,0980 > 0,99
AP000317.2	1,6114 > 0,99	-0,8191 > 0,99	3,9734 > 0,99
PRR33	1,0454 > 0,99	1,3139 > 0,99	3,9730 > 0,99
AC022079.1	-0,1174 > 0,99	-0,8799 > 0,99	3,7592 > 0,99
AC002558.3	0,3303 > 0,99	2,5679 > 0,99	3,7298 > 0,99
POF1B	-0,2696 > 0,99	-2,7039 > 0,99	3,7171 > 0,99
AC093388.1	-1,1586 > 0,99	-0,0864 > 0,99	3,6878 > 0,99
CORIN	-1,7002 > 0,99	-0,9466 > 0,99	3,6319 > 0,99
MAGEA9B	-0,9997 > 0,99	1,0088 > 0,99	3,5902 > 0,99
BX276092.9	0,6116 > 0,99	-0,4490 > 0,99	3,5214 > 0,99
B			
Gen	Log2FoldChange 24h <i>adjustierter p-Wert</i>	Log2FoldChange 48h <i>adjustierter p-Wert</i>	Log2FoldChange 72h <i>adjustierter p-Wert</i>
ZBP1	2,0072 > 0,99	-1,6388 > 0,99	-3,5806 > 0,99
AC006058.2	-1,8098 > 0,99	-1,3604 > 0,99	-3,3235 > 0,99
RPSAP36	-1,8098 > 0,99	-0,5670 > 0,99	-3,2920 > 0,99
AL645939.4	-0,0931 > 0,99	0,4391 > 0,99	-3,1456 > 0,99
ARL4AP4	-0,8689 > 0,99	1,4289 > 0,99	-3,1377 > 0,99
AC026150.3	-0,4356 > 0,99	2,0936 > 0,99	-3,0786 > 0,99
AL356488.1	0,7867 > 0,99	3,1132 > 0,99	-3,0294 > 0,99
BOLA2B	-0,8324 > 0,99	0,6055 > 0,99	-2,9566 > 0,99
FDPSP2	-1,0693 > 0,99	1,9906 > 0,99	-2,9284 > 0,99
AP001442.1	-0,4677 > 0,99	-0,1438 > 0,99	-2,8437 > 0,99

Um die Unterschiede trotzdem weiter zu analysieren, wurden Gen-Set-Enrichment-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den mit SerpinB2-negativen SV80-Zellen ko-kultivierten PANC-1-Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine signifikante Anreicherung stärker exprimierter Gene in Gen-Sets aus den Bereichen Translation, Proliferation und Metabolismus.

Tab. 14: Gen-Sets mit relevanter Anreicherung stärker bzw. schwächer exprimierter Gene in PANC-1-Zellen aus Ko-Kultur mit SerpinB2-negativen Fibroblasten verglichen mit PANC-1-Zellen aus Ko-Kultur mit Kontrollfibroblasten; normalisierter Enrichment-Score (NES) aus RNA-Sequenzierungs-Daten nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur.

Gen-Set	NES (24h) FDR q-value	NES (48h) FDR q-value	NES (72h) FDR q-value
REACTOME_TRANSLATION	5,6771 < 0,01	6,3717 < 0,01	6,5341 < 0,01
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	5,6420 < 0,01	5,5824 < 0,01	5,6496 < 0,01
REACTOME_RRNA_PROCESSING	4,9001 < 0,01	6,2163 < 0,01	4,8644 < 0,01
REACTOME_DNA_REPAIR	-4,6842 < 0,01	3,7131 < 0,01	4,7015 < 0,01
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	4,8061 < 0,01	4,7386 < 0,01	4,6025 < 0,01
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	4,0013 < 0,01	3,9705 < 0,01	4,5721 < 0,01
REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_INITIATION	4,5669 < 0,01	5,5626 < 0,01	4,3618 < 0,01
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	3,9681 < 0,01	3,1504 < 0,01	4,2598 < 0,01
REACTOME_DNA_REPLICATION	-2,9913 < 0,01	3,2263 < 0,01	4,2214 < 0,01
REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_ELONGATION	4,8960 < 0,01	5,8537 < 0,01	4,1541 < 0,01
HALLMARK_E2F_TARGETS	-4,1973 < 0,01	3,9939 < 0,01	3,9810 < 0,01
REACTOME_MITOCHONDRIAL_TRANSLATION	3,8114 < 0,01	3,9931 < 0,01	3,7767 < 0,01

Für die Gen-Sets REACTOME_TRANSLATION (295 Gene),
 REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_INITIATION (120 Gene),
 REACTOME_EUKARYOTIC_TRANSLATION_ELONGATION (94 Gene), und

REACTOME_RRNA_PROCESSING (205 Gene) wurde zu allen drei Messzeitpunkten (24h, 48h und 72h Ko-Kultivierung) ein normalisierter Enrichment-Score (NES) >4 erreicht. Sie enthalten Gene, die für in der Translation involvierte Proteine codieren. Darunter sind viele Translationsfaktoren und ribosomale Proteine.

Für das Gen-Set HALLMARK_MYC_TARGETS_V1 (200 Gene) lag zu allen drei Messzeitpunkten ein NES >5,5 vor. Das Gen-Set HALLMARK_E2F_TARGETS (200 Gene) war ab dem zweiten Messzeitpunkt mit einem NES >3,9 angereichert. Diese beiden Gen-Sets enthalten mit der Zellproliferation assoziierte Gene, die Prozesse wie Transkription und Translation, DNA-Replikation und das Voranschreiten des Zellzyklus fördern.

Im Zusammenhang der DNA-Replikation fielen noch drei weitere Gen-Sets auf: Bei den Gen-Sets REACTOME_DNA_REPLICATION (178 Gene) und REACTOME_DNA_REPAIR (326 Gene) lag zum ersten Messzeitpunkt noch ein negativer NES vor, nach 48 und 72 Stunden zeigte sich aber eine signifikante Anreicherung stärker exprimierter Gene in diesen Gen-Sets (NES jew. >3). Auch für das Gen-Set REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA (120 Gene) lag zu allen Messzeitpunkten ein NES > 3 vor.

Im Gen-Set HALLMARK_MTORC1_SIGNALING (200 Gene), bei dem der NES zu allen Messzeitpunkten >3,9 betrug, sind Gene aufgelistet, die durch die Aktivierung des mTOR-Komplex-1 hochreguliert werden. Diese Gene sind an regulatorischen Prozessen im Rahmen des Zellwachstums beteiligt. Das Gen-Set HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION (200 Gene) ist der Kategorie „Metabolismus“ zugeordnet. Es beinhaltet Gene, die für Proteine codieren, die in die oxidative Phosphorylierung involviert sind. Bei diesem Gen-Set betrug der NES zu allen drei Messzeitpunkten >4,6. Weiterhin fand sich beim Gen-Set REACTOME_MITOCHONDRIAL_TRANSLATION (96 Gene) mit Genen, die vor allem für Proteine der mitochondrialen Ribosomen codieren, zu allen Messzeitpunkten ein NES >3,7.

Diese Ergebnisse zeigen die klare Tendenz auf, dass ein SERPINB2-Knockout in ko-kultivierten SV80-Zellen einen pro-proliferativen Effekt auf die PANC-1-Zellen hat.

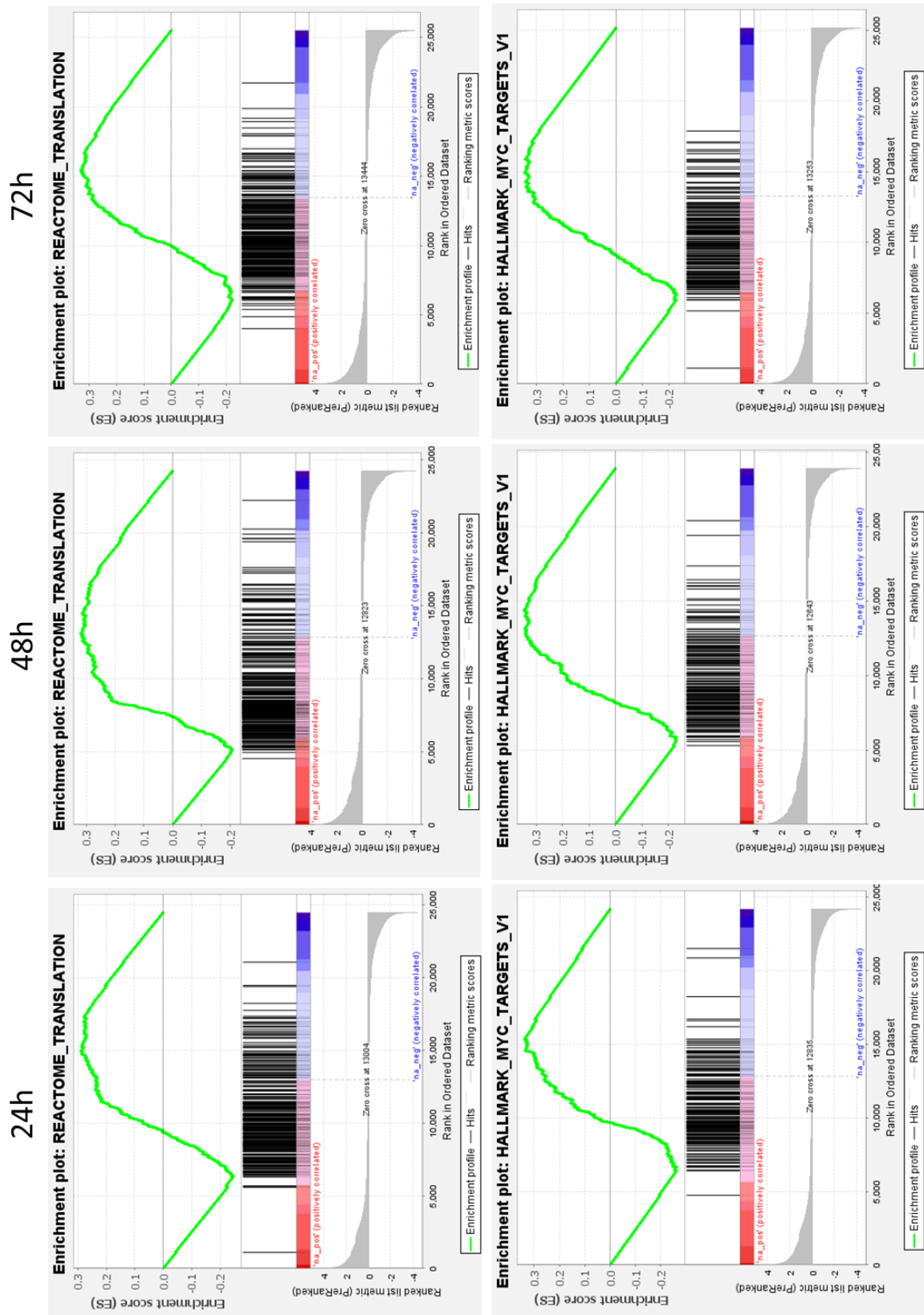


Abb. 11: Enrichment-Plots zu den Gen-Sets REACTOME_TRANSLATION und HALLMARK_MYC_TARGETS_V1 aus den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung ko-kultivierter PANC-1-Zellen mit transfizierten SV80-Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur.

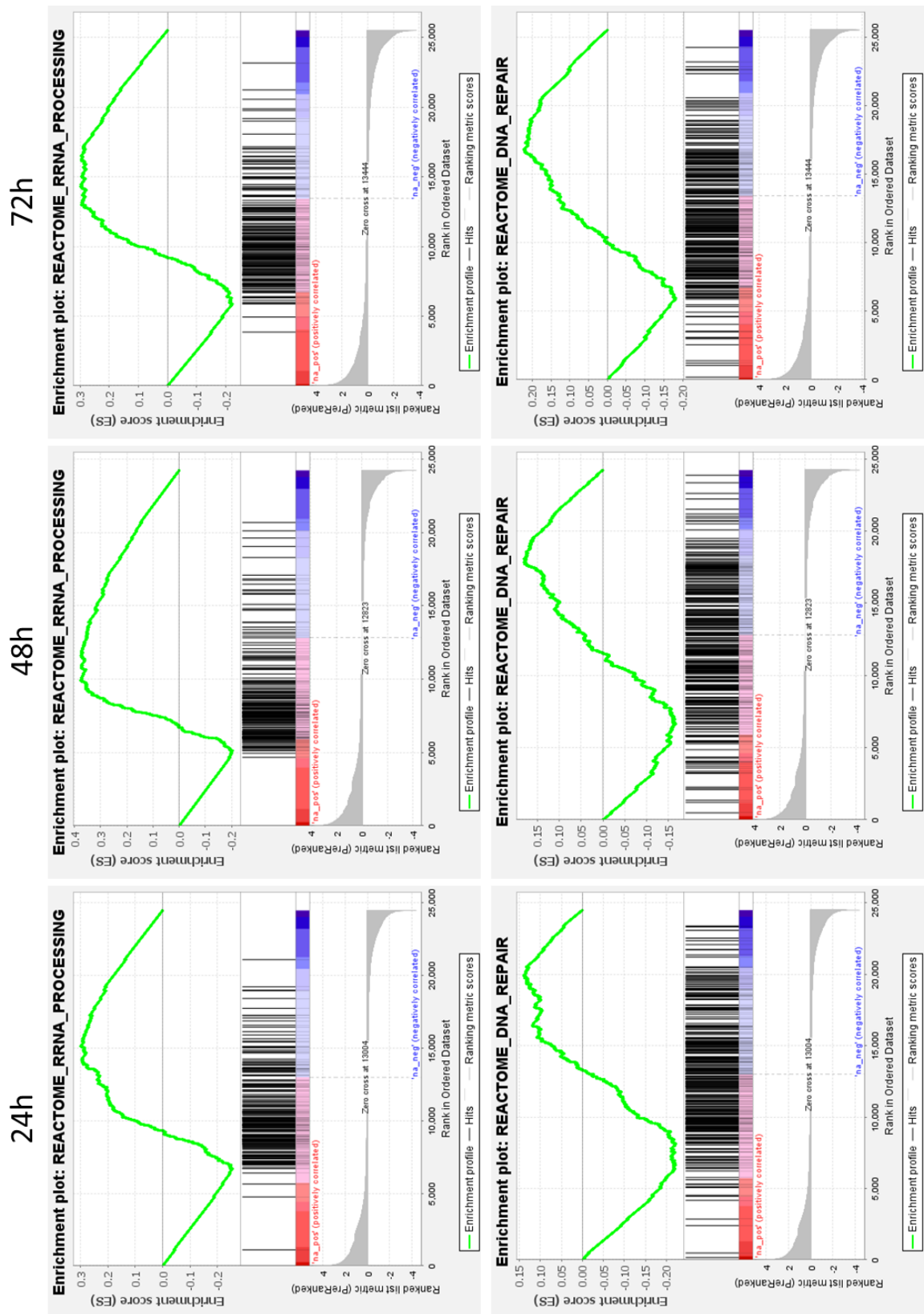


Abb. 12: Enrichment-Plots zu den Gen-Sets REACTOME_RRNA_PROCESSING und REACTOME_DNA_REPAIR aus den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung ko-kultivierter PANC-1-Zellen mit transfizierten SV80-Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur.

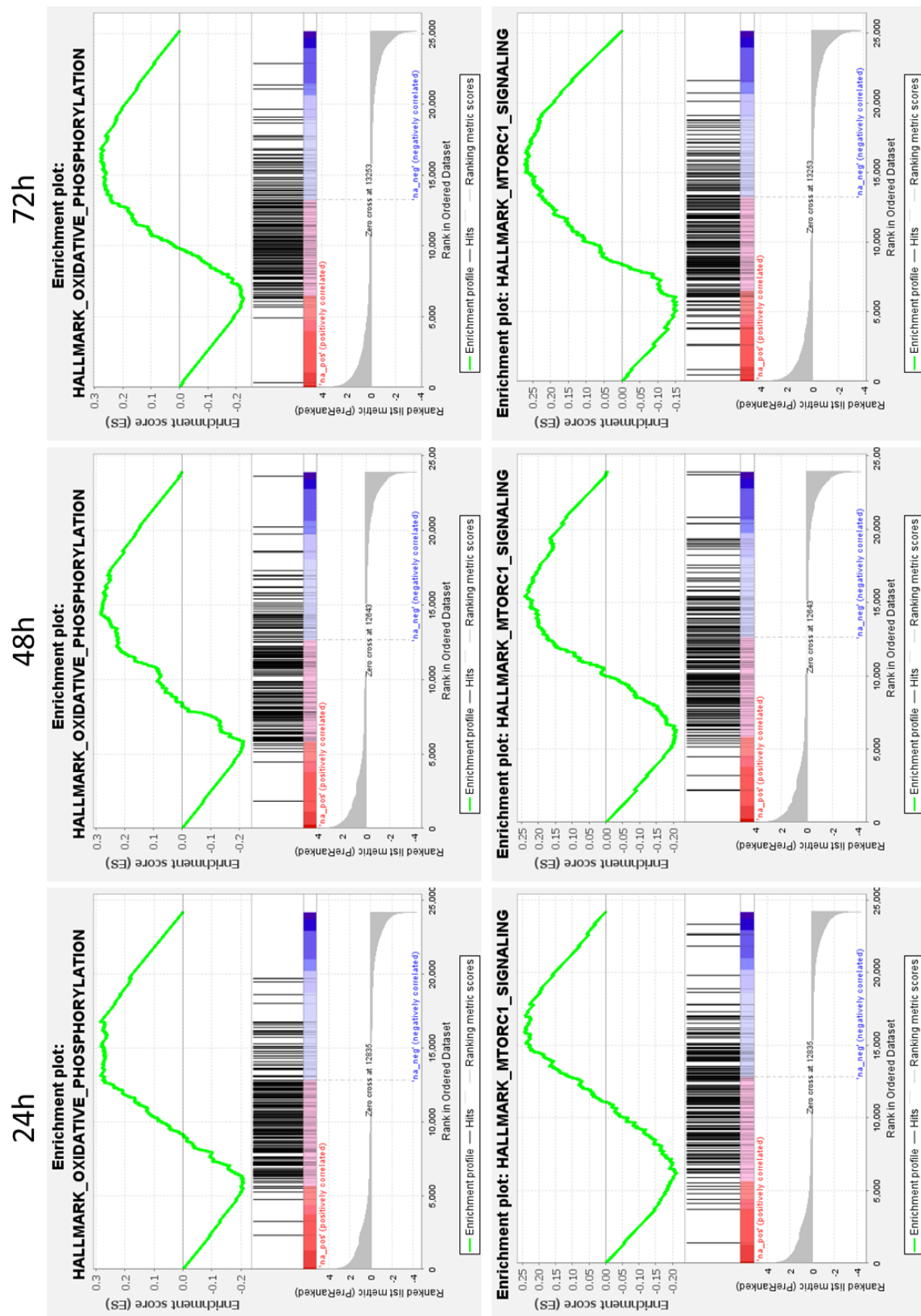


Abb. 13: Enrichment-Plots zu den Gen-Sets HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION und HALLMARK_MTORC1_SIGNALING aus den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung ko-kultivierter PANC-1-Zellen mit transfizierten SV80-Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Ko-Kultur.

5. Diskussion

In den vergangenen Jahren hat das Bewusstsein für die Relevanz der Erforschung tumortreibender Mutationen im PDAC immer mehr zugenommen. Dabei stehen neben Mutationen in den Karzinomzellen mittlerweile auch Mutationen in tumorassoziierten Fibroblasten des Pankreaskarzinoms im Fokus. PSCs spielen im PDAC als tumorassoziierte Fibroblasten eine wichtige Rolle beim Entstehen und Fortschreiten des Tumors (Bynigeri et al. 2017). Daher könnten Mutationen mit funktionellen Auswirkungen in den PSCs weitreichende Konsequenzen für die Tumorentwicklung haben.

Als eine mögliche relevante Mutation in PSCs wurde eine Loss-of-Function-Mutation im SERPINB2-Gen identifiziert (Böker et al. 2022).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass ein SERPINB2-Knockout in Fibroblasten funktionelle Auswirkungen auf die Proliferation und Migration dieser hat. Es konnte außerdem ein Einfluss des SERPINB2-Knockouts in Fibroblasten auf das Transkriptom ko-kultivierter Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden.

Wichtige Eigenschaften von Fibroblasten sind unter anderem deren Fähigkeit, im Rahmen der Wundheilung zu migrieren und zu proliferieren. Da sich viele Ähnlichkeiten in den Signalwegen bei der Wundheilung und im Tumorstroma finden, wurden in dieser Arbeit unter anderem die Aspekte Migration und Proliferation der transfizierten Fibroblasten untersucht (Foster et al. 2018).

Dabei stellte sich heraus, dass ein SERPINB2-Knockout in SV80-Zellen zu einer verminderten Proliferation dieser führt. Yu et al. untersuchten die Auswirkungen der SerpinB2-Expression auf die Proliferation von Monozyten und beobachteten einen gegenteiligen Effekt: die Proliferation der Monozyten wurde durch eine Überexpression von SerpinB2 reduziert (Yu et al. 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Zhang et al., als sie an CNE2-Zellen (Nasopharynxkarzinomzellen) forschten. Auch in diesen führte die Überexpression von SerpinB2 zur Inhibition der Proliferation. Darüber hinaus wurde durch die SerpinB2-Überexpression auch die Migration der CNE2-Zellen gehemmt (Zhang et al. 2019). Den Zusammenhang zwischen SerpinB2-Expression und Migration

untersuchten auch Schroder et al. an Mausmakrophagen und zeigten, dass SerpinB2 zur Inhibition der Migration von Makrophagen beiträgt (Schroder et al. 2019). Im Kontrast dazu steht die Beobachtung von Harris et al., dass SerpinB2-negative Mausfibroblasten weniger mobil sind als Wildtypfibroblasten (Harris et al. 2017). Auch in humanen Fibroblasten hat ein SERPINB2-Knockout eine verminderte Migration dieser zur Folge, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Im Wound-Healing-Test benötigten die SV80-Zellen mit SERPINB2-Knockout mehr Zeit, um durch Migration eine Wunde im Zellrasen zu schließen.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse in der Beziehung zwischen SerpinB2-Expression und Proliferation bzw. Migration legen die Vermutung nahe, dass die SerpinB2-Wirkung diesbezüglich sehr zellspezifisch ist. Weiterhin sind sicherlich die Umgebungseinflüsse ein wichtiger Faktor dafür, wie sich ein SERPINB2-Knockout funktionell auswirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation und Migration der transfizierten SV80-Zellen isoliert untersucht, während PSCs in ihrer normalen Umgebung vielen äußeren Einflüssen ausgesetzt sind.

Im PDAC ist dabei gerade die intensive Interaktion zwischen PSCs und Karzinomzellen ein sehr wichtiger Faktor. Ein Aspekt dieser Interaktion ist die Aktivierung der PSCs zu tumorassoziierten Fibroblasten infolge der Sekretion von TGF- β durch die Karzinomzellen (Sun et al. 2018). Als eine von vielen Folgen sezernieren die aktivierten PSCs Kollagen I, III und IV, Fibronectin und Laminin und treiben dadurch die desmoplastische Reaktion im PDAC voran (Hessmann et al. 2020).

Harris et al. konnten zeigen, dass SerpinB2 für den Kollagenumbau der extrazellulären Matrix *in vitro* notwendig ist. Von SerpinB2-negativen Mausfibroblasten geformte Kollagennetzwerke zeigten sich anisotrop mit ungeordnet verteilten dichten Kollagenbündeln. Außerdem konnten SerpinB2-negative Fibroblasten Kollagenmatrices nicht so stark kontrahieren wie Wildtypfibroblasten (Harris et al. 2017). Das letztere Ergebnis konnte allerdings in dieser Arbeit nicht repliziert werden. In einem Kollagengel-Kontraktions-Test wurden keine signifikanten Unterschiede in der Kontraktionsfähigkeit von Fibroblasten mit SERPINB2-Knockout gegenüber den Kontrollzellen festgestellt. Dazu muss gesagt werden, dass einige Unterschiede in der Methodik bestanden. Anstelle embryonaler Fibroblasten aus SerpinB2-negativen Mäusen wurden SV80-Zellen verwendet, in denen mittels CRISPR/Cas9 ein SERPINB2-Knockout verursacht worden

war. Außerdem wurde mit verschiedenen Kollagenen sowie mit unterschiedlichen Zellzahlen pro Gel gearbeitet.

Harris et al. führten auch *in vivo* Versuche am Mausmodell durch. Die Koinjektion von Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten ergab dabei größere Tumoren mit höherer Tumorzelldichte und einem geringerem Kollagengehalt an den Tumorrändern, wenn die Fibroblasten SerpinB2-negativ waren. Dies führte zu einer stärkeren Tumorinvasion in das umliegende Muskel- und Fettgewebe (Harris et al. 2017).

Schon in früheren *in vivo* Versuchen wurde am Beispiel des Melanoms gezeigt, dass die Überexpression von SerpinB2 zur Bildung einer fibrösen Kapsel um den Tumor führt, der in Folge weniger metastasierte (Mueller et al. 1995). Auch Schroder et al. konnten eine verminderte Metastasierung bei SerpinB2-exprimierenden Melanomzellen nachweisen (Schroder et al. 2014). Außerdem reduzierte die intratumorale Injektion von SerpinB2 die Tumorgöße signifikant (Kruithof et al. 1995). Weiterhin beobachteten Westrick et al. in SerpinB2-/- Mäusen mehr spontan entstehende und schneller wachsende Tumore als in Wildtypmäusen (Westrick et al. 2020).

Diese Ergebnisse scheinen eine klar protektive Rolle von hohem SerpinB2-Vorkommen in Tumoren aufzuzeigen. Das trifft auch für mehrere Tumorentitäten zu (Smith et al. 2007; Ramnefjell et al. 2017). Allerdings gibt es auch Beispiele, wie das Endometriumkarzinom, in denen SerpinB2 als negativer prognostischer Faktor gilt (Nordengren et al. 2002). Croucher et al. stellten die These auf, dass SerpinB2 nur in solchen Tumoren ein positiver Indikator ist, die auch uPA und PAI-1 enthalten (Croucher et al. 2008). Dagegen wurde in einer Studie zum Plattenepithelkarzinom des Ösophagus herausgestellt, dass SerpinB2 nur einen positiven Einfluss auf die Tumorentwicklung nimmt, wenn die Karzinomzellen uPA-negativ sind (Shiomi et al. 2000). Wieder zeigt sich, dass die Rolle des SerpinB2 sehr situationsabhängig ist.

Es ist bekannt, dass aktivierte PSCs im PDAC nicht nur über den Mediator EZM, sondern auch über die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine Einfluss auf das Tumorgeschehen nehmen. Einige Signalwege sind zum jetzigen Zeitpunkt schon bekannt und verstanden, wie etwa der IL-6/JAK/STAT-Signalweg oder die Rolle des CXCL12 (Fu et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die SerpinB2-Expression in Fibroblasten Einfluss auf ko-kultivierte Pankreaskarzinomzellen nimmt. In indirekter Ko-Kultur kultivierte PANC-1-Zellen mit SerpinB2-negativen SV80-Zellen zeigten zwar keine signifikant differentiell exprimierten Gene gegenüber den Kontrollen, in GSEA konnten aber relevante Veränderungen der Expression von Genen, die die Proliferation betreffen, nachgewiesen werden.

In acht REACTOME-Gen-Sets zur DNA-Replikation und -Reparatur sowie zur (mitochondrialen) Translation zeigte sich eine signifikante Anreicherung hochregulierter Gene, außerdem in vier HALLMARK-Gen-Sets mit Genen zur Transkription und Translation, DNA-Replikation und oxidativen Phosphorylierung. Diese Ergebnisse deuten auf eine vermehrte proliferative Aktivität der mit SerpinB2-negativen Fibroblasten ko-kultivierten PANC-1-Zellen hin. Zellproliferation ist ein Zusammenspiel aus Zellwachstum und Zellteilung, bei dem die Produktion von Proteinen durch Transkription und Translation zu Zellwachstum führt, während für die Zellteilung neben der Produktion spezieller Proteine unter anderem die Replikation der DNA vonnöten ist (Prescott 1955; Mazia 1960). Dabei induziert replikativer Stress DNA-Reparaturmechanismen (Minocherhomji et al. 2015). Die oxidative Phosphorylierung ist ein metabolischer Prozess, durch den Zellen ATP herstellen können. Dafür werden auch Proteine aus der mitochondrialen Translation benötigt (Brooke et al. 2012). Während viele andere Tumoren diesen Prozess kaum nutzen und stattdessen „aerobe Glykolyse“ betreiben, ist die oxidative Phosphorylierung beim PDAC hochreguliert (Ashton et al. 2018). Yu et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass die Reduktion der oxidativen Phosphorylierung in Pankreaskarzinomzellen zu vermindertem Tumorwachstum und verlängertem Überleben führt (Yu et al. 2019).

Die Ergebnisse der GSEA sprechen also dafür, dass das SerpinB2 der Fibroblasten einen regulierenden Effekt auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen hat, der bei einer SERPINB2-Mutation in den Fibroblasten wegfällt, und würden eine weitere Erklärung dafür bieten, warum eine hohe SerpinB2-Expression im PDAC mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht (Smith et al. 2007). Wie genau die Wirkung des SerpinB2 aus den Fibroblasten auf die Pankreaskarzinomzellen übermittelt wird, bleibt dabei noch offen. Möglich wäre, dass i) von Fibroblasten sezerniertes, extrazelluläres SerpinB2 Einfluss auf die Karzinomzellen

nimmt und/oder dass ii) intrazelluläres SerpinB2 in den Fibroblasten Signalwege beeinflusst, die Auswirkungen auf die Interaktion mit den Karzinomzellen haben. Es wurde bereits nachgewiesen, dass intrazelluläres SerpinB2 auf verschiedene zelluläre Prozesse Einfluss nimmt. Sen et al. zeigten, dass intrazelluläres SerpinB2 in die Chemokinsynthese involviert ist (Sen et al. 2020). Außerdem induziert es die IL-6- und IL-8-Expression und reguliert die Zytokinsekretion in myeloischen antigenpräsentierenden Zellen nach Interaktion mit Typ-1-T-Helferzellen (Schroder et al. 2010; Hsieh et al. 2017). SerpinB2 scheint also durchaus eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen verschiedenen Zellen zu spielen, die genauen Mechanismen, wie SerpinB2 diese Prozesse beeinflusst, sind jedoch bisher nicht umfassend geklärt.

Dem SerpinB2 wird eine regulierende Rolle in der Immunantwort zugesprochen (Kruithof et al. 1995; Medcalf 2011). Seine Expression wird durch inflammatorische Signale wie IL-1 oder TNF induziert (Kruithof et al. 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im Pankreasgewebe von PDAC-Patienten sogar mehr SerpinB2 nachweisbar ist als bei Patienten mit chronischer Pankreatitis. Interessanterweise war die SerpinB2-Expression im Gesamtgewebe aber in beiden Fällen verhältnismäßig sehr viel niedriger als in den aus PDAC- bzw. Pankreatitis-Patienten stammenden PSCs. Diese scheinen also eine wesentliche Quelle des SerpinB2 im Pankreasgewebe zu sein. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass die PSCs beim PDAC weniger zum Gesamt-SerpinB2 beitragen als bei der chronischen Pankreatitis. Es stellt sich die Frage, ob dies darauf zurückzuführen ist, dass PSCs im PDAC einen prozentual kleineren Anteil der Gesamtzellen ausmachen als bei der chronischen Pankreatitis, oder ob sie im PDAC im Vergleich zur chronischen Pankreatitis tatsächlich weniger SerpinB2 sezernieren.

Zumindest im Vergleich vom anfänglichen zum fortgeschrittenen Stadium eines PDAC stellten Chen et al. einen prozentualen Rückgang der PSCs fest (Chen et al. 2021). Es wurde aber kein Vergleich zwischen chronischer Pankreatitis und PDAC angestellt. Hinsichtlich der Frage, ob PSCs im PDAC weniger SerpinB2 sezernieren, wäre es interessant zu untersuchen, ob Pankreaskarzinomzellen in der Lage sind, die SerpinB2-Expression von PSCs zu inhibieren.

Die hier gewonnene Erkenntnis, dass ein SerpinB2-Knockout in Fibroblasten die Proliferation von ko-kultivierten Pankreaskarzinomzellen fördert, bestätigt die Notwendigkeit, PSCs als tumorassoziierte Fibroblasten im PDAC weiter auf Mutationen und deren funktionelle Auswirkungen zu untersuchen. So können Grundsteine für dringend benötigte neue Therapieansätze für Patienten mit PDAC aufgezeigt werden. Schon 2014 bewiesen Sherman et al., dass eine bessere Effektivität der Chemotherapie und verbessertes Überleben bei Patienten mit PDAC erreicht werden können, wenn die Interaktion zwischen PSCs und Pankreaskarzinomzellen minimiert wird (Sherman et al. 2014). Dieser Ansatzpunkt erscheint also sehr vielversprechend, um Patienten mit Pankreaskarzinom in Zukunft bessere Therapieoptionen bieten zu können.

Limitationen

Die Auswirkungen des SERPINB2-Knockouts wurden an SV80-Zellen, einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie, untersucht. Dabei sollten die SV80-Zellen als Modell für aktivierte PSCs dienen, die im Pankreaskarzinom als tumorassoziierte Fibroblasten wirksam sind und in diesem Zustand als myofibroblastenähnlich beschrieben werden (Allam et al. 2017). Für erste orientierende Versuche hat sich dieses Modell bewährt, für weitere vertiefende Untersuchungen wäre es sicherlich sinnvoll, an humanen PSCs zu forschen.

Ein weiterer zu diskutierender Aspekt ist die Verwendung eines Knockout-Plasmids, während die Ergebnisse, auf denen diese Arbeit aufbaut, lediglich eine Loss-of-Function-Mutation, genauer eine Stop-Gain-Mutation, in PSCs aufzeigten (Böker et al. 2022). Bei einer Stop-Gain-Mutation entsteht durch Basenaustausch fälschlicherweise ein Stopcodon, was zum frühzeitigen Abbruch der mRNA-Synthese führt. Abhängig von der Position der Stop-Gain-Mutation im Gen kann dies dazu führen, dass ein kleineres Protein mit fehlender Funktion entsteht, falls die Stabilität der mRNA überhaupt die Proteinproduktion erlaubt (Losson et al. 1979). Ein Knockout bildet also nicht komplett die Realität einer Stop-Gain-Mutation ab.

6. Literaturverzeichnis

- Allam A, Thomsen AR, Gothwal M, Saha D, Maurer J, Brunner TB. Pancreatic stellate cells in pancreatic cancer: In focus. *Pancreatology*. 2017;17(4):514–22. doi:10.1016/j.pan.2017.05.390.
- Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 1998;43(1):128–33. doi:10.1136/gut.43.1.128.
- Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3070.
- Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47–52. doi:10.1038/nature16965.
- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras M-C, Muthuswamy LB, Johns AL, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. 2012;491(7424):399–405. doi:10.1038/nature11547.
- Böker V, Häußler J, Baumann J, Sunami Y, Trojanowicz B, Harwardt B, et al. Analysis of genomic alterations in cancer associated human pancreatic stellate cells. *Sci Rep*. 2022;12(1):13532. doi:10.1038/s41598-022-17748-1.
- Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, et al. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol*. 2017;23(3):382–405. doi:10.3748/wjg.v23.i3.382.
- Chen K, Wang Q, Li M, Guo H, Liu W, Wang F, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic change in tumor microenvironment during pancreatic ductal adenocarcinoma malignant progression. *EBioMedicine*. 2021;66:103315. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103315.
- Christian BE, Spremulli LL. Mechanisms of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(9-10):1035-54. doi:10.1016/j.bbagrm.2011.11.009.
- Croucher DR, Saunders Darren, Lobov S, Ranson M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:535–45. doi:10.1038/nrc2400.
- Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rømer J. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):676–81. doi:10.1160/TH05-01-0054.
- Darnell GA, Antalis TM, Johnstone RW, Stringer BW, Ogbourne SM, Harrich D, Suhrbier A. Inhibition of retinoblastoma protein degradation by interaction with the serpin

- plasminogen activator inhibitor 2 via a novel consensus motif. *Mol Cell Biol.* 2003;23(18):6520–32. doi:10.1128/MCB.23.18.6520-6532.2003.
- Dickinson JL, Bates EJ, Ferrante A, Antalis TM. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27894–904. doi:10.1074/jbc.270.46.27894.
- Drifka CR, Tod J, Loeffler AG, Liu Y, Thomas GJ, Eliceiri KW, Kao WJ. Periductal stromal collagen topology of pancreatic ductal adenocarcinoma differs from that of normal and chronic pancreatitis. *Mod Pathol.* 2015;28(11):1470–80. doi:10.1038/modpathol.2015.97.
- DuFort CC, DelGiorno KE, Carlson MA, Osgood RJ, Zhao C, Huang Z, et al. Interstitial Pressure in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Is Dominated by a Gel-Fluid Phase. *Biophys J.* 2016;110(9):2106–19. doi:10.1016/j.bpj.2016.03.040.
- Fish RJ, Kruithof EKO. Evidence for serpinB2-independent protection from TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2006;312(3):350–61. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.003.
- Foster DS, Jones RE, Ransom RC, Longaker MT, Norton JA. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight* 2018. doi:10.1172/jci.insight.99911.
- Fu Y, Liu S, Zeng S, Shen H. The critical roles of activated stellate cells-mediated paracrine signaling, metabolism and onco-immunology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2018;17(1):62. doi:10.1186/s12943-018-0815-z.
- Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Nakata K, Yu J, Kayashima T, et al. Alpha-Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas.* 2010;39(8):1254–62. doi:10.1097/MPA.0b013e3181dbf647.
- Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:145. doi:10.3389/fonc.2018.00145.
- Gress TM, Müller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Adler G. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 1995;62:407-13. doi:10.1002/ijc.2910620409.
- Gupta N, Yelamanchi R. Pancreatic adenocarcinoma: A review of recent paradigms and advances in epidemiology, clinical diagnosis and management. *World J Gastroenterol.* 2021;27(23):3158–81. doi:10.3748/wjg.v27.i23.3158.
- Harris NLE, Vennin C, Conway JRW, Vine KL, Pinese M, Cowley MJ, et al. SerpinB2 regulates stromal remodelling and local invasion in pancreatic cancer. *Oncogene.* 2017;36(30):4288–98. doi:10.1038/onc.2017.63.

- Helms EJ, Berry MW, Chaw RC, DuFort CC, Sun D, Onate MK, et al. Mesenchymal Lineage Heterogeneity Underlies Nonredundant Functions of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* 2022;12(2):484-501. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0601.
- Hessmann E, Buchholz SM, Demir IE, Singh SK, Gress TM, Ellenrieder V, et al. Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev.* 2020;100(4):1707–51. doi:10.1152/physrev.00042.2019.
- Hsieh H-H, Chen Y-C, Jhan J-R, Lin J-J. The serine protease inhibitor serpinB2 binds and stabilizes p21 in senescent cells. *J Cell Sci.* 2017;130(19):3272–81. doi:10.1242/jcs.204974.
- Huang Z, Li H, Huang Q, Chen D, Han J, Wang L, et al. SERPINB2 down-regulation contributes to chemoresistance in head and neck cancer. *Mol Carcinog.* 2014;53(10):777–86. doi:10.1002/mc.22033.
- Kaur A, Ecker BL, Douglass SM, Kugel CH, Webster MR, Almeida FV, et al. Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov.* 2019;9(1):64–81. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0193.
- Khalaf N, El-Serag HB, Abrams HR, Thrift AP. Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(5):876–84. doi:10.1016/j.cgh.2020.02.054.
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22.
- Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006;66(9):4662–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2804.
- Kruithof EKO, Baker MS, Bunn CL. Biological and Clinical Aspects of Plasminogen Activator Type 2. *Blood.* 1995;86(11):4007-27.
- Kugaevskaya EV, Gureeva TA, Timoshenko OS, Solovyeva NI. The Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator System In Tumor Progression. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2019;13(2):97–112. doi:10.1134/S1990750819020069.
- Lee JA, Yerbury JJ, Farrawell N, Shearer RF, Constantinescu P, Hatters DM, et al. SerpinB2 (PAI-2) Modulates Proteostasis via Binding Misfolded Proteins and Promotion of Cytoprotective Inclusion Formation. *PLoS One.* 2015;10(6):2-20. doi:10.1371/journal.pone.0130136.
- Losson R, Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(10):5134–7. doi:10.1073/pnas.76.10.5134.

- Macaluso M, Montanari M, Marshall CM, Gambone AJ, Tosi GM, Giordano A, Massaro-Giordano M. Cytoplasmic and nuclear interaction between Rb family proteins and PAI-2: a physiological crosstalk in human corneal and conjunctival epithelial cells. *Cell Death Differ.* 2006;13(9):1515–22. doi:10.1038/sj.cdd.4401835.
- Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol.* 2018;8:24. doi:10.3389/fonc.2018.00024.
- Mazia D. The Analysis of Cell Reproduction. *Ann N Y Acad. Sci.* 1960;90:455–69. doi:10.1111/j.1749-6632.1960.tb23264.x.
- Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: still an enigmatic serpin but a model for gene regulation. *Methods Enzymol.* 2011;499:105–34. doi:10.1016/B978-0-12-386471-0.00006-7.
- Minocherhomji S, Ying S, Bjerregaard VA, Bursomanno S, Aleliunaite A, Wu W, et al. Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature.* 2015;528(7581):286–90. doi:10.1038/nature16139.
- Mueller BM, Yu YB, Laug WE. Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995;92:205–9. doi:10.1073/pnas.92.1.205.
- Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost.* 2005;93(4):661–75. doi:10.1160/TH04-12-0814.
- National Cancer Institute [online]. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. 17.04.2024 [Update vom: 05.11.2024; abgerufen am 23.01.2025]. Verfügbar unter: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/>.
- Nordengren J, Fredstorp Lidebring M, Bendahl P-O, Brünner N, Fernö M, Högberg T, et al. High tumor tissue concentration of plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is an independent marker for shorter progression-free survival in patients with early stage endometrial cancer. *Int J Cancer.* 2002;97(3):379–85. doi:10.1002/ijc.1611.
- Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, et al. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun.* 2017;8:16031. doi:10.1038/ncomms16031.
- Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *The Lancet Oncology.* 2020;21(4):508–18. doi:10.1016/S1470-2045(20)30074-7.
- Prescott DM. Relations Between Cell Growth and Cell Division. *Exp Cell Res.* 1955;9:328–37. doi:10.1515/9781400876167-005.

- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74(11):2913–21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.
- Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open.* 2021;4(4):e214708. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.4708.
- Ramnefjell M, Aamelfot C, Helgeland L, Akslen LA. Low expression of SerpinB2 is associated with reduced survival in lung adenocarcinomas. *Oncotarget.* 2017;8(53):90706–18. doi:10.18632/oncotarget.21456.
- Sahai E, Astsaturon I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174–86. doi:10.1038/s41568-019-0238-1.
- Schroder WA, Hirata TD, Le TT, Gardner J, Boyle GM, Ellis J, et al. SerpinB2 inhibits migration and promotes a resolution phase signature in large peritoneal macrophages. *Sci Rep.* 2019;9(1):12421. doi:10.1038/s41598-019-48741-w.
- Schroder WA, Le TTT, Major L, Street S, Gardner J, Lambley E, et al. A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity. *J Immunol.* 2010;184(5):2663–70. doi:10.4049/jimmunol.0902187.
- Schroder WA, Major LD, Le TT, Gardner J, Sweet MJ, Janciauskiene S, Suhrbier A. Tumor cell-expressed SerpinB2 is present on microparticles and inhibits metastasis. *Cancer Med.* 2014;3(3):500–13. doi:10.1002/cam4.229.
- Sen P, Helmke A, Liao CM, Sörensen-Zender I, Rong S, Bräsen J-H, et al. SerpinB2 Regulates Immune Response in Kidney Injury and Aging. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(5):983–95. doi:10.1681/ASN.2019101085.
- Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriack H, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell.* 2014;159(1):80–93. doi:10.1016/j.cell.2014.08.007.
- Shiomi H, Eguchi Y, Tani T, Kodama M, Hattori T. Cellular distribution and clinical value of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2000;156(3):567-75. doi:10.1016/S0002-9440(10)64761-X.
- Smith R, Xue A, Gill A, Scarlett C, Saxby A, Clarkson A, Hugh T. High expression of plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) is a predictor of improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg.* 2007;31(3):493-502. doi:10.1007/s00268-006-0289-9.

- Springfield C, Krug S, Neoptolemos J, Jäger D. Aktuelle systemische Therapie beim Pankreaskarzinom. *Onkologie*. 2023;29(9):769-77. doi:10.1007/s00761-023-01382-1.
- Stopa KB, Kusiak AA, Szopa MD, Ferdek PE, Jakubowska MA. Pancreatic Cancer and Its Microenvironment-Recent Advances and Current Controversies. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi:10.3390/ijms21093218.
- Sun Q, Zhang B, Hu Q, Qin Y, Xu W, Liu W, et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*. 2018;8(18):5072–87. doi:10.7150/thno.26546.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49. doi:10.3322/caac.21660.
- Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495–501. doi:10.1038/nature14169.
- Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-Storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1982;58(4-6):837–58. doi:10.2535/ofaj1936.58.4-6837.
- Westrick RJ, Røjkjaer LP, Yang AY, Roh MH, Siebert AE, Ginsburg D. Deficiency of plasminogen activator inhibitor-2 results in accelerated tumor growth. *J Thromb Haemost*. 2020;18(11):2968–75. doi:10.1111/jth.15054.
- Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, et al. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177(5):2585–96. doi:10.2353/ajpath.2010.090899.
- Yu H, Maurer F, Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. *Blood*. 2002;99(8):2810–8. doi:10.1182/blood.v99.8.2810.
- Yu M, Nguyen ND, Huang Y, Lin D, Fujimoto TN, Molkentine JM, et al. Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer. *JCI Insight*. 2019;4(16). doi:10.1172/jci.insight.126915.
- Zhang X-M, Wang T, Hu P, Li B, Liu H, Cheng Y-F. SERPINB2 overexpression inhibited cell proliferation, invasion and migration, led to G2/M arrest, and increased radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Radiat Res*. 2019;60(3):318–27. doi:10.1093/jrr/rrz003.

7. Thesen

1. In humanen SV80-Fibroblasten ließ sich erfolgreich mittels CRISPR/Cas9 ein Knockout des SERPINB2-Gens herbeiführen.
2. Das SERPINB2-Knockout in SV80-Fibroblasten hat einen hemmenden Einfluss auf ihre Proliferation und Migration.
3. Das SERPINB2-Knockout in SV80-Fibroblasten hat keinen Einfluss auf ihre Fähigkeit, ein Kollagengel zu kontrahieren.
4. Pankreaskarzinomzellen (PANC-1) zeigen eine verstärkte Expression von proliferationsrelevanten Genen nach indirekter Ko-Kultur mit Fibroblasten, wenn diese ein SERPINB2-Knockout aufweisen.
5. Gegenüber Pankreasgewebeproben weisen Proben aus PSCs eine stärkere Expression von SerpinB2 auf. In PSCs ist die Expression von SerpinB2 bei Patienten mit chronischer Pankreatitis stärker, während in Gewebeproben die SerpinB2-Expression bei Patienten mit PDAC stärker ist.
6. Eine SERPINB2-Mutation in tumorassoziierten Fibroblasten im PDAC könnte Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf des Karzinoms haben. Die Relevanz dieser Mutation muss in zukünftigen Studien weiter evaluiert werden.

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Halle (Saale), den 26.02.2025

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei den vielen Personen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit begleitet haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Kleeff für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsumfelds und die Unterstützung durch stets konstruktives Feedback.

Herrn PD Dr. Bogusz Trojanowicz, der für meine Fragen immer ein offenes Ohr hatte, möchte ich für die gute Betreuung im Labor danken.

Frau Bernadette Harwardt und Frau Kathrin Hammje danke ich ganz herzlich, die mir die Einarbeitung in die Laborarbeit sehr erleichtert und mir bei allen Herausforderungen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Weiterhin gilt mein Dank auch Herrn Dr. Markus Glaß für die Unterstützung bei der Auswertung der RNA-Seq-Daten.

Ich möchte dem gesamten Laborteam der VGEC, inklusive aller Doktorandinnen und Doktoranden, die ich kennenlernen durfte, für das angenehme Miteinander und die rücksichtsvolle Arbeitsweise danken. Ich habe viel von euch allen lernen dürfen.

Mein großer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mich mit Interesse durch diese Arbeit begleitet und mir dadurch wertvollen Rückhalt gegeben haben. Ich danke meinen Eltern, die mich schon immer ermutigt haben, Neues zu wagen. Danke, dass ihr immer hinter mir steht!

Ganz besonders danke ich meinem Ehemann Simon, ohne den ich dieses Vorhaben gar nicht erst begonnen hätte. Danke, dass du die ganze Zeit über an mich geglaubt, mich unterstützt und mir immer wieder in all der Arbeit geholfen hast, den Blick für das Wesentliche nicht zu verlieren. Es ist wunderschön, mit dir durchs Leben zu gehen!