

**Die Bedeutung von Integrin  $\alpha 3$  und Integrin  $\alpha V$   
für die Metastasierung  
des humanen Pankreaskarzinoms *in vivo***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht beim Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Alina Schiecke**

aus Hannover

Hamburg, September 2023

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Wicklein durchgeführt und angefertigt.

Für die Einleitung sowie für die Diskussion wurden aus beiden Manuskripten einige Textpassagen übernommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Tobias Lange

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Datum der Disputation: 26.01.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das duktale Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2	Metastasierung.....	2
1.3	Intraperitoneale Metastasierung.....	4
1.4	Zelladhäsionsmoleküle.....	6
1.4.1	Cadherine.....	6
1.4.2	Selektine.....	7
1.4.3	Integrine.....	7
1.4.3.1	Integrin $\alpha 3$ .....	9
1.4.3.2	Integrin $\alpha V$ .....	10
1.4.4	Immunoglobulin-Superfamilie.....	11
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit und klinische Relevanz.....	12
<b>2</b>	<b>Manuskripte</b>	<b>14</b>
2.1	<b>Manuskript</b> „ <i>Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer</i> “.....	14
2.2	Darstellung des Eigenanteils am Manuskript „ <i>Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer</i> “.....	48
2.3	<b>Manuskript</b> „ <i>Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression</i> “.....	50
2.3.1	Additional files.....	70
2.4	Darstellung des Eigenanteils am Manuskript „ <i>Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression</i> “.....	74
2.5	Zusätzlich durchgeführte Versuche.....	75
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
3.1	ITGA3 sowie ITGAV begünstigen die Progression der Peritonealkarzinose und führen zu einem verringerten Überleben.....	78
3.2	ITGA3- sowie ITGAV-Depletion bewirken eine Integrin-Gegenregulation und Veränderung des Transkriptoms.....	84
3.3	Neue therapeutische Ansätze und die Problematik einer klinischen Anwendung.....	90
<b>4</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>116</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Tumorentitäten, wobei das duktales Adenokarzinom (PDAC) der häufigste Typ ist. Es zählt zu den tödlichsten Malignitäten und geht mit einer äußerst schlechten Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 7-9 % einher (Ferlay et al., 2019; Siegel et al., 2021). Die Zahl der Patient:innen, die am Pankreaskarzinom erkranken, ist in den letzten Jahren dramatisch gestiegen. Aktuell wird vorausgesagt, dass es in zehn bis zwanzig Jahren die zweit- bis dritthäufigste krebserkrankungsbedingte Todesursache allein in den USA sein wird (Ferlay et al., 2019; Mizrahi et al., 2020; Tonini & Zanni, 2021). Die Wahrscheinlichkeit, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter. So liegt das durchschnittliche Alter der erkrankten Männer zwischen 65 und 69 Jahren und das der Frauen zwischen 75 und 79 Jahren (Collaborators, 2019). Weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind Nikotin- und Alkoholabusus (Bosetti et al., 2012; Lucenteforte et al., 2012), starkes Übergewicht (Preziosi et al., 2014), eine chronische Pankreatitis (Duell et al., 2012; Kirkegård et al., 2018), Diabetes mellitus (Everhart & Wright, 1995; Huxley et al., 2005) oder auch eine familiäre genetische Vorbelastung (Klein, 2021; Saba & Goggins, 2022). Aufgrund der durch die gute medizinische Versorgung erhöhten Lebenserwartung, aber auch durch den Lebensstil mit den damit einhergehenden oben genannten Risikofaktoren, sind Menschen aus Industrieländern bis zu viermal stärker gefährdet, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, als der Rest der Weltbevölkerung (Collaborators, 2019; Ferlay et al., 2019; Klein, 2021). Gründe für diese Aggressivität und die sehr schlechte Überlebensprognose sind vor allem die späte Diagnosestellung und die extrem begrenzten therapeutischen Optionen (Ferrone et al., 2006). Der Beginn der Erkrankung mit einem Pankreaskarzinom verläuft meist symptomlos (Owens et al., 2019) oder es treten erst in einem fortgeschrittenen Stadium sehr unspezifische Symptome (Halbrook et al., 2023) wie beispielsweise Ober- und Mittelbauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Müdigkeit, Fieber oder auch ein Ikterus aufgrund der Einengung des Gallenganges auf, die auch andere Ursachen haben oder schon die Folge von Metastasen sein können (Schmidt-Hansen et al., 2016; Walter et al., 2016).

Trotz allgemeiner Fortschritte in Diagnostik und verbesserter therapeutischer Optionen in der Krebsforschung hat sich bislang kaum ein Effekt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit beim Pankreaskarzinom gezeigt. Durch das Ausbleiben von Symptomen in der frühen Erkrankungsphase ist eine kurative Operation nur in den seltensten Fällen möglich (Owens et al., 2019). Meistens ist es zum Zeitpunkt der Diagnose bereits zu Fernmetastasen in Leber, Lunge, abdominalen Lymphknoten, Knochen, Nebennieren oder zu einer Peritonealkarzinose gekommen (Yachida & Iacobuzio-Donahue, 2009). Falls es dennoch gelingt, das



Pankreaskarzinom frühzeitig zu diagnostizieren, gibt es die Option der operativen Resektion mit anschließender Chemotherapie, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit zu überleben deutlich erhöht (Glehen & Bhatt, 2020, S. 27; Glehen et al., 2010; Mizrahi et al., 2020). Aber auch hier besteht die Gefahr, dass gerade infolge der Operation Tumorzellen disseminieren und sich in anderen Organen ansiedeln können (Neoptolemos et al., 2010).

Wie bei anderen Karzinomen auch entsteht das Pankreaskarzinom durch die unkontrollierte und vermehrte Proliferation von Epithelzellen, welche dann zunehmend in das gesunde Gewebe einwandern. Die meisten PDACs entstehen aus Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) (Mizrahi et al., 2020; Yachida & Iacobuzio-Donahue, 2009). Normalerweise würden diese entarteten Zellen in Apoptose gehen, allerdings bleibt dies bei malignen Tumoren aus, was auf unterschiedliche Mutationen oder die Deletion von Genen zurückzuführen ist. Beim Pankreaskarzinom liegt in den meisten Fällen eine Mutation des Onkogens KRAS (zu etwa 95 %) vor, aber auch eine Deletion von Tumorsuppressorgenen wie p16 (zu etwa 95 %), p53 (zu etwa 75 %), SMAD4 (zu etwa 55 %) oder eine BRCA1/2-Mutation (bis zu 8 %) kommt beim Pankreaskarzinom regelmäßig vor (Goral, 2015; Rosen et al., 2021; Yachida & Iacobuzio-Donahue, 2009). Für Epithelzellen ist kennzeichnend, dass sie in engem Zell-Zell-Kontakt stehen und an der Basalmembran verankert sind. Durch eine immer weiter steigende Tumorgöße kommt es zur Neoangiogenese, wodurch der Tumor eine eigene Gefäßversorgung erlangt (Rau et al., 2018, S.14). Dabei ist ferner eine starke Vermehrung des Stromas (Desmoplasie) sehr charakteristisch für das Pankreaskarzinom (Provenzano & Hingorani, 2013). Die Desmoplasie fördert nicht nur die Etablierung einer für das Tumorstadium förderlichen Mikroumgebung, sondern erschwert auch die Zugänglichkeit für Therapeutika (Hosein et al., 2020; Maitra & Hruban, 2008).

Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist jedoch, dass Pankreaskarzinomzellen sich aus dem epithelialen Zellverband herauslösen und anschließend hämatogen, lymphogen oder intraperitoneal metastasieren können.

## **1.2 Metastasierung**

Die sehr hohe Sterblichkeitsrate bei Krebspatient:innen ist zu 90 % durch die Entstehung von Metastasen bedingt (Fares et al., 2020; Steeg, 2006). Als Metastasierung wird die Absiedlung von Tumorzellen aus dem Zellverband maligner Neoplasien und die Einwanderung und anschließende Zellkoloniebildung in anderen Organen bezeichnet. Bei diesem komplexen Prozess müssen die Tumorzellen in der Lage sein, eine Reihe von Barrieren zu überwinden (Steeg, 2006).

Das Ablösen einzelner Tumorzellen aus dem Verband des Primärtumors wird durch einen komplexen zellbiologischen Vorgang ermöglicht, durch den die epithelialen Tumorzellen

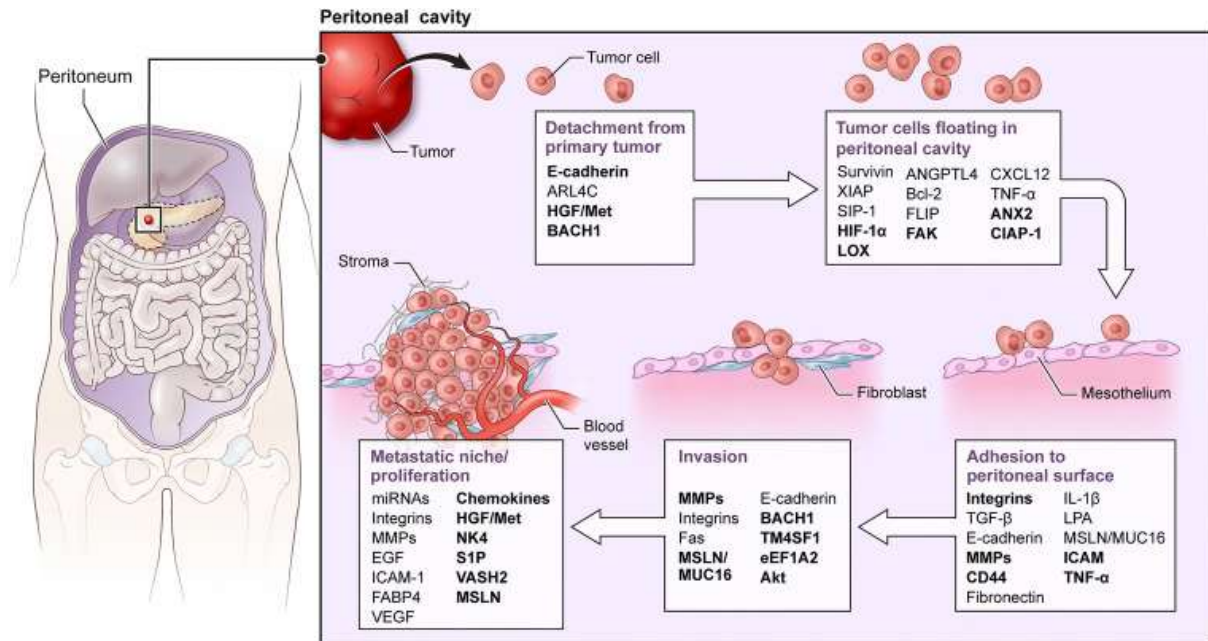
mesenchymale Eigenschaften annehmen, die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die Tumorzellen verlieren dadurch ihre epitheliale Zellpolarität mit einem apikalen und einem basalen Zellpol, reduzieren ihre epithelialen Zell-Zell-Kontakte (Verlust der Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche) wie Adhärenzkontakte, *tight junctions* oder Desmosomen und Hemidesmosomen lösen sich von der Basalmembran ab (Brabletz et al., 2018; Dongre & Weinberg, 2019; Lamouille et al., 2014). Durch die EMT werden auch die invasiven und migratorischen Fähigkeiten der Tumorzellen verstärkt, wodurch diese die Basalmembran überschreiten (Invasion) und das angrenzende Stroma durchwandern können (Migration) (Dongre & Weinberg, 2019). Die Tumorzellen können dabei die Gefäßwände von Blutgefäßen durchdringen und so in den Blutstrom gelangen (Intravasation). Dort werden sie als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet und besitzen nun das Potential, Metastasen auszubilden (Zavyalova et al., 2019). Natürlicherweise würden Epithelzellen ohne den Kontakt zur extrazellulären Matrix (EZM) einer Sonderform der Apoptose (programmierter Zelltod), der so genannten Anoikis (von griechisch: ἀνοικίς, heimatlos), unterliegen. Allerdings fördert die EMT auch die Anoikis-Resistenz der Tumorzellen, wodurch diese befähigt sind, im Blutstrom zu überleben (Fares et al., 2020). In den Blutgefäßen angekommen, nutzen Tumorzellen sehr ähnliche molekulare Mechanismen wie Leukozyten, um in andere Gewebe auswandern zu können (Extravasation) (Sökeland & Schumacher, 2019). Gleichermäßen wie bei der Leukozytenadhäsionskaskade im Rahmen von entzündlichen Prozessen vermitteln E- und P-Selektin, welche auf der Oberfläche der Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert werden, den ersten Kontakt zwischen CTCs und Endothel (Heidemann et al., 2014; Köhler et al., 2010). Durch diesen initialen Kontakt werden die CTCs im Blutstrom angehalten und es kommt zu einer schwachen Adhäsion an das Endothel. Bei dieser ersten Adhäsion ist immer noch eine rollende Bewegung über das Endothel möglich (Sökeland & Schumacher, 2019). Im nächsten Schritt der Adhäsionskaskade folgt funktionell die Gruppe der Integrine. Durch Interaktion zwischen Integrinen auf den CTCs und den Rezeptoren auf dem Endothel erfolgt eine feste Bindung an das Endothel. Hierdurch wird eine Öffnung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte vermittelt, sodass die Tumorzellen hindurchwandern können (Guenther, 2022; van der Flier & Sonnenberg, 2001). Die auf diese Weise ins Stroma des Zielgewebes disseminierten Tumorzellen (DTCs) können nun an die EZM der neuen Umgebung binden, abermals proliferieren und Kolonien ausbilden (Alečković et al., 2019; Klein, 2020). Hier kann der Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) stattfinden, wodurch die Tumorzellen erneut ihre epithelialen Eigenschaften, unter anderem eine verstärkte proliferative Fähigkeit, wiedererlangen (Bakir et al., 2020).

### 1.3 Intraperitoneale Metastasierung

Während es bei der hämatogenen Metastasierung zu Fernmetastasen - beispielsweise in der Lunge - kommen kann, stellt die intraperitoneale Metastasierung eine weitere, besondere Form der Metastasierung unter anderem beim Pankreaskarzinom dar. Unter peritonealen Metastasen, auch Peritonealkarzinose genannt, wird die Ausbreitung von malignen Tumorzellen auf das viszerale und parietale Peritoneum verstanden (Rau et al., 2018, S. 56; Rodt et al., 2013).

Eine Peritonealkarzinose entsteht in den seltensten Fällen durch primäre peritoneale Malignome (Coccolini et al., 2013). Viel häufiger entsteht sie infolge intraabdominaler Karzinome wie dem Ovarialkarzinom oder gastrointestinalen Malignomen wie dem Kolon-, Magen- oder auch Pankreaskarzinom (Coccolini et al., 2013). Hat sich bei den Patient:innen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Peritonealkarzinose manifestiert, verringert sich die Überlebenschance drastisch (Coccolini et al., 2013). Falls die Patient:innen durch einen symptomlosen Primärtumor schmerzfrei sein sollten, treten spätestens im fortgeschrittenen Stadium der peritonealen Metastasierung Symptome wie Gewichtsverlust, Aszitesbildung, Übelkeit und abdominale Schmerzen auf (Rau et al., 2018, S.57).

Die peritoneale metastatische Kaskade ist ein mehrstufiger Prozess, der ähnlich wie die in Abschnitt 1.2 beschriebene hämatogene Metastasierung verläuft (Avula et al., 2020; Jayne, 2007). Die Mesothelzellen, die das Peritoneum auskleiden, sind sowohl strukturell als auch funktionell den Endothelzellen der Blutgefäße sehr ähnlich, wodurch sich zum Prinzip der Adhäsionskaskade eine gute Vergleichbarkeit ergibt. Sowohl Endothel- als auch Mesothelzellen bilden ein mesodermal abgeleitetes einschichtiges Plattenepithel (Chung-Welch et al., 1989). Grundsätzlich haben Mesothelzellen die Funktion, eine Schutzbarriere und eine reibungslose Schnittstelle für die uneingeschränkte Bewegung aneinander liegender Organe beziehungsweise Gewebe zu bilden. Zusätzlich spielen sie aber auch eine wichtige Rolle beim Flüssigkeits- und Zelltransport, bei der Initiierung und Auflösung von Entzündungen, der Verhinderung von Adhäsionsbindungen und für den Schutz gegen eine Tumorausbreitung (Mutsaers, 2002). Auch bei der peritonealen Metastasierung müssen sich zuerst einzelne Tumorzellen oder Tumorzellcluster aus dem Verband des Primärtumors lösen, welche daraufhin frei in der Peritonealhöhle und somit in der Peritonealflüssigkeit vorliegen und mittels physiologischen Flüssigkeitsstroms transportiert werden (Rau et al., 2018, S. 12). Die einzelnen Schritte der intraperitonealen Metastasierung sind in Abb. 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Intraperitoneale metastatische Kaskade des humanen Pankreaskarzinoms.** Es werden die einzelnen Schritte vom Ablösen einzelner Zellen aus dem Primärtumorverband des Pankreas bis zur Entstehung neuer Kolonien in anderem Gewebe und die wichtigsten daran beteiligten Moleküle gezeigt (Avula et al., 2020).

Es gibt allerdings Unterschiede zwischen der peritonealen und der hämatogenen Metastasierung. In der Peritonealhöhle sind die Tumorzellen deutlich geringeren Scherkräften ausgesetzt, da die peritoneale Flüssigkeitsscherspannung mit etwa 0-10 dyn/cm<sup>2</sup> (Hyer et al., 2018) deutlich geringer ist als die des Blutstroms in postkapillären Venolen (und kleinen Kapillaren), in denen die Extravasation bei der hämatogenen Metastasierung stattfindet (ca. 3-96 dyn/cm<sup>2</sup>) (Richter et al., 2011). Das Peritoneum bietet zudem eine enorm große Oberfläche von etwa 2 m<sup>2</sup>, wodurch die Tumorzellen viele Adhäsionsmöglichkeiten haben (Rau et al., 2018, S. 5).

Auch in der Peritonealhöhle unterliegen die abgelösten Tumorzellen natürlicherweise dem Druck der Apoptose beziehungsweise Anoikis. Da einige Tumorzellen aus den genannten Gründen in der Lage sind, die Anoikis-induzierte Apoptose zu supprimieren, können sie in der Peritonealflüssigkeit überleben. Das Überleben in der Bauchhöhle kann durch die Bildung von malignem Aszites noch zusätzlich begünstigt werden. So konnte beispielsweise in einer Studie gezeigt werden, dass in malignem Aszites Lysophosphatidsäure (LPA) vermehrt vorlag und dies die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen stimulierte (Yamada et al., 2004). Ebenso wurde nachgewiesen, dass der maligne Aszites Überlebensfaktoren enthielt, welche die TRAIL-induzierte Apoptose von Ovarialkarzinomzellen hemmen konnten (Lane et al., 2007).

Die Tumorzellen treffen im ersten Schritt der Adhäsionskaskade entweder auf das Peritoneum viszerale, das die intraabdominalen Organe ummantelt, oder auf das Peritoneum parietale, die

innere Auskleidung der Bauchhöhle (Rau et al., 2018, S. 5). Hier adhären die Tumorzellen an die Mesothelzellen des Peritoneums und können darauf folgend in die darunter liegende Schicht, das submesotheliale Bindegewebe, invadieren (Avula et al., 2020). Die in der Peritonealflüssigkeit befindlichen Tumorzellen können aber auch direkten Zugang zur submesothelialen Schicht bei einer Diskontinuität oder einer Kontraktion der Mesothelzellen erhalten. So wurde schon 1968 gezeigt, dass es Spalten zwischen den Mesothelzellen gibt (Cotran & Karnovsky, 1968). Aber gerade auch infolge einer Operation kann das Mesothel erheblich beschädigt werden und so die Integrität verlieren (Cortés-Guiral et al., 2021). In dieser submesothelialen Bindegewebsschicht, bestehend aus einer komplexen EZM, können sich nun einzelne Tumorzellen anlagern, proliferieren und Kolonien ausbilden (siehe Abschnitt 1.2).

## **1.4 Zelladhäsionsmoleküle**

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind membranständige Proteine, die sowohl an der Zell-Zell-Interaktion als auch am Austausch zwischen den Zellen und der EZM maßgeblich beteiligt sind. Während der Tumorprogression kann es zu erheblichen Veränderungen in der Expression der CAMs kommen (Makrilia et al., 2009). Die CAMs lassen sich in die Gruppen Cadherine, Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie unterteilen. Jede Gruppe der CAMs hat eine ganz spezifische klinische Relevanz für das Voranschreiten der Tumorentwicklung und den mehrstufigen Prozess der Adhäsionskaskade (Makrilia et al., 2009).

### **1.4.1 Cadherine**

Cadherine sind Glykoproteine, die eine wichtige Funktion bei der Zell-Zell-Interaktion haben, indem sie sich am Aufbau von Adhärenzkontakten beteiligen. Cadherine sind Kalzium-abhängig und bestehen aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne sowie einem transmembranösen Segment. Die extrazelluläre Domäne der Cadherine bindet bevorzugt homophil, also an die extrazelluläre Domäne des Cadherins einer benachbarten Zelle (Makrilia et al., 2009).

Der Vorgang der EMT hat einen großen Anteil an der metastatischen Progression (siehe Abschnitt 1.2). Für die EMT ist charakteristisch, dass die Tumorzellen vermehrt N-Cadherin auf ihrer Oberfläche exprimieren und infolgedessen E-Cadherin herunterregulieren. Dadurch verlieren sie ihre epithelialen Eigenschaften, werden weniger proliferativ, reduzieren ihre homophilen Zell-Zell-Kontakte und weisen stattdessen ein deutlich höheres migratorisches Potential auf, welches die Metastasierung fördert (Loh et al., 2019).

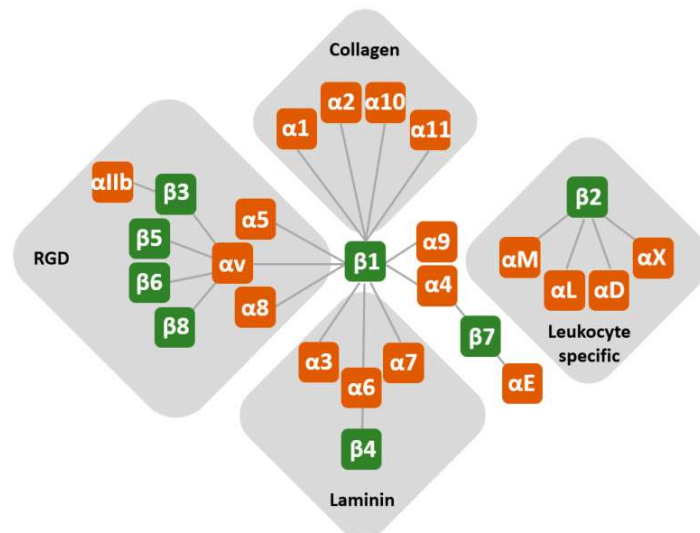
### 1.4.2 Selektine

Selektine sind ebenfalls transmembranöse Glykoproteine und lassen sich in E-(Endothel), P-(Thrombozyten) und L-(Leukozyten) Selektin unterteilen. E- und P-Selektin werden auf der Oberfläche von Endothel- und Mesothelzellen exprimiert. In den Blutgefäßen oder auch in der Peritonealhöhle stellen sie den ersten Kontakt zwischen Endo-/Mesothel und Tumorzellen her. Tumorzellen weisen häufig Alterationen bei der Glykosylierung membranständiger Proteine und Lipide auf, wodurch veränderte Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche vorkommen. So kommt es beispielsweise zu einer starken Hochregulation der Selektin-Liganden Sialyl Lewis<sup>x</sup> und Sialyl Lewis<sup>a</sup>, welche die Adhäsion an die Endothel-/Mesothelzellen initiieren. Beide Liganden sind mit der Metastasierung und folglich mit einer schlechten Prognose assoziiert (Kannagi et al., 2004; Läubli & Borsig, 2010; St Hill, 2011). E- und P-Selektin haben einen großen Anteil an der ersten vaskulären Adhäsion und der darauf folgenden Extravasation, welche die Kolonisation in anderem Gewebe ermöglichen kann. In mehreren Studien dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Selektine essentiell am Tumorwachstum und der Metastasierung beteiligt sind (Gebauer et al., 2013; Genduso et al., 2023; Köhler et al., 2010).

### 1.4.3 Integrine

Integrine sind heterodimere Zelloberflächenmoleküle, die aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Insgesamt gibt es 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten, wodurch potentiell 24 Integrin-Heterodimere entstehen können, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind (Barczyk et al., 2010; Hynes, 2002) (Abb. 2). Die Integrin-Untereinheiten besitzen eine große extrazelluläre Domäne, eine spindelförmige Domäne, welche die Plasmamembran durchspannt, und eine kurze Domäne, die im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. In den meisten Fällen sind die  $\alpha$ -Untereinheiten für regulatorische und die  $\beta$ -Untereinheiten für aktivierende Vorgänge zuständig (Ginsberg et al., 2005).

Integrine agieren als Adhäsionsrezeptoren und können spezifische Ligandenbindungen mit Proteinen der EZM oder aber auch Zell-Zell-Verbindungen eingehen. So können sie in verschiedene Gruppen unterteilt werden, abhängig davon, mit welchen EZM-Komponenten sie hauptsächlich interagieren. Diese EZM-Komponenten können beispielsweise Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Laminin oder Collagen sein (Abb. 2). Jeder Zelltyp des Organismus hat ein ganz individuelles Integrin-Profil (Arun et al., 2018; Cooper & Giancotti, 2019; Samaržija et al., 2020).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Integrin-Heterodimere und deren Subgruppen.** Mögliche Paarbildungen von Integrin  $\alpha$ - (orange) und  $\beta$ - (grün) Untereinheiten. Integrine lassen sich nach ihren Rezeptoreigenschaften in vier Subgruppen einteilen, die an verschiedene EZM-Proteine und/oder Zelloberflächenmoleküle binden können. Sie können an Liganden der EZM mit einer RGD-Sequenz, an Laminin oder an Collagen oder aber auch Leukozyten-spezifisch binden (grau) (Samaržija et al., 2020).

Integrine werden auf den meisten Zelltypen exprimiert und sind an den verschiedensten grundlegenden zellulären Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Entzündungsprozessen oder auch Apoptose beteiligt (Anderson et al., 2014; Hynes, 2002). Sie sind in der Lage, sich extrazellulären Bedingungen oder Veränderungen anzupassen, da sie sich selbst regulieren können (siehe unten). Ebenso sind Integrine vor allem an der Initiation und Progression des Tumors sowie der Metastasierung beteiligt und zwar sowohl aufgrund der Zell-EZM-Interaktion als auch durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen (Humphries et al., 2006; M. Li et al., 2021). Durch die Bindung der Integrine an die EZM findet eine bidirektionale Signaltransduktion statt, wobei es sich dabei sowohl um *inside-out*- als auch um *outside-in-Signaling* handeln kann: Integrine können intrazellulär von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche eine Phosphorylierung der im Zytoplasma liegenden Domäne der  $\beta$ -Untereinheit bewirken, aktiviert werden (Ginsberg et al., 2005; Takada et al., 2007). Dieser intrazelluläre Signalweg wird von dem Schlüsselprotein Talin gesteuert und führt zur Konformationsänderung der extrazellulären Domäne und reguliert so die Liganden-Bindungsaffinität (*inside-out-Signaling*) (Kechagia et al., 2019; Klapholz & Brown, 2017). Die Integrinaktivierung kann allerdings auch durch mehrere externe Signale gesteuert werden. Dieses *outside-in-Signaling* kann entweder durch die Interaktion der Integrine mit EZM-Liganden oder aber auch durch Wachstumsfaktoren, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie oder durch Hormone im Extrazellularraum geschehen. Durch diese extrazellulären Signale kommt es zur Clusterbildung der Integrine, welche wiederum

intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. So können beispielsweise FAK, SRC oder AKT aktiviert werden (Das et al., 2014; Pang et al., 2023; van der Flier & Sonnenberg, 2001).

Integrine sind also in der Lage, sich selbst durch Aktivierung oder Inhibierung zu regulieren (Gahmberg et al., 2022); eine Fähigkeit, die bei Fehlregulation zur Tumorentwicklung beitragen kann (Vicente-Manzanares & Sánchez-Madrid, 2018). Durch die onkogene Transformation ändert sich das Repertoire der Integrine auf der Oberfläche der Tumorzellen, sodass das Expressionslevel eines Dimers auf der Oberfläche oder aber auch die Menge der intrazellulär gespeicherten Untereinheiten verändert sein kann. In der Folge kann es zum sogenannten Integrin-*crosstalk* kommen. So kann beispielsweise die Verringerung der Expression einer spezifischen Integrin-Untereinheit zur Gegenregulation einer oder mehrerer anderer Integrin-Untereinheiten führen (Samaržija et al., 2020).

### 1.4.3.1 Integrin $\alpha 3$

Integrin  $\alpha 3$  (ITGA3) kann ausschließlich mit Integrin  $\beta 1$  (ITGB1) ein Dimer bilden und hat Laminin als wichtigsten EZM-Liganden (Hynes, 2002). Laminine sind heterotrimere Glykoproteine der EZM, bestehend aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Mit der höchsten Affinität bindet ITGA3 an Laminin  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$  (kurz: Laminin 332 oder Laminin V) und Laminin 511/521 (X/XI) (Ramovs et al., 2017).

Integrin  $\alpha 3\beta 1$  (ITGA3B1) wird vor allem von Zellen der Haut, der Niere, der Lunge, des Darms, der Harnblase und des Magens exprimiert. In diesen Gewebetypen hat es die Funktion, die Adhäsion von Epithelzellen an Laminin V und Laminin X/XI in der Basalmembran zu vermitteln oder durch eine Komplexbildung mit CD151 die Stabilität des E-Cadherins zu kontrollieren und somit die Zell-Zell-Kontakte aufrechtzuerhalten (Ramovs et al., 2017).

Kommt es zur Mutation des ITGA3-Gens, kann dies zu verschiedenen Krankheitsbildern beitragen. Durch die fehlende Funktion des ITGA3 kann es beispielsweise zu einer tödlichen Multiorganerkrankung kommen, einer interstitiellen Pneumonie, einem nephrotischen Syndrom oder einer Epidermolysis bullosa. Für die interstitielle Pneumonie ist ein gestörter Aufbau des Bindegewebes in der Lunge charakteristisch, was unter anderem eine bronchioläre Fibrose zur Folge haben kann. Beim nephrotischen Syndrom kommt es zum Defekt der glomerulären Basalmembran, wodurch eine Störung der Blut-Harn-Schranke entstehen kann. Die Epidermolysis bullosa äußert sich darin, dass es spontan oder nur durch leichte Berührungen zur Blasenbildung der Haut und Schleimhaut kommen kann. Diese Überempfindlichkeit der Haut wird durch eine Fehlorganisation der dermoepidermalen Junktionszone, welche die Epidermis mit der Dermis verbindet, hervorgerufen (Has et al., 2012; He et al., 2016; Kreidberg et al., 1996; Nicolaou et al., 2012; Yalcin et al., 2015).

Bei der Tumorprogression und Metastasierung ist die Funktion von ITGA3 nicht eindeutig. Abhängig von der Tumorentität und pathologischen Umständen kann ITGA3 als



tumorprogressiv, -suppressiv oder sogar beides wirken (Ramovs et al., 2017; Stipp, 2010). Beim Kolonkarzinom ist eine geringe ITGA3-Expression ein Indikator für eine schlechte Prognose für die Patient:innen (Hashida et al., 2002). Außerdem wird angenommen, dass hoch metastatische Kolonkarzinome eine geringere ITGA3-Expression aufweisen als weniger metastatische (Hashida et al., 2001). Ebenso konnte bei der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 festgestellt werden, dass parentale PC-3-Zellen sehr viel ITGA3 exprimierten, wohingegen eine hoch invasive Subpopulation von PC-3-Zellen eine erhebliche Reduktion des ITGA3 auf der Zelloberfläche und auf mRNA-Ebene aufwies. Diese Subpopulation hatte ein 15-fach höheres Invasionspotential als die parentalen PC-3-Zellen (Dedhar et al., 1993). Eine weitere Studie zeigte, dass beim Mammakarzinom die Regulationsmechanismen von ITGA3 noch nicht ganz aufgeklärt sind. Zum einen führte die ITGA3-Depletion zu vermehrter E-Cadherin-Expression und verminderter Expression von N-Cadherin, Vimentin und SNAIL in den Mammakarzinomzellen, was auf eine Inhibierung der EMT-Prozesse hindeutet. Zum anderen wurde beschrieben, dass die Reduktion des ITGA3 die Proliferation, Apoptose, Invasion und Migration der Zellen förderte (Zhang et al., 2020). In einer anderen Studie wurde mithilfe mehrerer Datenbanken analysiert, welche Bedeutung ITGA3 beim Mammakarzinom hatte. Es konnte gezeigt werden, dass ITGA3 einen positiven Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Mammakarzinom-Patientinnen hatte; je geringer die ITGA3-Expression, desto schlechter die Prognose. Insgesamt war auf Protein- und mRNA-Ebene die Expression von ITGA3 im Normalgewebe der Brustdrüse größer als im Tumorgewebe (Y. Li et al., 2021). Beim Magenkarzinom hingegen führte eine hohe ITGA3-Expression zur verstärkten Invasionsfähigkeit und zur Entstehung von Lebermetastasen und peritonealen Metastasen (Ura et al., 1998).

Im Pankreaskarzinom ist ITGA3 deutlich höher exprimiert als im Normalgewebe (Samaržija et al., 2020; Tang et al., 2019). Bei einer bioinformatischen Studie wurde herausgefunden, dass in den Pankreaskarzinomen der Patient:innen in einem weiter fortgeschrittenen Stadium ITGA3 ein sogar noch höheres Expressionslevel aufwies als in früheren Stadien. Es konnte ebenfalls belegt werden, dass ITGA3 beim Pankreaskarzinom ein prognostischer Marker für ein kürzeres Gesamtüberleben und für schlechtere Behandelbarkeit ist (Jiao et al., 2019; Zheng et al., 2023).

#### **1.4.3.2 Integrin $\alpha$ V**

Die Integrin-Untereinheit  $\alpha$ V (ITGAV) kann ein Heterodimer mit fünf verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten (ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6, ITGB8) bilden. Wird eines dieser Heterodimere auf der Oberfläche exprimiert, können Zellen mittels Rezeptor-Ligand-Bindung an EZM-Proteine binden, die die RGD-Aminosäuresequenz (Arginin, Glycin und Asparaginsäure) enthalten wie beispielsweise Fibronectin oder Vitronectin. Ebenso kann ITGAV aber auch an

das Latenz-assoziierte Peptid (LAP) von TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3 binden. Ganz besonders wichtig für diesen Signalweg ist ITGAVB6. Diese Bindung führt zur Aktivierung von TGF- $\beta$  und stellt damit eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von ITGAVB6 im Organismus dar (Annes et al., 2004; Koivisto et al., 2018). TGF- $\beta$  hat eine duale Funktion in der Onkogenese: Zum einen unterdrückt es gerade zu Beginn der Entstehung das Tumorwachstum, zum anderen kann es während der späteren Entwicklung, wenn die Tumorzellen für die TGF- $\beta$ -vermittelte Wachstumshemmung unempfindlich werden, bewirken, dass die intrazellulären Signalwege gestört werden und es so zur Tumorprogression kommt (Connolly et al., 2012). Hierbei spielt SMAD4 eine zentrale Rolle für die Umwandlung der Funktion von TGF- $\beta$ . Die Induktion der EMT wird durch den SMAD4-abhängigen TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg gefördert, an dessen Ende sich eine Induktion mesenchymaler Marker wie SNAIL, SLUG, TWIST und ZEB nachweisen ließ (Vincent et al., 2009; Zhao et al., 2018). ITGAV vermittelt also nicht nur die mechanische Anhaftung an EZM-Liganden, sondern fördert auch die Signalwege, die das Tumorwachstum voranschreiten lassen.

ITGAVB6 ist als therapeutisches Target besonders interessant, da es auf den Zellen in normalem, gesundem Gewebe eine sehr niedrige bis gar nicht detektierbare Expression aufweist. Erst durch patho-physiologische Prozesse wie beispielsweise Entzündung oder Karzinogenese wird ITGAVB6 hochreguliert (Koivisto et al., 2018; Liu et al., 2014). So konnte ITGAV auch schon in mehreren Tumorentitäten als interessantes Target identifiziert werden. In kürzlich erhobenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl beim Magenkarzinom (Dai et al., 2021; Wang et al., 2019) als auch beim Kolonkarzinom (Lepsenyi et al., 2021; Sato et al., 2022), Mammakarzinom (Cheuk et al., 2020) und Prostatakarzinom (Krishn et al., 2022) eine hohe ITGAV-Expression in positiver Korrelation zur Tumorprogression und damit einhergehender schlechter Prognose stand.

Im Pankreaskarzinom steigt die ITGAV-Expression im Vergleich zum Normalgewebe an, ebenso sind auch die ITGAV-Bindungspartner ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6 und ITGB8 höher exprimiert (Samaržija et al., 2020; Tang et al., 2019).

#### **1.4.4 Immunglobulin-Superfamilie**

Die CAMs der Immunglobulin-Superfamilie (IgCAMs) sind eine große Gruppe unterschiedlicher Glykoproteine, die eine oder auch mehrere extrazelluläre Immunglobulin-Domänen aufweisen und Kalzium-unabhängig sind. Die IgCAMs sind an vielen biologischen Prozessen wie der Entwicklung des Nervensystems, der Zellerkennung, der Immunreaktion oder aber auch der Adhäsion beteiligt (Makrilia et al., 2009). Sie sind in der Lage, an Mitglieder sowohl der eigenen als auch einer anderen Superfamilie zu adhären. So kann auf Leukozyten exprimiertes Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 an auf Endothelzellen vorkommende vaskuläre CAMs (VCAMs) binden (Jakubowski et al., 1995).

Eine Subgruppe der IgCAMs bilden die carcinoembryonalen-Antigen-Zelladhäsionsmoleküle (CEACAMs). Die CEACAM-Expression im PDAC führt zwar zu einer divergenten prognostischen Aussage, korreliert aber mit einem aggressiveren Tumorwachstum (Gebauer et al., 2014). Das carcinoembryonale-Antigen (CEA, CEACAM5) gehört zu den wichtigsten Tumormarkern und wird von den Zellen der meisten epithelialen Karzinome wie dem Kolon-, Magen-, Pankreas- und dem muzinösen Ovariakarzinom exprimiert (Hammarström, 1999).

## **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit und klinische Relevanz**

In Deutschland ist Krebs die zweithäufigste krankheitsbedingte Todesursache. Der Grund für diese hohe Sterberate ist zum allergrößten Teil auf metastatische Prozesse zurückzuführen. Die Überlebensprognose für Patient:innen mit einem Pankreaskarzinom ist außerordentlich schlecht. Aufgrund fehlender oder unspezifischer Symptomatik ist der Zeitpunkt der Diagnose sehr spät und der Primärtumor des Pankreas hat bereits intraperitoneal metastasiert und/oder es haben sich Fernmetastasen in beispielsweise der Lunge oder der Leber ausgebildet. Insbesondere bei einer etablierten Peritonealkarzinose sind die therapeutischen Optionen äußerst begrenzt.

Ziel dieser Arbeit war es, das Wachstumsverhalten des Primärtumors und die einzelnen Schritte sowohl der hämatogenen, aber vor allem der intraperitonealen Metastasierung genauer zu untersuchen und ein neues therapeutisches Konzept zu entwickeln. Hierbei wurde von der Grundhypothese ausgegangen, dass die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel beziehungsweise Mesothel einen Schlüsselschritt der Metastasierung darstellt.

Im initialen Schritt der Adhäsionskaskade interagieren die Tumorzellen mit Selektinen. In einer vorangegangenen Studie dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Metastasierung in Mäusen mit E- und P-Selektin-*knockout* erheblich reduziert war (Gebauer et al., 2013). Im darauf folgenden Schritt wird die Adhäsion durch Integrine gefestigt. Im Pankreaskarzinom sind fast alle Integrin-Untereinheiten im Vergleich zum Normalgewebe hochreguliert (Madamanchi et al., 2014; Samaržija et al., 2020; Tang et al., 2019). Außerdem konnte mittels Genexpressions-Array der intraperitonealen Karzinosen, die aus den Mäusen der oben genannten Studie stammten, gezeigt werden, dass in den Mäusen mit E- und P-Selektin-*knockout* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen mehrere Integrin-Untereinheiten (insbesondere ITGAV) möglicherweise kompensatorisch hochreguliert wurden. In Vor- und Eigenarbeit wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft, wie hoch das Expressionslevel verschiedener Integrin-Untereinheiten auf der Oberfläche von neun Pankreaskarzinomzelllinien war (Tab. 1). Diese Arbeit konzentriert sich auf ITGA3 und ITGAV, zwei Integrin-Untereinheiten, die für das Pankreaskarzinom relevant sind und gleichzeitig vielversprechend sein könnten, um die klinische Situation zu verbessern.

Demzufolge widmet sich diese Arbeit folgenden Fragestellungen:

- Lässt sich ein stabiler ITGA3- und ITGAV-*knockdown* in Pankreaskarzinomzellen generieren und kommt es durch den *knockdown* zur Gegenregulation anderer Integrin-Untereinheiten *in vitro* und *in vivo*?
- Welchen Einfluss hat der *knockdown* von ITGA3 und ITGAV in Pankreaskarzinomzellen auf das Tumorstadium, die Fernmetastasierung und die intraperitoneale Metastasierung im Xenograftmodell und führt diese Depletion zu einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit?
- Gibt es synergistische Effekte infolge einer reduzierten ITGAV-Expression auf den Tumorzellen in Mäusen mit E- und P-Selektin-*knockout*?
- Kommt es zu morphologischen oder Transkriptom-Veränderungen in den Xenografttumoren aufgrund des *knockdowns* von ITGA3 oder ITGAV?
- Gibt es aufgrund einer reduzierten ITGA3- oder ITGAV-Expression funktionelle Effekte auf einzelne Schritte der Metastasierung *in vitro*, insbesondere im Hinblick auf Anoikis, Adhäsion, Migration, Invasion, Proliferation und Kolonieformation?
- Lassen sich die Entstehung und die Progression der Peritonealkarzinose mittels gegen ITGA3/ITGAV gerichteter siRNA/Nanopartikelkomplexe therapeutisch hemmen?

## **2 Manuskripte**

### **2.1 Manuskript „*Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer*”**

# **Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer**

Alina Schiecke<sup>1</sup>, Hanna Maar<sup>1,2,3</sup>, Tobias Lange<sup>1,2,3</sup>, Bettina Breitenborn<sup>1</sup>, Kristoffer Riecken<sup>4</sup>, Michael Spohn<sup>5,6,7</sup>, Stepan Nersisyan<sup>8</sup>, Achim Aigner<sup>3,9</sup>, Alexander Ewe<sup>3,9</sup>, Udo Schumacher<sup>1,10</sup> and Daniel Wicklein<sup>11</sup>

1. Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

2. Institute of Anatomy I, Cancer Center Central Germany, Jena University Hospital, Germany

3. Comprehensive Cancer Center Central Germany (CCCG)

4. Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Germany

5. Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

6. Research Institute Children's Cancer Center Hamburg, Hamburg, Germany

7. Bioinformatics Core, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

8. Computational Medicine Center, Sidney Kimmel Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, United States

9. Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany

10. Medical School Berlin, Mecklenburgische Straße 57, 14197 Berlin, Germany

11. Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Marburg, Germany

**Keywords:** Integrin alpha-3, laminin, intraperitoneal metastasis, pancreatic cancer

## **Corresponding author:**

Daniel Wicklein

Institute for Anatomy and Cell Biology

University of Marburg

Robert-Koch-Strasse 8, 35037 Marburg

Phone: + 49-(0)15142354485

Email: [daniel.wicklein@uni-marburg.de](mailto:daniel.wicklein@uni-marburg.de)

## ABSTRACT

**Background:** The development of intraperitoneal metastases from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) drastically minimizes therapeutic options. Integrins are key players in the interaction of PDAC cells with mesothelial cells and the extracellular matrix (ECM) components of the submesothelial layer, which is important for the initiation and progression of intraperitoneal (IP) carcinomatosis. In particular, integrin alpha-3 (ITGA3), which binds to various ECM ligands, is highly upregulated in PDAC. Its functional relevance in PDAC, however, is largely unknown.

**Methods:** A stable shRNA mediated ITGA3 knockdown was established in three PDAC cell lines. In xenograft models, the spread of IP carcinomatosis was analysed upon intraperitoneal injection of these knockdown vs. negative control cells. In addition, sustained ITGA3 knockdown and possible (counter-) regulation of other integrin subunits due to ITGA3 reduction was studied in cell lines and in IP carcinomatosis tumour samples. Peritoneal metastases were also analyzed by *next generation sequencing* and compared with differential gene expression data from patients diagnosed with PDAC. Using the stable tumour cell lines, the effects of ITGA3 on key steps of peritoneal metastasis formation were further characterized *in vitro*.

**Results:** The knockdown of ITGA3 led to significantly improved overall survival due to reduced development of IP carcinomatosis and decreased malignant ascites formation in two of three xenograft models. Overlapping gene expression data from patients and the two PDAC cell lines with survival benefit identified ITGA3 to be a regulator of genes relevant for tumour progression, e.g. CEACAM6. In addition, ITGA3 was found to be involved in different steps of peritoneal spread *in vitro*, as demonstrated by reduced adhesion, proliferation, invasion and colony forming potential due to ITGA3 knockdown.

**Conclusion:** High ITGA3 expression levels in PDAC have a detrimental impact on survival and progression of IP carcinomatosis. ITGA3 as a part of the leukocyte adhesion cascade is significantly involved in peritoneal metastasis of PDAC. Thus, it represents a promising target for future therapies.

## **BACKGROUND**

PDAC is one of the most frequent causes of cancer-related deaths worldwide (1, 2). Since most cases are diagnosed only at a very advanced stage, a successful therapy by surgery is often no longer possible (3). PDAC tumour cells have the potential to migrate and grow into the peritoneal cavity, leading to the development of intraperitoneal (IP) carcinomatosis (4). Once peritoneal metastases have manifested, therapeutic options are limited, resulting in an extremely unfavourable prognosis for the patient (2, 3).

Cell-cell and cell-matrix communication between tumour cells and the mesothelial cell layer lining the peritoneal cavity as well as the submesothelial extracellular matrix (ECM) cause PDAC cells to attach to the mesothelium and to proliferate thereafter (5, 6). Integrins are heterodimeric cell surface molecules consisting of alpha and beta subunits (a total of 24 different dimers can be expressed) that are essentially involved in tumour initiation and progression. Integrin molecules are key determinants of PDAC cell-cell interactions at the mesothelial surface and PDAC cell adhesion to the ECM (4, 6). The expression levels and compositions of integrin subunits can be altered during oncogenic transformation, leading to a so-called integrin switch. By consequence, one or several integrin subunits can be up- or down-regulated compared with normal tissue (7, 8), with most integrin subunits being up-regulated in PDAC (9). In one of our previous studies, we demonstrated the upregulation and functional relevance of integrin alpha-V (ITGAV) in PDAC IP carcinomatosis (10).

Compared with normal tissue, integrin alpha-3 (ITGA3) is highly overexpressed as well, in PDACs and in other carcinomas (9). This alpha integrin subunit can exclusively form a dimer with integrin beta-1 (ITGB1) and is recognized by laminin 332, laminin 511 and laminin 521 as major ECM ligands (11, 12). It has already been shown that ITGA3 acts as an important prognostic and diagnostic marker in pancreatic cancer (13, 14). However, for elucidating whether ITGA3 might represent a promising therapeutic target to reduce IP spread, functional analyses on its putative role for peritoneal carcinosis are still missing.

In the present study, we investigated how stable depletion of ITGA3 affects tumour formation, IP spread and thereby survival in three human PDAC xenograft models, and further analyzed underlying cellular effects.

## **METHODS**

### **Cell lines and cultivation**

Authenticated human pancreatic cell lines Panc89 and BxPC-3 were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and PaCa5061 was in-house established from a primary tumour (15). Cells were cultivated under standard conditions at 95% humidity, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Panc89 and BxPC-3 were grown in RPMI 1640 (Gibco, Schwerte, Germany, #21875-034) containing



10% FCS and 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, Gibco, #15140-122). PaCa5061 cells were grown in TUM medium consisting of RPMI 1640 with Glutamax (Gibco, #72400-021), 10% FCS (Gibco, #10500-064), 1% penicillin/streptomycin, 0.01 mg/ml hFGF (R&D Systems, Wiesbaden, Germany, #233-FB), 0.01 mg/ml EGF (ReproTech, #AF-100-15), 0.01 µg/ml insulin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany, #I5500) and 0.05 µmol/ml transferrin (Sigma Aldrich #T8158). Tumour cells were tested negative for mycoplasma using PCR-based VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin, Germany, #11-1100).

### **RNAi-mediated ITGA3 knockdown and cell separation**

To achieve a stable shRNA-mediated ITGA3 knockdown (method as previously described (10)), an oligonucleotide sequence (GCTACATGATTTCAGCGCAA) was inserted into the pLVX vector (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). The sequence targeting ITGA3 was analyzed for potential off-target effects using NCBI BLAST. A sequence (GCCTAAGGTTAAGTCGGCCCT) without any homology to the genome of the cells was used as negative control. Additionally, the vector contained a puromycin resistance gene, and puromycin was added in the initial passages for selecting for transduced cells. Cells were separated using MACS Separation System (QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany, #130-090-976). Between 4 and 7 x 10<sup>6</sup> cells were labeled with an anti-human ITGA3/ CD49c FITC-labeled antibody (Miltenyi Biotec, #130-105-364) in a volume of 400 µl and a concentration of 4 µg/ml and kept on ice for 12 min. Thereafter, cells were washed with 1 ml ice-cold MACS Running Buffer (Miltenyi Biotec, #130-091-221) and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The cell pellet was resuspended in 90 µl MACS Running Buffer and 10 µl anti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec, #130-048-701), prior to incubation on ice for 15 min. The cell pellet was repeatedly washed with 1 ml MACS Running Buffer, centrifuged and resuspended in 500 µl MACS Running Buffer. LD Separation Columns (Miltenyi, #130-042-901) were rinsed with 2 ml Running Buffer prior to adding the sample. Cells with low ITGA3 expression (not binding to the column) were collected and further cultivated. The knockdown efficiency of each of the three cell lines was determined by flow cytometry, Western blot, and qRT-PCR, and knockdown stability and persistence was regularly verified during the experiments.

### **Flow cytometry**

Cell surface integrin levels were analyzed by flow cytometry. It was ensured that cells were approximately 80% confluent and at the same passage number at the time of measurement. 1 x 10<sup>5</sup> to 5 x 10<sup>5</sup> cells were resuspended in 100 µl PBS (Gibco, # 14190-094) containing 1% BSA and 0.05% NaN<sub>3</sub>, and incubated for 12 min at 4°C with the antibodies detailed in

Supplementary Table 1, prior to washing and analysis using a MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, #130-096-343). Propidium iodide was added at a final concentration of 1 µg/ml immediately before measurement for detecting dead cells and excluding them from the analysis.

### **Western blot**

PDAC cells were harvested from a densely grown T75 flask using a cell scraper and cell pellets were resuspended in 200 µl RIPA lysis buffer and 1% protease inhibitor cocktail (Merck, #539131), vortexed and kept on ice for 30 min. Next, centrifugation was performed at 14,000 rpm for 30 min at 4°C and the supernatant was stored at -20°C. To determine protein concentrations, the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Germany, #23225) was used. The spectra multicolor broad range protein ladder (Thermo Scientific, #26634) and 30 µg protein sample were loaded onto the gel (NuPAGE, Thermo Scientific, #NP0336BOX). The transfer to a PVDF membrane (Thermo Scientific, #IB24001) was performed using iBlot (Thermo Scientific). The primary antibody directed against ITGA3 (Santa Cruz, #sc393290) was diluted 1:100 in 8 ml milk powder (5%) in TBST and incubated for 1 h, followed by washing and incubation with the secondary antibody (goat anti-mouse IgG, HRP-conjugated; Dako, #P0447), diluted 1:4000 in 8 ml of the same buffer. After washing, the bound secondary antibody was detected using the SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescence substrate (Thermo Scientific, #34580) and chemiluminescence was visualized in a Fusion Solo S3 (PeqLab, Erlangen, Germany). Protein bands were quantified using the CapImage software (Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany) and normalized for the corresponding loading controls (GAPDH; primary antibody from Proteintech, Munich, Germany, #60004-1-Ig, diluted 1:4000). ITGA3 levels in knockdown samples were calculated relative to control samples.

### **Quantitative real-time PCR**

RNA was isolated from cell pellets using the RNA Isolation Kit (Qiagen, #74104) according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed into cDNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Hilden, Germany, #330404). Quantitative real-time PCR analyses were performed using the SYBR Green I Master kit (Kapa Biosystems, Taufkirchen, Germany, #KK4611) in a LightCycler 480 system (Roche, Mannheim, Germany). 90 ng of cDNA were applied. The pre-incubation cycle ran at 95°C for 3 min. Denaturation was performed at 95°C for 10 sec, followed by 45 cycles at 95°C for 10 sec, 59°C/ 58°C for 10 sec and at 72°C for 20 sec. All samples were measured in triplicates, RNase-free water was used as a non-template control and β-actin as reference gene. Relative quantification using the  $\Delta\Delta C_T$  method was performed to determine the mRNA integrin expression levels in ITGA3 knockdown cells compared to control

cells. The oligonucleotide sequences of the used qPCR primers are given in Supplementary Table 2.

### **Anoikis assay**

To evaluate the effect of ITGA3 knockdown on programmed cell death resulting from detachment from the extracellular matrix,  $1 \times 10^6$  tumour cells were incubated for 96 h in a polyHEMA-coated T75 cell culture flask at 37°C. Thereafter, spheroid colonies were carefully incubated with 0.05% trypsin (Gibco, #25300-054). Annexin V-FITC staining was performed according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, #130-092-052). More specifically, cells were washed with 1X Binding Buffer and centrifuged at 300 g for 10 min. The cell pellet was then resuspended in 100 µl Binding Buffer, stained with 10 µl Annexin V-FITC, mixed well and incubated in the dark at room temperature for 15 min. Cells were washed with 1 ml 1X Binding Buffer, centrifuged at 300 g for 10 min, and analyzed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10, Miltenyi Biotec). For distinguishing necrotic cells and late apoptotic cells from early apoptotic cells, propidium iodide was added at a concentration of 1 µg/ml immediately prior to measurement. The experiment was repeated three times independently.

### **Viability assays 3D culture**

#### *Viability assay with ECM attachment*

For analyzing potential effects of ITGA3 knockdown on the viability of spheroid colonies, 40 µl Matrigel (Corning, #356237) at a concentration of 5 mg/ml were added to each well of a pre-cooled, white 96 well plate with clear bottom (Thermofisher Scientific, #165306) and incubated for 30 min at 37°C for polymerization.  $2 \times 10^3$  cells in 4 µl medium were mixed with 46 µl Matrigel, added to the polymerized Matrigel layer, and incubated for another 30 min at 37°C. Subsequently, 100 µl conditioned medium / fresh medium at a ratio of 1:2 was added to each well and incubated for 96 h. Finally, 100 µl of CellTiter Glo 3D (Promega, Walldorf, Germany, #G9681) was added into the wells, incubated on a rocking platform at room temperature for 5 min in the dark, and kept for another 25 min under the same conditions without shaking in order to enhance the luminescence signal. Luminescence intensities were measured in a multimode reader (TECAN GENios, Tecan, Männedorf, Switzerland). Measurements were performed in six replicates and experiments were repeated three times independently.

#### *Viability assay in the absence of ECM*

To determine the viability of spheroid colonies in the absence of ECM,  $2 \times 10^3$  cells in 150 µl medium (conditioned medium / fresh medium at a 1:2 ratio) were added to each well of a black ultra-low attachment Elplasia 96 well plates (Corning, Taufkirchen, Germany, #4446) and

incubated at 37°C for 96 h. 100 µl CellTiter Glo 3D reagent (Promega, #G9681) was added to the wells, plates were incubated on a rocking platform at room temperature for 5 min in the dark, kept under the same conditions for additional 25 min without shaking. Luminescence intensities were measured as above.

### **Adhesion assay to ECM**

Cells were grown in RPMI without FCS one day prior to the start of the experiment.  $3 \times 10^5$  cells in 400 µl serum-free medium were added per well of 24 well plates, pre-coated by the manufacturer (Collagen I (Corning, #354408), Collagen IV (Corning, #354430), Fibronectin (Corning, #354411)). In addition, 24 well plates (Falcon, Taufkirchen, Germany, #353047) were pre-coated with 300 µl laminin V, X and XI (laminin V: Biolamina Sundbyberg, Sweden #LN332-0502; laminin X: Biolamina #LN511-0501; laminin XI: Biolamina #LN521-05) at a concentration of 1 µg/ml and kept overnight at 4°C, with a plate coated with BSA serving as negative control. The plates containing the cell suspension were incubated for 15 - 30 min (depending on the coating) at 37°C, prior to careful washing twice with PBS and incubation with 500 µl HBSS buffer (Gibco, #14025-050) containing 4 µg/ml calcein AM (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany, #564061) for 1 h at 37°C. In presence of calcein AM, relative fluorescence intensities were measured in a microtiter plate reader (TECAN GENios, Tecan Trading AG, Switzerland) at a wavelength of 485/535 nm in bottom reading mode. Measurements were performed in triplicates and experiments were repeated three times independently.

### **Apoptosis assay on laminin**

Annexin V staining was performed to determine whether tumour cells with reduced ITGA3 expression were more likely to undergo apoptosis. For this purpose, control and ITGA3 knockdown cells were seeded into 12 well cell culture plates, with or without prior coating with different laminin heterotrimers (laminin V: Biolamina #LN332-0502; laminin X: Biolamina #LN511-0501; laminin XI: Biolamina #LN521-05). For coating, a stock solution containing 10 µg/ml of each laminin heterotrimer was prepared in DPBS +  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco #14040133). 500 µl of each stock solution were pipetted per well and incubated overnight at 4°C. The supernatant was then carefully removed and  $4 \times 10^5$  cells in triplicates in 1 mL of complete medium were added to the wells, prior to incubation at 37°C for 4 days. Annexin V-FITC staining was performed according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, #130-092-052). For distinguishing necrotic cells and late apoptotic cells from early apoptotic cells, propidium iodide was added at a concentration of 1 µg/ml immediately before measurement. The experiment was repeated three times independently.

### **Migration and invasion assay**

Migration and invasion experiments were performed using 24 well Fluoroblok plates (Corning, #351158) with 8  $\mu\text{m}$  pore size. To evaluate the invasion potential, the inserts of these plates were pre-coated with 40  $\mu\text{l}$  Matrigel (0.5 mg/ml diluted in serum-free RPMI) per well and incubated at 37°C for 45 min, prior to adding  $2.5 \times 10^4$  cells resuspended in 500  $\mu\text{l}$  serum-free medium into the insert wells. 750  $\mu\text{l}$  medium containing 10% FCS was applied as chemoattractant to the bottom wells, followed by incubation at 37°C for 22 h. Subsequently, the contents of the upper wells were removed and the inserts were placed in a new 24 well plate (Corning, Falcon, #353047) containing 500  $\mu\text{l}$  HBSS buffer with 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  calcein AM and incubated for 1 h at 37°C. The fluorescence intensity of the cells underneath the membrane was measured in a microtiter plate reader (TECAN GENios, Tecan, Switzerland) at a wavelength of 485/ 535 nm in bottom reading mode.

### **Proliferation assay on laminin**

To examine proliferation rates, 12 well Nunc plates (Thermo Scientific, #150628) were either left uncoated or pre-coated with 600  $\mu\text{l}$  DPBS containing laminin 332 (Biolamina, #LN332-0502), 511 (Biolamina, #LN511-0502) or 521 (Biolamina, #LN521-05) at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  per well and stored overnight at 4°C. Afterwards,  $5 \times 10^4$  cells were seeded into the wells and incubated for 4 days. Viable cell numbers were then measured using MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Dead cells were excluded by the addition of propidium iodide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Three independent experiments were performed.

### **Colony formation assay**

Matrigel (Corning, #356237) was diluted in ice-cold conditioned medium to a concentration of 5 mg/ml, and mixed with fresh medium containing the respective supplements at a ratio of 1:2. 40  $\mu\text{l}$  diluted Matrigel were added to each well of a 96 well plate (Sarstedt, #83.3924.300) and incubated for polymerization at 37°C for 30 min, in order to prevent cells from growing on the bottom of the plate. 30 cells in 5  $\mu\text{l}$  medium were mixed with 45  $\mu\text{l}$  of Matrigel (5 mg/ml), added onto the polymerized Matrigel layer and incubated for 30 min at 37°C. Finally, 100  $\mu\text{l}$  conditioned medium / fresh medium in a ratio of 1:2 was added to the wells and plates were cultured at 37°C for 10 days. The medium was refreshed every 2-3 days, as appropriate. At d10, images were taken using a light microscope (Primovert, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), colonies from six wells were counted, and diameters of all colonies from three wells were determined thereafter. The experiment was repeated three times independently.

## **Intraperitoneal xenograft mouse model**

All *in vivo* studies were performed using 10 to 14 weeks old BALB/c severe combined immunodeficient (SCID) mice weighing ~25 g at the beginning of the experiment.  $1 \times 10^6$  viable and mycoplasma-free tumour cells suspended in 200  $\mu$ l serum-free RPMI were injected intraperitoneally. The endpoints were evident weight loss (>20% over three days), >0.5 cm<sup>3</sup> tumour size at the injection site, ulceration of the skin above the injection site, or poor general condition, (e.g. due to the development of ascites). After sacrificing the mice, an IP lavage was performed to detect and score the severity of any ascites that may have been developed. In addition, all macroscopically visible metastases were resected from the abdominal cavity, associated to nine quadrants into which the abdomen was divided, and then weighed. In some mice, tumours had also developed at the injection site. These tumours were also resected and their weight recorded. All animal experiments were approved by the local authorities (Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Freie Hansestadt Hamburg) under the project number G15/69.

## **Tumour preparation and analysis**

The harvested peritoneal carcinomatosis samples were further processed in three different ways. One part was embedded in paraffin (see immunohistochemistry), one part was fresh frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C and one part was processed for flow cytometric analysis. In the latter case, tumour samples were either processed directly or stored for a maximum of 48 h in tissue storage solution (Miltenyi, #130-100-008) at 4°C.

### *Immunohistochemistry*

After sacrificing the mice, peritoneal carcinomatosis spots were sampled, fixed in 4% formalin, and embedded in paraffin. 4  $\mu$ m sections were de-paraffinized and stained using the following primary antibodies: ITGA1 (Atlas, #AMAb91460), ITGA2 (Atlas, #HPA063556), ITGA3 (Atlas, #HPA008572), ITGA5 (abcam, #ab150361), ITGA6 (LS\_Bio, #LS\_11070), ITGB1 (abcam, #ab3167), ITGB4 (abcam, #110167), laminin  $\alpha$ 5 (abcam, #ab210957) and CEACAM6 (Thermo Scientific, #MA5-37801). For the Masson-Goldner staining, the deparaffinized slides were stained in Weigert's iron hematoxylin for 4 min. After rinsing, the slides were further incubated in Ponceau acid fuchsin for 5 min and rinsed again in 1% acetic acid. After staining with phosphotungstic acid orange G, slides were rinsed again in 1 % acetic acid, followed by another incubation with plasma dye light green and a final rinsing step in 1 % acetic acid. Stained slides were digitized using an Axio Scan Z1 (Carl Zeiss Microscopy) slide scanner microscope and analysed using the netScope Viewer software. For quantitation, five representative stains of IP carcinomatosis were selected from each group, 10-20 fields of view

were examined per mouse and the mean intensity of all cells per field of view was analyzed using ImageJ.

#### *Ex vivo flow cytometric analysis of xenograft tumour samples*

To generate single-cell suspensions from the harvested xenograft tumours, a tumour dissociation kit (Miltenyi, #130-095-929) was used according to the manufacturer's instructions. The dissociation of tumours was carried out over a period of 1 h in a gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi, # 130-095-937). Afterwards, a mouse cell depletion kit (Miltenyi, #130-104-694) was used according to the vendor's instructions. The resulting cell pellet was stained with nine different integrin antibodies (see flow cytometry) to verify whether knockdown remained stable and integrin counter-regulation had occurred.

#### *RNA isolation from tissues, RNA sequencing and bioinformatics*

Five peritoneal carcinomatosis tissue samples per PDAC xenograft model (Panc89, BxPC-3, PaCa5061, each control vs. ITGA3 knockdown) were selected. For isolation of RNA from xenograft IP carcinosis, tissues were homogenized in TRIzol reagent, followed by chloroform precipitation. The RNA integrity number (RIN) was determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer, with RINs in the range of 5.2 and 9.5. The RNA samples were sent to Novogene (Cambridge, United Kingdom), where an RNA quality check was performed prior to mRNA library preparation (poly A enrichment) and Illumina Sequencing PE150 (9 G raw data per sample). Subsequently, a biostatistical analysis was performed from the data as follows: After verifying integrity of the raw reads by fastqc v0.11.8 (16), they were trimmed by fastp v0.23.2 (17) and mapped to the Ensembl human reference genome GRCh38 with the STAR aligner v2.7.10a (18). Reads were simultaneously counted gene-wise by providing Ensembl annotation version 106 to the *quantMode* option. The resulting count matrix was used to analyze differential gene expression. This was done in the R environment v4.2.0 (19) by the R package DESeq2 v1.36.0 (20). Genes were considered differential expressed when  $\log_2\text{Foldchange} \geq \pm\log(1.5)$  and  $\text{padj} < 0.1$ . Raw RNA-seq files were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under the accession number PRJEB64172.

#### **Data analysis**

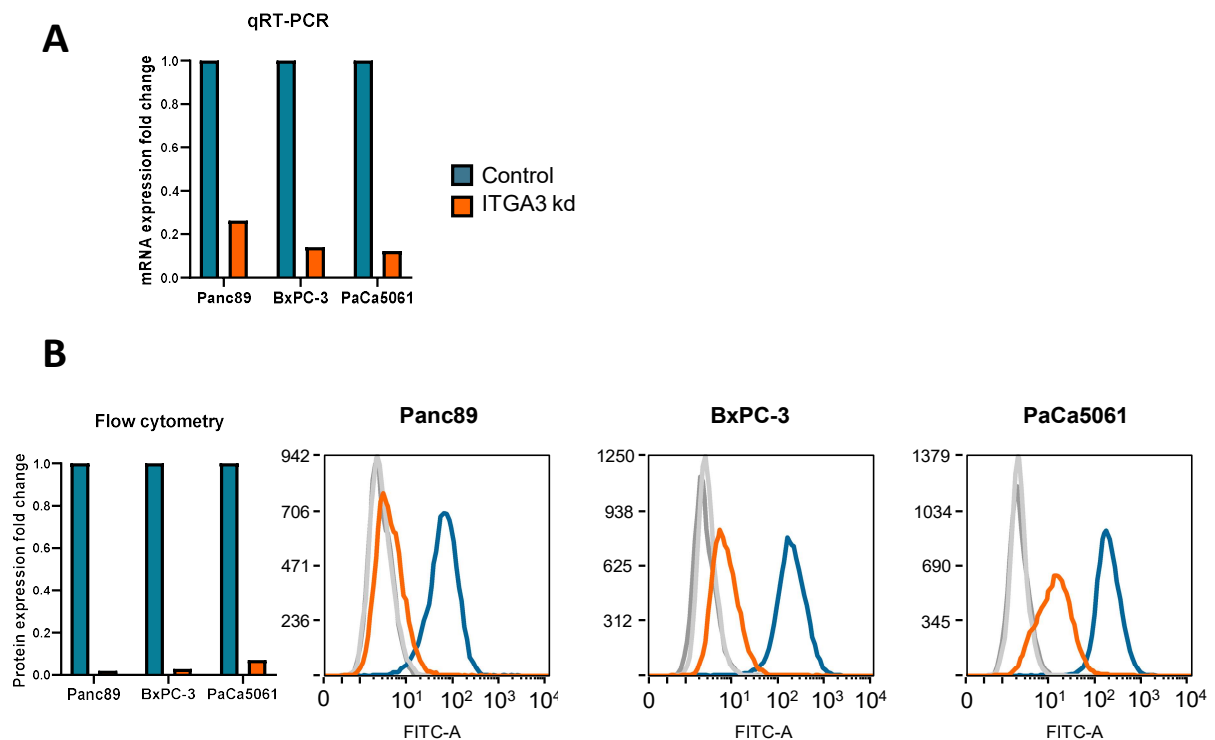
Statistical analyses and graphical representation of data were performed using GraphPad Prism version 9.3.0. The statistical analysis of the Kaplan-Meier survival curves was performed using a log-rank test for curve comparison. Analysis of tumour weights at the injection site and peritoneal carcinomatosis, comparisons for anoikis, adhesion, migration, invasion, proliferation, colony formation and viability assays were carried out using unpaired Student's

t-tests. P values <0.05 were considered significant, with \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 and \*\*\*, p<0.001. Images were processed using the ZEN 3.2 software (Carl Zeiss Microscopy).

## RESULTS

### Establishment of stable shRNA-mediated ITGA3 knockdown

Viral transduction led to a stable ITGA3 knockdown in all three PDAC cell lines. On the mRNA level, ITGA3 expression was downregulated by 74% in Panc89 and by approximately 85% in BxPC-3 and PaCa5061 cells, respectively, compared with control cells (Fig. 1A). Relative cell surface protein levels were found to be even more reduced in all knockdown cell lines, with < 10% residual ITGA3 expression compared with the control cells (Fig. 1B). This finding was verified in total cell extracts by Western blot analysis as well (Supplementary Fig. 1).

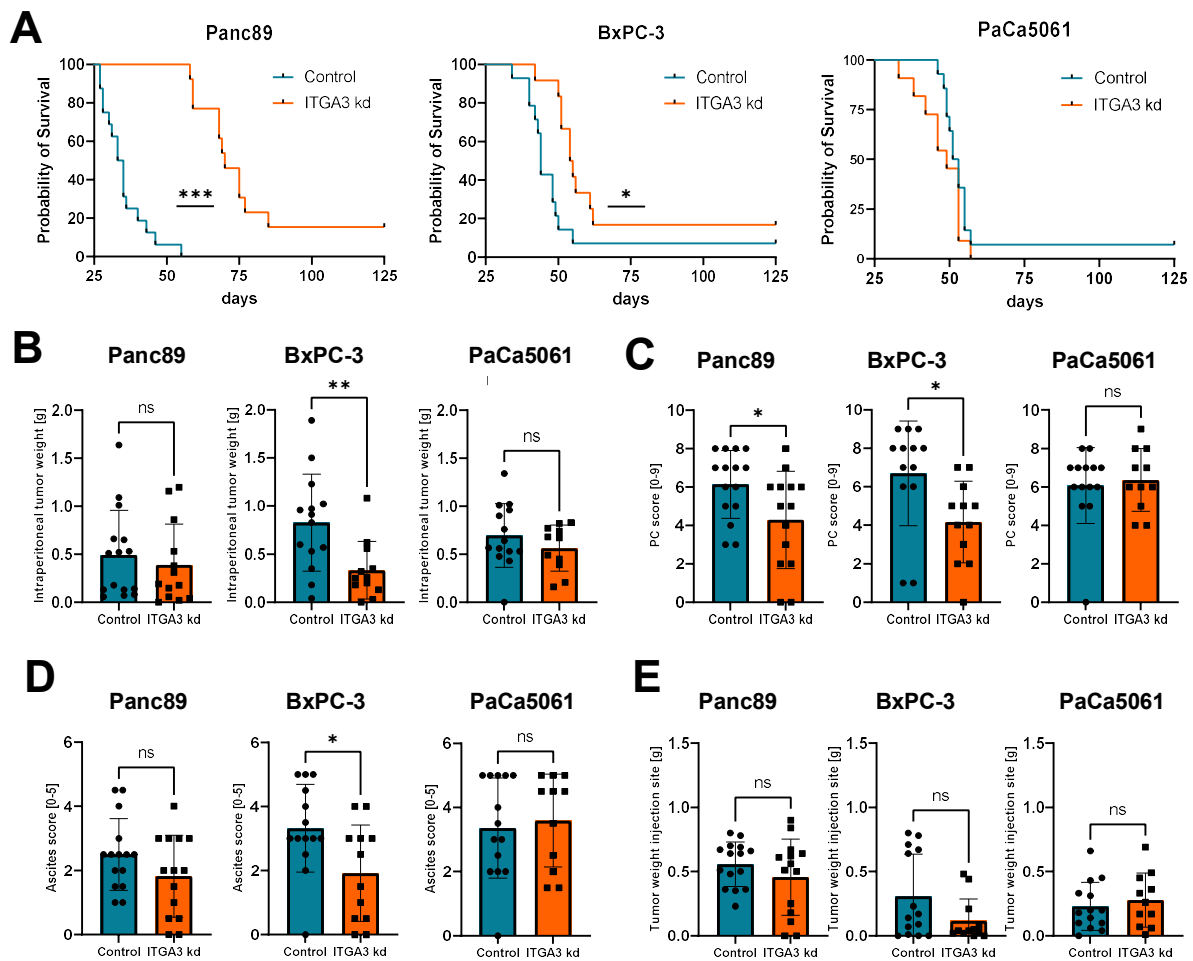


**Figure 1** Reduction of ITGA3 expression due to the RNAi-mediated knockdown in three human PDAC cell lines (Panc89, BxPC-3 and PaCa5061), analysed by qRT-PCR (**A**) and flow cytometry (**B**). ITGA3 in / on cells from cell culture was quantified: on the mRNA level, the expression of ITGA3 was reduced by 74% in Panc89, 85% in BxPC-4 and PaCa5061 for ITGA3 knockdown cells. On the protein level, ITGA3 reduction of >90% was observed in the ITAG3 knockdown cells of all three cell lines by flow cytometry.



## **ITGA3 depletion partially reduces peritoneal carcinomatosis and improves survival of PDAC xenograft mice**

To investigate the potential effect of ITGA3 on the development of peritoneal carcinomatosis, control or ITGA3 knockdown Panc89, BxPC-3 and PaCa5061 cells were injected intraperitoneally into immunodeficient SCID mice (n = 15 per group). Some mice from both groups had to be removed during the experiment due to lymphoma development (as commonly observed in SCID mice) and were not considered for further analyses (Panc89: one mouse from control group; BxPC-3: one mouse from control group and three from ITGA3 knockdown group; PaCa5061: one mouse from control group and four from ITGA3 knockdown group). Notably, ITGA3 knockdown significantly improved the survival of mice in the case of the Panc89 and BxPC-3 xenografts and hence in two out of three tested models. Mice injected with Panc89 ITGA3 knockdown cells survived on average 42.5 days longer compared with negative control cells ( $p=0.0001$ ), while in the BxPC-3 model an average increase in survival by 15 days was observed ( $p=0.0102$ ). In contrast, no survival benefit upon ITGA3 knockdown ( $p=0.1924$ ) was detected in PaCa5061 (Fig. 2A). In the BxPC-3 model, the mean IP tumour weight at necropsy was found to be significantly decreased in the ITGA3 knockdown group as well (control: 0.83 g, ITGA3 knockdown: 0.33 g,  $p=0.0065$ ), while in the two other cell lines, the resulting peritoneal carcinosis weight did not differ (Panc89  $p=0.5493$ ; PaCa5061  $p=0.2836$ , Fig. 2B). However, in both models the finding of prolonged mouse survival was in line with the degree of tumour dissemination within the peritoneal cavity, as determined by the IP carcinomatosis score. In the mice injected with Panc89 control cells, metastases spread was significantly reduced upon ITGA3 knockdown to an average of only 4.19 quadrants of the peritoneal cavity, compared with 6.13 out of 9 possible quadrants in the mice injected with the negative control cells ( $p=0.0297$ ). Likewise, the IP spread in mice injected with BxPC-3 ITGA3 knockdown cells yielded an average IP score of only 4.17 quadrants whereas control BxPC-3 cells affected 6.69 quadrants ( $p=0.0171$ ). Again, no difference was found in the PaCa5061 model (Fig. 2C). Another indicator of IP carcinosis is the development of malignant ascites, prompting us to determine an ascites score from each mouse ranging from 0 (no malignant ascites) to 5 (highest degree of malignant, bloody ascites). The ascites score in the BxPC-3 model was significantly lower in the ITGA3 knockdown group compared with the control group ( $p=0.0199$ ) and slightly lower in the Panc89 group ( $p=0.1393$ ), while again no difference was observed in the PaCa5061 model ( $p=0.7048$ , Fig. 2D). Similarly, a trend towards smaller tumour weights at the injection site was found in the BxPC-3 and the Panc89 model, without reaching statistical significance (Panc89:  $p=0.2666$ ; BxPC-3:  $p=0.0828$ ; PaCa5061:  $p=0.5384$ ; Fig. 2E).

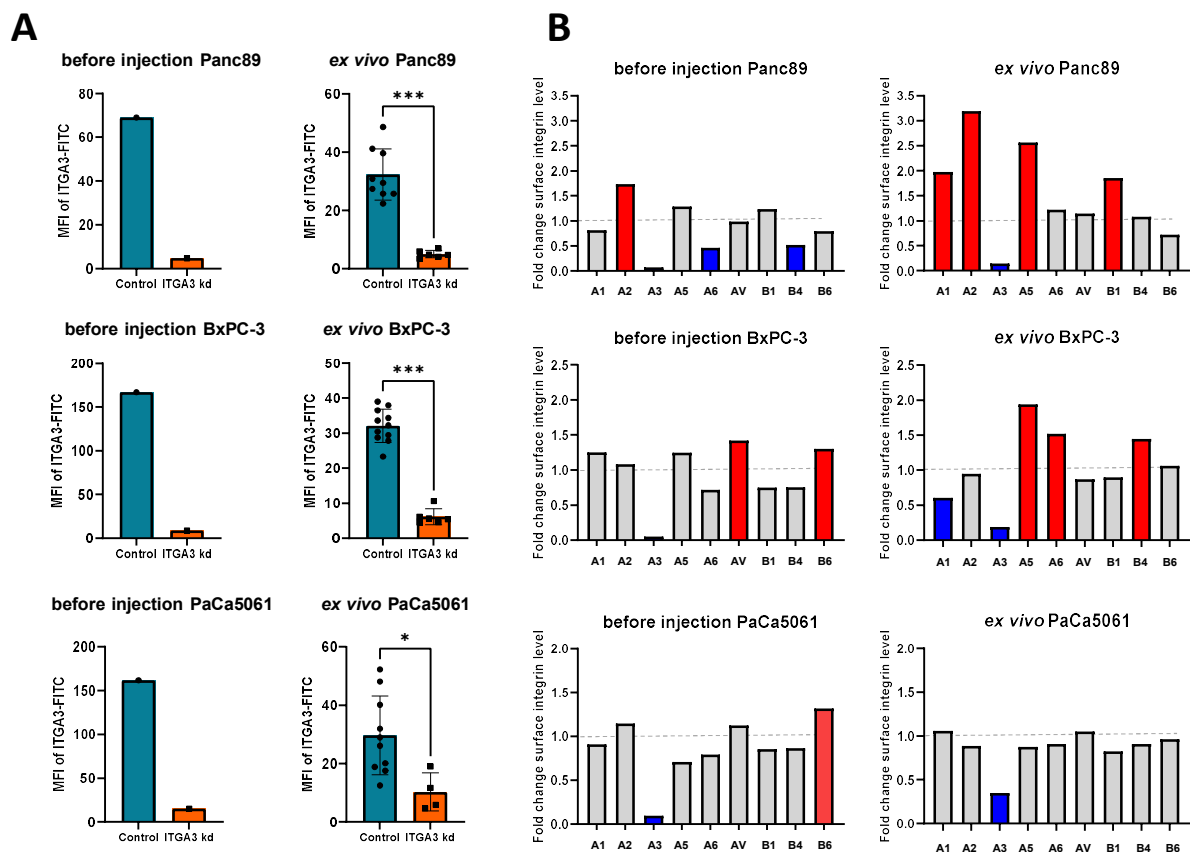


**Figure 2** In a xenograft model, ITGA3 knockdown of Panc89 ( $p=0.0001$ ) and BxPC-3 ( $p=0.0102$ ) cells led to a significant increase in survival compared with mice injected with control cells. No survival benefit was observed with PaCa5061 cells ( $p=0.1924$ ). For Panc89, mice of the ITGA3 knockdown group survived an average of 42.5 days longer than mice from the control group, and for BxPC-3 cells, a 15 days increase was observed (**A**). The total mass of IP carcinosis did not differ in the ITGA3 knockdown group of Panc89 ( $p=0.5493$ ) and PaCa5061 ( $p=0.2836$ ) cells compared with the respective control group. In the case of the BxPC-3 group, mice injected with ITGA3 knockdown cells developed significantly less IP carcinosis ( $p=0.0065$ , **B**). In Panc89 ( $p=0.0297$ ) and BxPC-3 cells ( $p=0.0171$ ), IP carcinomatosis upon ITGA3 knockdown spread to significantly less areas of the peritoneal cavity compared with mice injected with control cells. No difference was observed in PaCa5061 cells ( $p=0.6964$ , **C**). The development of malignant ascites was significantly reduced only in the ITGA3 knockdown group of the BxPC-3 cells compared with the control group ( $p=0.0199$ ), but not in Panc89 ( $p=0.1393$ ) and PaCa5061 cells ( $p=0.7048$ , **D**). For all three cell lines, the weights of tumours on injection site did not differ between the ITGA3 knockdown and the control group (Panc89:  $p=0.2666$ ; BxPC-3:  $p=0.0828$ ; PaCa5061:  $p=0.5384$ , **E**). \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ .

### Integrin subunit levels in peritoneal carcinomatosis samples

After sacrificing the mice, ITGA3 expression in the peritoneal carcinomatosis samples was determined by flow cytometry and compared with results in the cells prior injection. In the respective knockdown groups, ITGA3 was found to be still reduced by 84% in the Panc89 peritoneal carcinomatosis samples ( $p<0.001$ ), 81% in the BxPC-3 model ( $p<0.001$ ) and 65%

in the PaCa5061 model ( $p=0.0192$ , Fig. 3A), indicating sustained reduction of ITGA3 levels in vivo. When a particular integrin subunit is down-regulated, (counter-) regulation of other integrin subunits may occur, resulting in either higher or lower integrin levels. Therefore, we analysed eight different subunits by flow cytometry for alterations upon ITGA3 knockdown vs. negative control. Cells before tumour cell injection as well as explanted peritoneal carcinomatosis samples ('*ex vivo*') were analysed. Overall, alterations were found to be moderate and remained, with a very few exceptions, below a factor 2-fold (Fig. 3B). Still, integrin subunits that were more than 30% up- or down-regulated were validated by IHC on *ex vivo* tumour samples. Results confirmed an upregulation of ITGA1, ITGA2, ITGA5 and ITGB1 in the Panc89 model and of ITGA5, ITGA6 and ITGB4 in the BxPC-3 model (representative images shown in Supplementary Fig. 2).



**Figure 3** Stability of the ITGA3 knockdown in the xenografts tumours was verified *ex vivo* using flow cytometry: in Panc89 cells, ITGA3 was reduced by 93% relative to control cells before injection and by a mean of 84% in the explanted tumours ('*ex vivo*') ( $p<0.001$ ), in BxPC-3 cells by 95% before injection and by a mean of 81% *ex vivo* ( $p<0.001$ ), and in PaCa5061 cells by 91% before the injection and by a mean of 65% *ex vivo* ( $p=0.0192$ , **A**). Before PDAC cell injection as well as *ex vivo*, flow cytometry was used to analyzed whether counter-regulation of other integrin subunits had occurred as a result of ITGA3 knockdown. In **B**, the relative surface integrin level of the control cells is set to 1.0 (dashed line), with bars showing alterations in the knockdown cells. When the respective integrin subunits (A1: ITGA1, A2: ITGA2, ...) were up- or downregulated by >30% upon ITGA3 knockdown, the bars are shown in red or in blue, respectively. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ .

## Immunohistochemical analyses of peritoneal carcinomatosis and gene expression data

Sustained ITGA3 knockdown in the explanted peritoneal carcinomatosis samples ('*ex vivo*') was also found in IHC. For quantification, the percentage of positive staining was determined. In all three xenograft models, ITGA3 expression was significantly reduced in the knockdown group (Panc89  $p < 0.0001$ ; BxPC-3  $p < 0.0001$ ; PaCa5061  $p < 0.0001$ , Fig. 4). Notably, IHC further revealed that laminin  $\alpha 5$  expression in the peritoneal metastases decreased significantly in the ITGA3 knockdown groups of all three PDAC xenografts (Panc89:  $p < 0.0001$ ; BxPC-3:  $p < 0.0001$ ; PaCa5061:  $p < 0.0001$ ; Fig. 4). Masson-Goldner staining further showed that the ratio of tumour cells (red) to stromal tissue (blue-green) decreased significantly in the ITGA3 knockdown groups (Fig. 4).

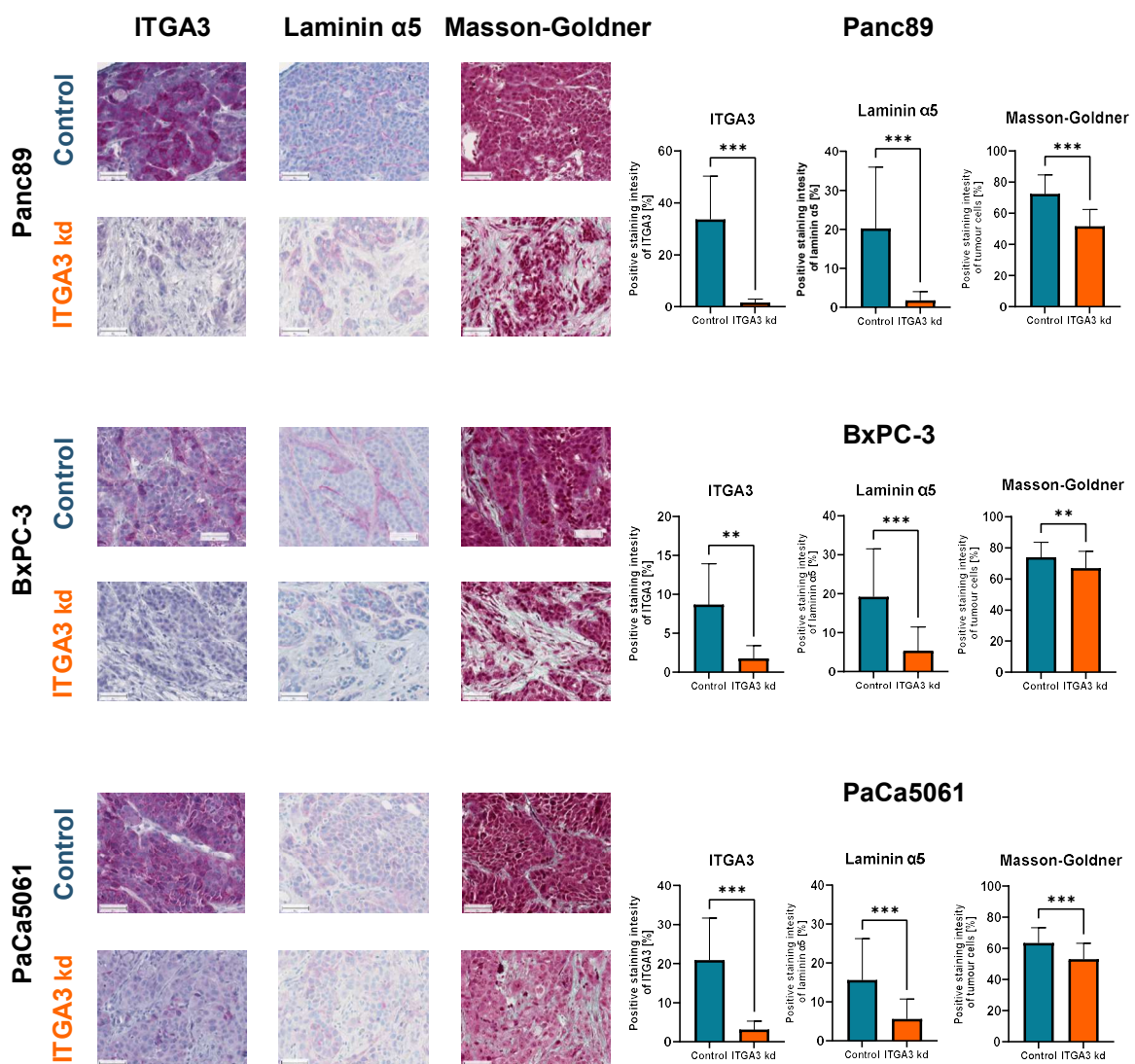


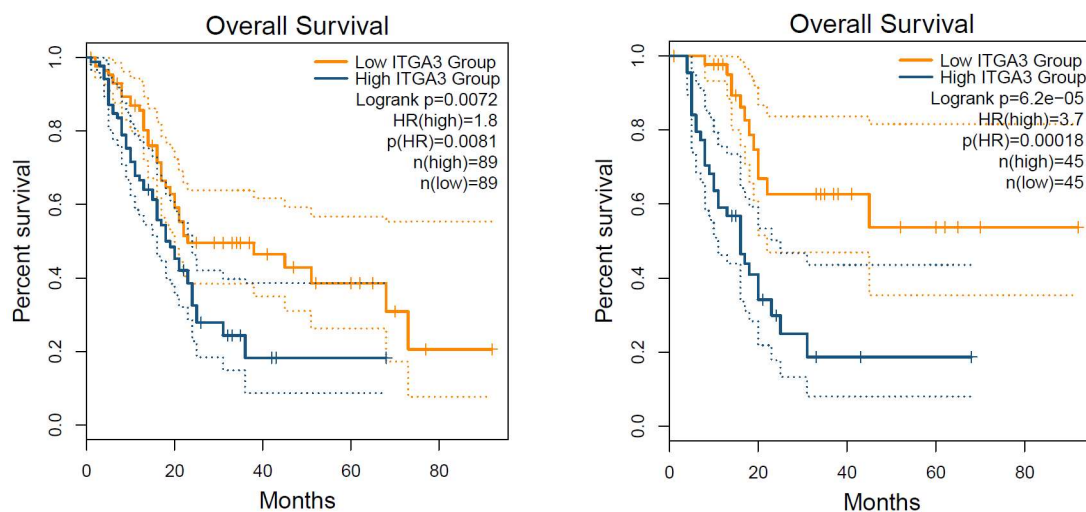
Figure 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 4** Immunohistochemical staining of ITGA3 in IP carcinomatoses showed a significant reduction of ITGA3 in the ITGA3 knockdown group compared with the control group in all three models (Panc89 and PaCa5061:  $p < 0.001$ ; BxPC3:  $p = 0.0036$ ). Laminin X (LN X) was also found to be significantly reduced in mice injected with the ITGA3 knockdown cells (Panc89, BxPC-3 and PaCa5061:  $p < 0.001$ ). Masson-Goldner staining revealed more tumour tissue (red) than stromal tissue (blue-green) in the IP carcinomas of the controls which was reversed in the ITGA3 knockdowns (more stroma (blue-green) than tumour (red)); FRINPanc89 and PaCa5061:  $p < 0.001$ ; BxPC3:  $p = 0.0011$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### Role of ITGA3 for PDAC patient survival

Based on the mouse survival curves, it was examined next whether high ITGA3 expression also plays a role in the survival probability of patients diagnosed with PDAC. Using the TCGA database via Gepia2 ([gepia2.cancer-pku.cn](http://gepia2.cancer-pku.cn)), the overall survival of 50% patients with high vs. 50% of patients with low ITGA3 expression (median group cutoff) was compared. A hazard ratio (HR) of 1.8 was found, significantly favouring patients with low ITGA3 expression ( $p = 0.0081$ ). Regarding the 25% patients with the highest and the lowest ITGA3 expression, respectively (quartile group cutoff), the HR was 3.7 and thus highly significant ( $p = 0.00018$ , Fig. 5).



**Figure 5** Using TCGA data via the Gepia2 site ([gepia2.cancer-pku.cn](http://gepia2.cancer-pku.cn)), the relation between ITGA3 expression and survival probability was examined in patients diagnosed with PDAC. At the median group cutoff (top panel), there was a HR of 1.8, resulting in a significant survival advantage for patients with low ITGA3 expression ( $p = 0.0081$ , and at the quartile group cutoff, there was a HR of 3.7, showing a highly significant difference ( $p = 0.00018$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### Transcriptome analysis

To investigate possible mechanisms underlying the survival advantage and reduced peritoneal carcinomatosis upon ITGA3 knockdown in the Panc89 and BxPC-3, but not in the PaCa5061

xenografts, RNA sequencing was performed. The RNA sequencing data of IP carcinosis samples showed many differentially expressed genes (DEGs) in Panc89 and BxPC-3 xenografts upon ITGA3 knockdown. In contrast, only few genes were regulated in PaCa5061 xenografts (Fig. 6A). In detail, 574 DEGs were downregulated in Panc89, 2044 DEGs were downregulated in BxPC-3, but only 12 DEGs were downregulated in PaCa5061 (FDR <0.1, log<sub>2</sub>FC < -log<sub>2</sub>(1.55)). Panc89 and BxPC-3 displayed 496 DEGs with overlapping down-regulation (Fig. 6B). Similarly, ITGA3 knockdown also resulted in the upregulation of DEGs. More specifically, 829 DEGs were upregulated in Panc89, 1475 DEGs were upregulated in BxPC-3, while again only 7 DEGs were upregulated in PaCa5061, with an FDR <0.1 and log<sub>2</sub>FC < -log<sub>2</sub>(1.55). An overlap of 658 DEGs was found for Panc89 and BxPC-3 (Fig. 6B).

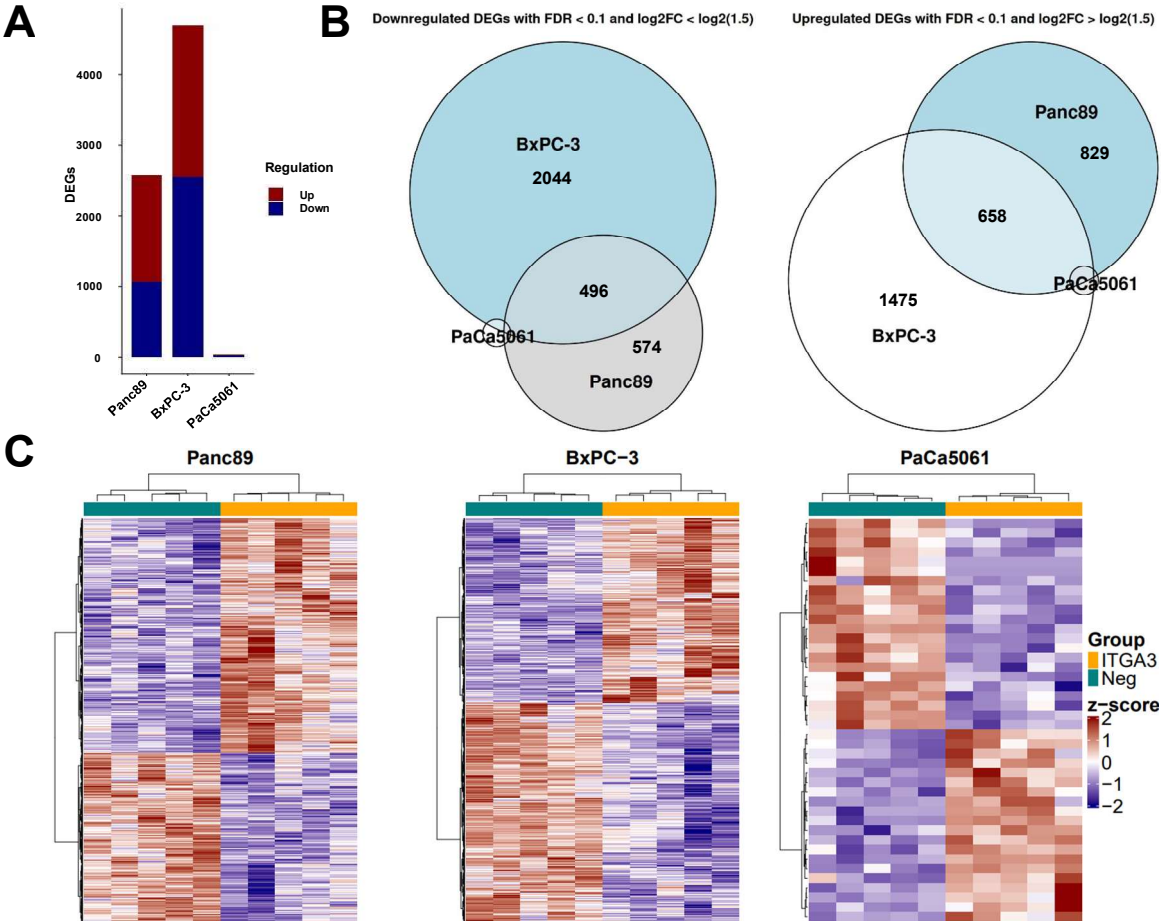
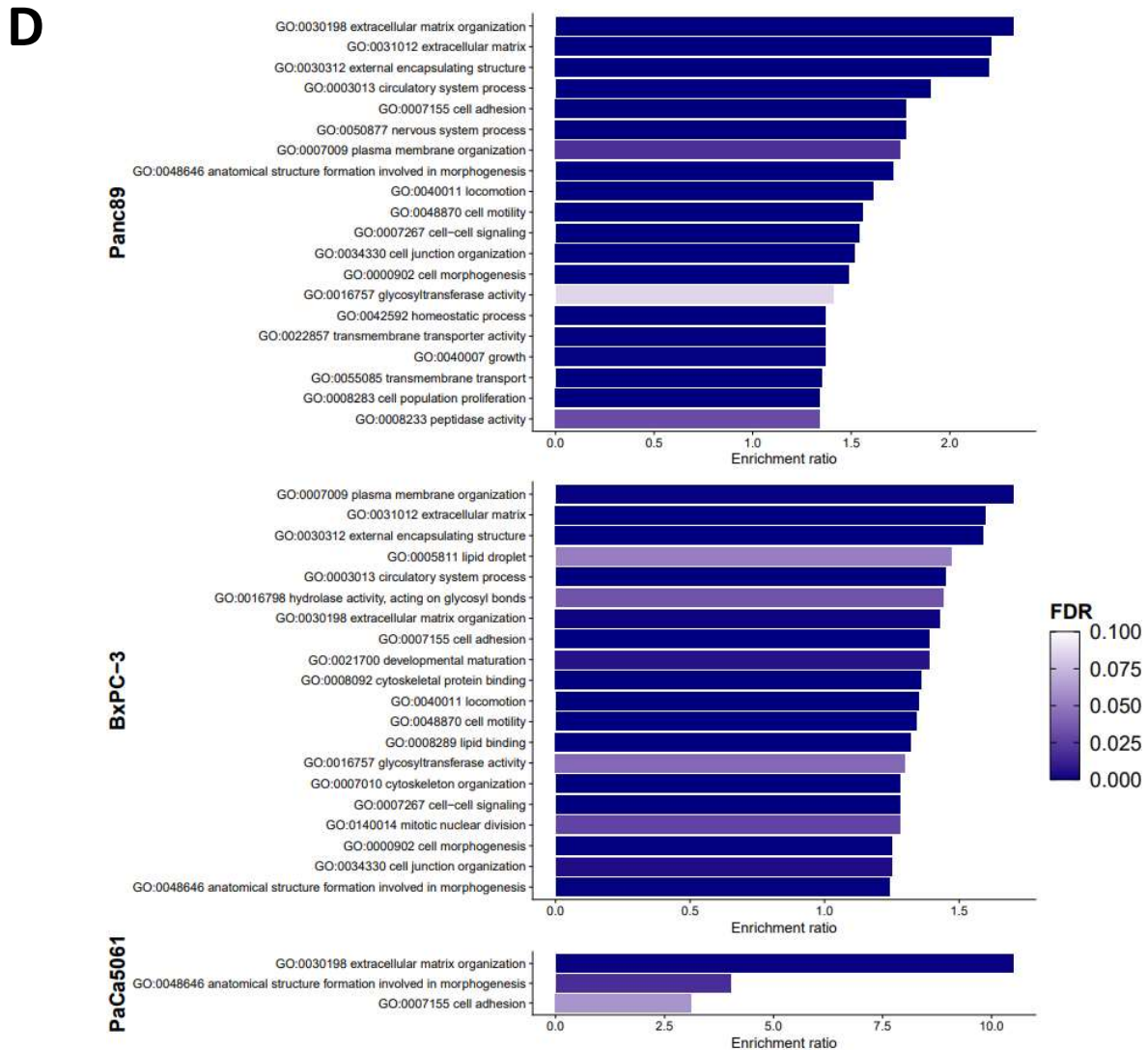


Figure 6 (See continuation of figure on next page.)



(See beginning of figure on previous page.)



**Figure 6** Overview of differentially expressed genes (DEGs) in IP carcinosis (ITGA3 knockdown vs. ITGA3 normal expression) of all three PDAC cell lines and their up- or downregulation (A). Downregulated and upregulated DEGs (ITGA3 low vs. ITGA3 normal expression) and their overlap (B). Heat maps showing expression patterns of Panc89, BxPC-3, and PaCa5061 genes with significantly differential expression in at least one comparison (C). Over-Representation Analysis (ORA) of all three PDAC cell lines (D).

Next, we compared this overlap of up- or down-regulated DEGs in Panc89 and BxPC-3 with data from patients diagnosed with PDAC, with high versus low ITGA3 expression (Tab. 1). Because the patient data include both stromal and tumour cell RNA fractions and the involvement of tumour cells in the changes is thus not as clear as in the xenograft sequencing data, which include only the fraction of (human) tumour cells, but not the fraction of (murine) stroma, we included in Table 1 all DEGs with a p value <0.05, an FDR of <0.1, and a  $\log_2FC < -\log_2(0.5)$  (all fold changes for Panc89 and BxPC-3 were  $< -\log_2(0.7)$ ). Apart from ITGA3 itself, 13 downregulated DEGs and 12 upregulated DEGs were identified by this approach. Notably,

the only DEG meeting these criteria in the PaCa5061 xenograft samples was ITGA3. Interestingly, 10 out of 25 of the genes identified above as overlapping between patients and mouse models were significantly prognostic (log rank <0.05) for the survival of patients diagnosed with PDAC (quartile group cutoff, TCGA database via Gepia2 (gepia2.cancer-pku.cn)). The upregulated DEGs in Tab.1 indicated an increased survival probability at high expression in the patients' tumours whereas the downregulated DEGs indicated decreased survival upon high expression (Supplementary Figure 3).

Based on the above results, one candidate, CEACAM6, an important gene in PDAC (see Discussion below), was examined in more detail. Immunohistochemical staining of sections of IP carcinomatosis nodules showed a trend towards decreased CEACAM6 expression in the ITGA3 knockdown group of the BxPC-3 model compared with the negative control (Fig. 7, lower panel; p=0.1336). A more profound CEACAM6 reduction with a significance of p=0.0001 was determined in the Panc89 model (Fig. 7, upper panel).

**Table 1** Differential gene expression in patients' primary tumours with low vs. high ITGA3 expression (TCGA-PAAD cohort) as well as Panc89 and BxPC-3 xenograft models. DEGs with expression alterations in both, Panc89 and BxPC-3 xenografts, are shown in comparison with patient data (high vs. low ITGA3) and PaCa5061. Genes in **bold black** are prognostic for patient survival (quartile cut-off). All numbers are given as the log2 fold changes.

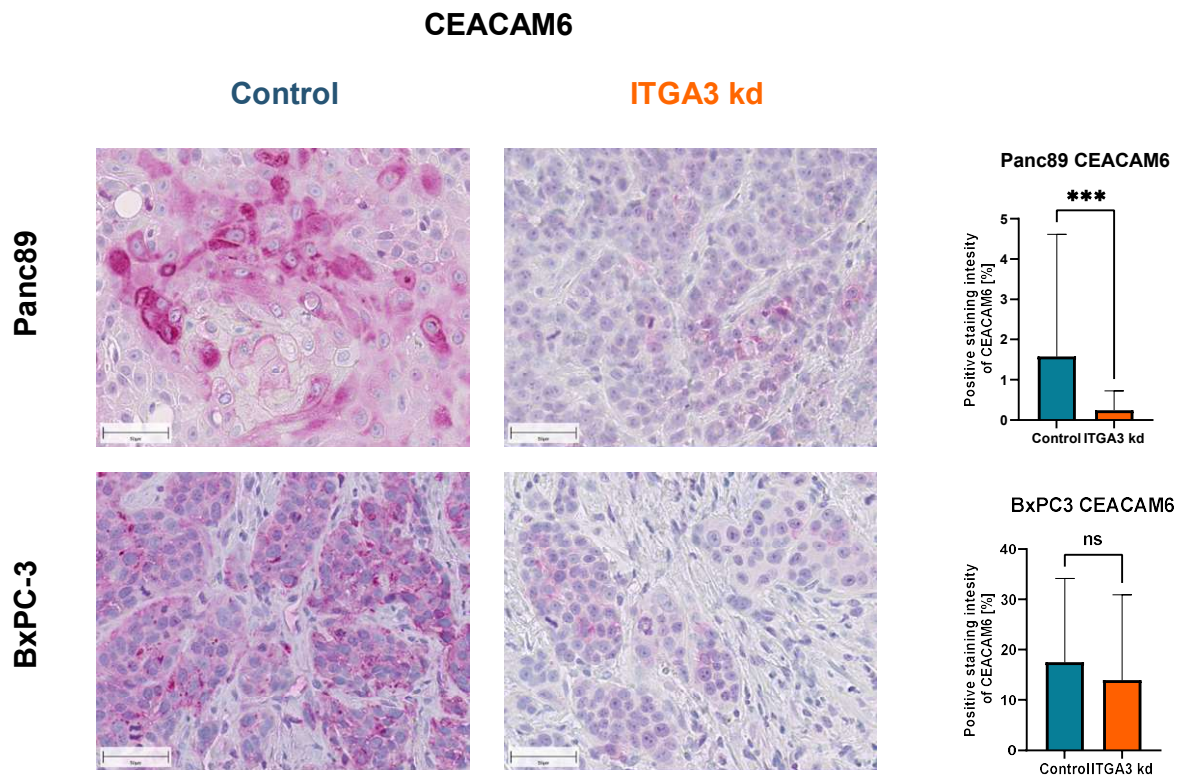
Gene	Patients	Panc89	BxPC-3	PaCa5061
ACHE	-0.70541	-0.79419	-0.93130	0.32695
<b>ANKRD22</b>	-0.64493	-1.15808	-0.73668	-0.48173
<b>AP1S3</b>	-1.03568	-0.62473	-0.90459	0.21753
<b>CEACAM6</b>	-0.54347	-1.02894	-2.00501	0.35599
CRACR2B	-0.51766	-0.90398	-1.48981	-0.04956
<b>CXCL17</b>	-0.94120	-0.92211	-1.40912	-0.06109
<b>HTR1D</b>	-0.52220	-0.74982	-1.64114	0.20563
<b>ITGA3</b>	-1.75142	-1.61987	-0.71708	-1.09664
<b>KRT13</b>	-3.31684	-0.84205	-1.03389	-0.01694
MOGAT2	-0.92056	-1.14391	-2.15986	-0.18835
<b>MUC4</b>	-1.09947	-1.12435	-2.46782	0.35662
<b>PIK3C2G</b>	-0.88134	-1.40944	-1.31858	-0.37657
S100A5	-0.60327	-0.82531	-1.04244	-0.15051
VSIG2	-0.81281	-1.14230	-2.12486	0.31084

(See continuation of table on next page.)



**Table 1** (See beginning of table on previous page.)

ASCL5	0.57659	1.54479	1.30622	-0.00311
<b>CCDC40</b>	<b>0.50658</b>	<b>0.90957</b>	<b>0.71727</b>	<b>0.10546</b>
CHST2	0.52056	1.14875	2.61325	-0.54022
DISP2	0.57883	0.71766	1.83487	0.06882
DNER	0.66809	0.95411	3.59953	0.34138
FSTL5	0.73787	1.90138	1.27460	nd
GAST	4.30850	0.97307	2.24970	-0.16188
GFPT2	0.52007	1.16154	2.02411	-0.05396
IL1R1	0.56078	1.81552	0.81220	-0.12123
POPDC3	0.54028	1.12470	2.56791	nd
SMOC1	1.00387	1.56365	1.12776	0.08560
<b>SNAP25</b>	<b>2.30842</b>	<b>1.12038</b>	<b>1.40258</b>	<b>-0.58230</b>



**Figure 7** Immunohistochemical staining of CEACAM6 in the peritoneal metastases of Panc89 and BxPC-3 with a representative image on the left and the quantitative evaluation on the right.  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

## ***In vitro* analysis of the functional role of ITGA3 in individual steps of peritoneal carcinomatosis / metastasis**

### *Viability of tumour cells floating in the peritoneal cavity (ECM-detached)*

Anoikis occurs when epithelial tumour cells are detached from the ECM (intrinsic apoptosis). Under certain circumstances, tumour cells can survive without their ligation to the ECM, which is called anoikis resistance. On poly HEMA-coated cell culture flasks, differences in viable, necrotic, early and late apoptotic cells were either not statistically significant and/or small in absolute numbers. The only exception was the cell line BxPC-3 which displayed a threefold increase in early apoptotic cells (Supplementary Fig. 4A).

In another approach to study anoikis resistance, colony formation on an ultra-low attachment plate was analyzed. Panc89 and BxPC-3 colonies with normal ITGA3 expression showed significantly more viable cells within the colonies compared with their ITGA3 knockdown counterparts (Panc89:  $p=0.003$ , BxPC-3:  $p<0.001$ ). In contrast, no significant differences in the number of viable cells within PaCa5061 cell colonies was found ( $p=0.698$ , Fig. 8A).

### *Adhesion to submesothelial stroma (ECM attachment)*

Once the tumour cells start interacting with the mesothelium, they invade into the submesothelial stroma. Consequently, integrins expressed on the tumour cell surface can directly interact with the components of the extracellular matrix within the stroma. To investigate the effects of ITGA3 on the adhesion ability to ECM components (ITGA3 is a laminin-binding Integrin), an *in vitro* study was performed on laminin V, laminin X, laminin XI, collagen I, collagen IV, and fibronectin. Adhesion of all three PDAC cell lines onto laminin V, X and XI was significantly reduced upon ITGA3 knockdown. In contrast, the ITGA3 knockdown cells displayed overall only marginal changes (compared to the controls) in their ability to adhere to other ECM components such as to Col I, Col IV, or fibronectin (Fig. 8B).

### *Laminin-dependent apoptosis assay*

In the next step, we investigated whether tumour cells adhering onto laminin components undergo increased apoptosis upon decreased ITGA3 expression. For cell lines Panc89 and BxPC3, a tendency towards increased apoptosis upon ITGA3 knockdown was observed on uncoated and laminin coated surfaces; however, the percent changes in the proportion of apoptotic cells were in the low single-digit range. For PaCa5061 cells, no such tendency was found (Supplementary Fig. 4 B).

### *Migration and invasion*

In all three PDAC cell lines, the migratory ability was slightly, but significantly enhanced after ITGA3 knockdown (Fig. 8C). In contrast, the ITGA3 knockdown cells of the Panc89 ( $p=0.029$ ) and BxPC-3 cell lines ( $p<0.001$ ) showed significantly less invasive potential. In the PaCa5061 cell line, however, the invasive potential significantly increased upon ITGA3 knockdown ( $p=0.003$ , Fig. 8C).

### *Proliferation and colony formation*

Similar to the apoptosis assay, we examined whether ITGA3 knockdown in PDAC cells affects cell proliferation on an uncoated cell culture surface or on a substrate coated with three different laminin heterotrimers (LN V, LN X, LN XI). In case of Panc89 control cells with normal ITGA3 expression, proliferation was found increased on laminin-coated substrates vs. uncoated plates. In Panc89 and BxPC-3 cells, ITGA3 knockdown impaired cell on the uncoated surface. This was also seen on the laminin-coated substrates. No alterations of proliferation rates were found in PaCa5061 cells (Supplementary Fig. 4C).

Single tumour cells in contact to the ECM are often able to form large spheroid colonies within a few days. To examine the relationship between ITGA3 expression and the formation of such colonies, a small number of single cells were embedded in Matrigel for colony formation, prior to counting colonies and determining their diameters. In the case of the cell lines Panc89 and BxPC-3, ITGA3 knockdown cells formed significantly smaller colonies as compared to their negative control counterparts (Panc89;  $p=0.004$ , BxPC-3  $p<0.001$ , Fig. 8D). Additionally, Panc89 colony numbers growing in Matrigel were significantly reduced. PaCa5061 cells were not able to form colonies after seeding at low cell numbers and thus excluded from this assay. Additionally, 3D colony viabilities were tested. In this experiment, a larger number of tumour cells was embedded in the Matrigel. Under these conditions, PaCa 5061 cells formed colonies as well. In these and in the BxPC-3 cells, a slight but significant decrease in colony viabilities was observed upon ITGA3 knockdown. Results were more profound in Panc89 cells: besides forming more colonies with larger diameters, the colonies developed from control cells with normal ITGA3 level also showed substantially more viable cells as compared to the ITGA3 knockdown cells (Fig. 8E).

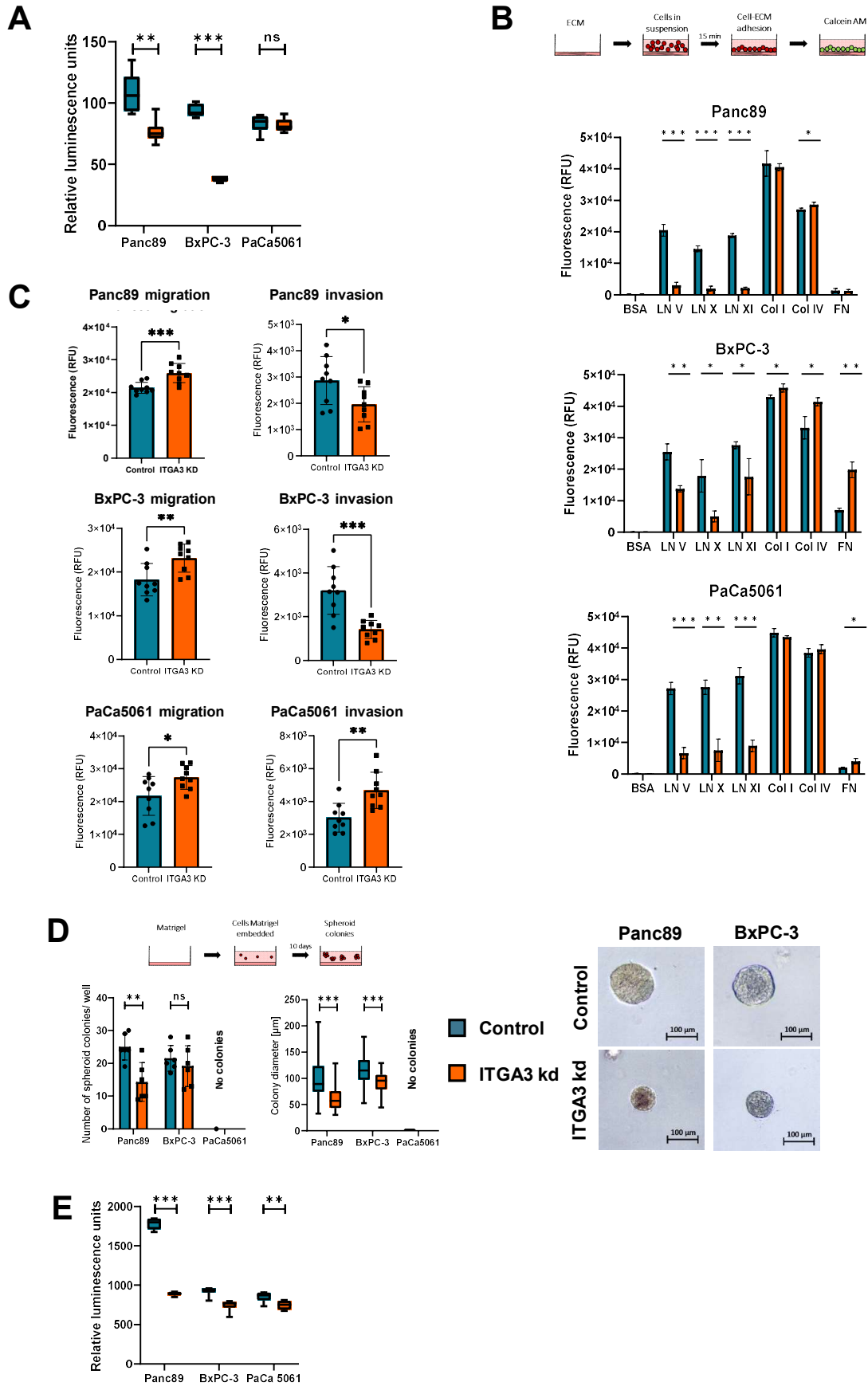


Figure 8 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 8** PDAC cells were cultured on ultra-low attachment Elplasia plates for 96 h and subsequently the viability of colonies was determined by Cell Titer Glo 3D (**A**). In the adhesion assay, static cell- ECM adhesion is shown after the incubation for 15 min on different, coated substrates: BSA, LN V, LN X, LN XI, Col I, Col IV and FN (**B**). The migration and invasion potential on fluoroblok plates after 96 h (**C**). Colonies formed in matrigel for ten days. These colonies were counted per well and diameters determined. No viable colonies had developed in PaCa5061 cells. Representative images for colony formation of Panc89 and BxPC-3 cells are shown (**D**). Over 96 h, colonies also formed in Matrigel and the viability of these colonies was determined using Cell Titer Glo 3D (**E**). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

## DISCUSSION

In this study, we demonstrate that the down-regulation of ITGA3 in PDAC cells resulted in a survival benefit *in vivo*. Furthermore, we were able to show that the reduction of ITGA3 diminished the development of IP carcinomatosis, the spread in the peritoneal cavity and the formation of malignant ascites. Taken together, these findings constitute the first direct evidence that ITGA3 is functionally involved in increasing PDAC aggressiveness. Other studies have already demonstrated that ITGA3 might be a crucial gene in pancreatic cancer: high ITGA3 expression has been shown to be associated with poor overall survival as well as unfavourable outcomes of chemo- or immunotherapy (14, 21). Interestingly, we observed this strong effect of ITGA3 knockdown only in two out of three cell lines tested, which also reflects the clinical situation: most patients who survive longer than five years after diagnosis have an ITGA3 low status, but not all ITGA3 low patients survive that long (9, 14; Fig. 5). If this is related to minor differences in expression levels in the ITGA3 low group, with longest surviving patients showing the lowest ITGA3 expression levels, remains to be elucidated. The findings of Jiao et al. who could demonstrate that ITGA3 expression was a significant and independent prognostic factor for overall survival and relapse-free survival in a multivariate analysis strongly support this hypothesis (14). In line with this, somewhat higher residual ITGA3 levels in the PaCa5061 knockdown cells, may contribute to the lack of peritoneal carcinomatosis inhibition. It should be noted, however, that other factors may be involved as well, like integrin alpha-V (ITGAV) which we described previously as functionally relevant in PDAC IP carcinomatosis (10).

Still, the overall major impact of ITGA3 is also supported by several corresponding effects of its knockdown in Panc89 and BxPC-3 cells: beyond profound *in vivo* effects, adhesion and proliferation on different laminin heterotrimers were reduced due to ITGA3 knockdown, which also led to higher apoptosis rates, reduced invasion and impaired formation of cell colonies (ECM attached or without the presence of ECM components). In contrast, PaCa5061 displayed no clear picture in the *in vitro* studies mentioned above.

The tight desmoplastic stroma of PDAC, which is rich in ECM components, is a crucial factor for determining the aggressiveness and treatability of PDAC (22). Thus, the high ECM content promotes not only tumour proliferation, migration, and invasion, but also acts as a barrier for therapeutic agents (22-26). In the xenograft model, the stable reduction of ITGA3 had a direct impact on the expression of the major ligand LN X and on the composition of the tumour-associated stroma in all three PDAC cell lines. Due to the ITGA3 knockdown, the stromal component in the IP carcinomas increased, despite the significant decrease of stromal laminin  $\alpha 5$ . That the ratio of tumour cells to stroma is lower in the peritoneal carcinomatoses of the ITGA3 knockdown group also indicates less aggressive / metastatic tumour growth. The fundamental restructuring of tumour stroma due to reduced ITGA3 expression by tumour cells may provide improved efficacy and delivery of chemotherapeutic drugs, especially as ITGA3 expression has been shown to have negative impact on chemotherapy outcome in PDAC (21, 27).

ITGA3 knockdown also affected the expression of other genes with putative or established relevance: our RNA sequencing data show that several genes were up- or down-regulated upon ITGA3 knockdown in both, Panc89 and BxPC-3 IP tumours. In particular, it could be shown that CEACAM6 is downregulated on the transcriptome and on the protein level (IHC) in Panc89 and BxPC-3 tumours (Table 1, Fig. 7). Notably, this was in line with the differential gene expression data of patients diagnosed with PDAC, where reduced CEACAM6 expression in ITGA3 low patients was found as well. CEACAM6 is upregulated in many tumour entities, including pancreatic cancer (28-31), which leads to increased tumour progression, proliferation, invasion, migration in PDAC and is thus associated with a decreased probability of survival (32-35). Other studies have already shown that integrins, such as ITGAVB3, may be in crosstalk with CEACAM6 and thus enhance attachment to ECM components (36, 37). Our xenograft model clearly demonstrates that ITGA3 is not only co-regulated with CEACAM6, but functionally involved in maintaining the CEACAM6 high phenotype, since ITGA3 knockdown led to the downregulation of CEACAM6. Of note, 10 out of the 25 genes which we found concordantly regulated in our xenografts and in patients have been established already as prognostic for patient survival. This observation further highlights that ITGA3 is functionally involved in maintaining a highly aggressive tumour phenotype. As another example, the pancreatic cancer related biomarker MUC4 was identified as downregulated in the ITGA3 knockdown tumours. High expression of MUC4 can lead to enhanced cell proliferation, invasion and adhesion to ECM, and can lead to increased tumour progression and metastasis (38, 39).

Regarding the therapeutic possibilities offered by ITGA3 as a target, this molecule could be a particularly elegant target as it only binds to laminin and thrombospondin (40). Due to its narrow

binding specificity, the side effects of ITGA3 blocking could be relatively mild compared with other integrins.

## **CONCLUSION**

High ITGA3 expression significantly facilitates the development and spread of intra-peritoneal carcinomatosis and thus decreases life expectancy of mice in our xenograft model as well as in PDAC patients. Since ITGA3 overexpressed in PDAC cells is functionally involved in metastatic cascade, it may represent an ideal target for multimodal therapies of PDAC patients. Beyond the development of specific inhibitors, this may also involve therapeutic, RNAi-mediated knockdown strategies based on siRNAs (41).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Christine Knies, Tobias Gosau, Jennifer Schröder-Schwarz, Maïke Märker, Mia Beine and Ursula Makowski for excellent technical and organizational support.

## **FUNDING**

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI 5115/2–1, Daniel Wicklein, LA 3373/2-6, Tobias Lange and AI 24/21–1, Achim Aigner).

## REFERENCES

1. Luo, W., et al., *Current epidemiology of pancreatic cancer: Challenges and opportunities*. Chin J Cancer Res, 2020. **32**(6): p. 705-719.
2. Tonini, V. and M. Zanni, *Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win*. World J Gastroenterol, 2021. **27**(35): p. 5851-5889.
3. De La Cruz, M.S., A.P. Young, and M.T. Ruffin, *Diagnosis and management of pancreatic cancer*. Am Fam Physician, 2014. **89**(8): p. 626-32.
4. Glehen, O. and A. Bhatt, *Pathology of Peritoneal Metastases*, ed. O. Glehen and A. Bhatt. 2020: Springer Singapore.
5. Gebauer, F., et al., *Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup> mice*. Gut, 2013. **62**(5): p. 741-50.
6. Avula, L.R., B. Hagerty, and C. Alewine, *Molecular mediators of peritoneal metastasis in pancreatic cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2020. **39**(4): p. 1223-1243.
7. Samarzija, I., et al., *Integrin Crosstalk Contributes to the Complexity of Signalling and Unpredictable Cancer Cell Fates*. Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
8. Madamanchi, A., A. Zijlstra, and M.M. Zutter, *Flipping the switch: integrin switching provides metastatic competence*. Sci Signal, 2014. **7**(318): p. pe9.
9. Tang, Z., et al., *GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(W1): p. W556-w560.
10. Kemper, M., et al., *Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 214.
11. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
12. Ramovs, V., L. Te Molder, and A. Sonnenberg, *The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer*. Matrix Biol, 2017. **57-58**: p. 213-243.
13. Zhu, G.H., et al., *Expression and prognostic significance of CD151, c-Met, and integrin alpha3/alpha6 in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(4): p. 1090-8.
14. Jiao, Y., et al., *ITGA3 serves as a diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic cancer*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 4141-4152.
15. Kalinina, T., et al., *Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 295.
16. Andrews, S., *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]*. 2010.
17. Chen, S., et al., *fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor*. Bioinformatics, 2018. **34**(17): p. i884-i890.
18. Dobin, A., et al., *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. Bioinformatics, 2013. **29**(1): p. 15-21.
19. Team, R.C., *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. 2022: Vienna, Austria
20. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
21. Zheng, X., et al., *ITGA3 acts as a purity-independent biomarker of both immunotherapy and chemotherapy resistance in pancreatic cancer: bioinformatics and experimental analysis*. Funct Integr Genomics, 2023. **23**(2): p. 196.
22. Sada, M., et al., *Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility*. Cancer Lett, 2016. **372**(2): p. 210-8.
23. Neesse, A., et al., *Stromal biology and therapy in pancreatic cancer*. Gut, 2011. **60**(6): p. 861-8.



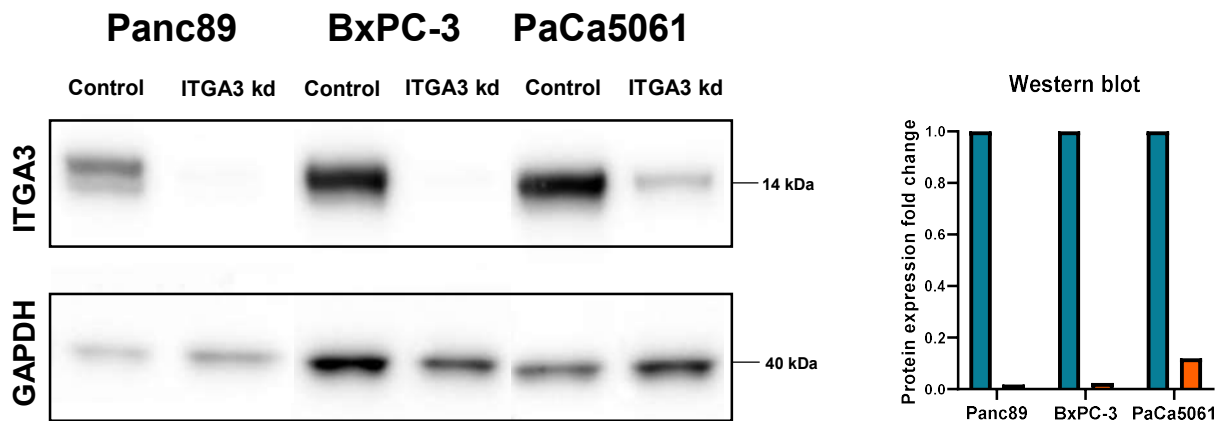
24. Ligorio, M., et al., *Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer*. Cell, 2019. **178**(1): p. 160-175 e27.
25. Hosein, A.N., R.A. Brekken, and A. Maitra, *Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(8): p. 487-505.
26. Bouzin, C. and O. Feron, *Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery*. Drug Resist Updat, 2007. **10**(3): p. 109-20.
27. Provenzano, P.P., et al., *Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 418-29.
28. Iacobuzio-Donahue, C.A., et al., *Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1151-62.
29. Han, H., et al., *Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray*. Cancer Res, 2002. **62**(10): p. 2890-6.
30. Schölzel, S., et al., *Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 595-605.
31. Duxbury, M.S., et al., *CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions*. Ann Surg, 2005. **241**(3): p. 491-6.
32. Burgos, M., et al., *Prognostic value of the immune target CEACAM6 in cancer: a meta-analysis*. Ther Adv Med Oncol, 2022. **14**: p. 17588359211072621.
33. Gebauer, F., et al., *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as biomarkers in pancreatic cancer*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113023.
34. Chen, J., et al., *CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer*. Int J Oncol, 2013. **43**(3): p. 877-85.
35. Cheng, T.M., et al., *Single domain antibody against carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) inhibits proliferation, migration, invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells*. Eur J Cancer, 2014. **50**(4): p. 713-21.
36. Duxbury, M.S., et al., *c-Src-dependent cross-talk between CEACAM6 and alphavbeta3 integrin enhances pancreatic adenocarcinoma cell adhesion to extracellular matrix components*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(1): p. 133-41.
37. Cheng, T.M., et al., *Nano-Strategies Targeting the Integrin alphavbeta3 Network for Cancer Therapy*. Cells, 2021. **10**(7).
38. Gautam, S.K., et al., *MUCIN-4 (MUC4) is a novel tumor antigen in pancreatic cancer immunotherapy*. Semin Immunol, 2020. **47**: p. 101391.
39. Chaturvedi, P., et al., *MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(4): p. 309-20.
40. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. **119**(19): p. 3901-3.
41. Friedrich, M. and Aigner A., *Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives*. BioDrugs 2022. **36**(5): p. 549-571.

**Supplementary Table 1** Antibodies and their dilution used for flow cytometric analyses

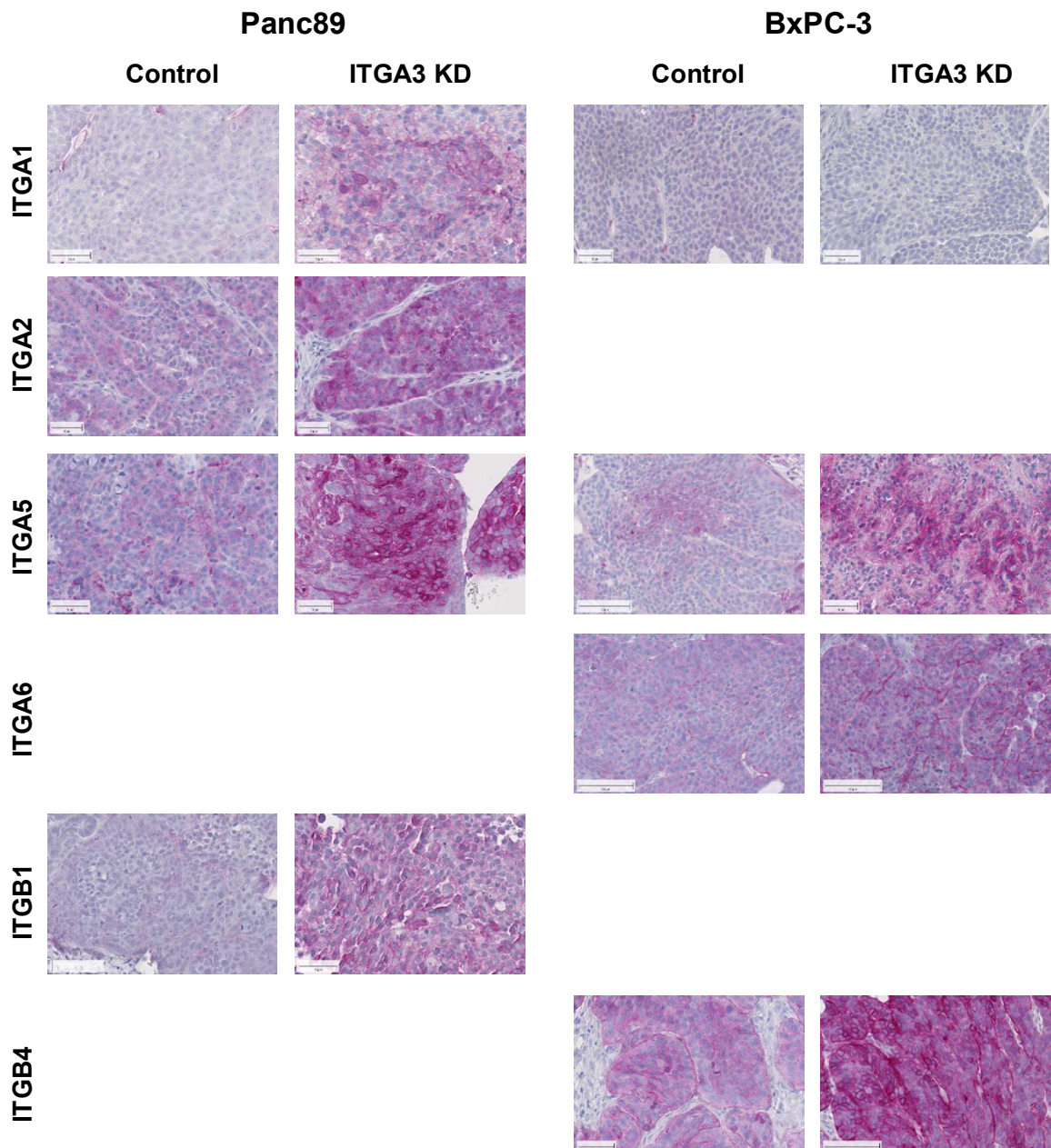
<b>Product name</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Order no.</b>	<b>Dilution</b>
ITGA1/ CD49a	Miltenyi Biotec	130-119-307	1:50
ITGA2/ CD49b	BD Biosciences	555498	1:50
ITGA3/ CD49c	Miltenyi Biotec	130-105-364	1:25
ITGA5/ CD49e	Miltenyi Biotec	130-097-221	1:25
ITGA6/ CD49f	Miltenyi Biotec	130-125-983	1:50
ITGAV/ CD51	BioLegend	327907	1:400
ITGB1/ CD29	Thermo Scientific	11-0299-41	1:50
ITGB4/ CD104	Miltenyi Biotec	130-124-246	1:50
ITGB6	Miltenyi Biotec	130-111-268	1:50
APC REA	Miltenyi Biotec	130-113-434	1:50
FITC REA	Miltenyi Biotec	130-113-437	1:50
FITC VioBright REA	Miltenyi Biotec	130-113-443	1:50
FITC mouse IgG1	BD Biosciences	555748	1:50
FITC mouse IgG2a	Miltenyi Biotec	130-113-271	1:50
APC mouse IgG2b	Miltenyi Biotec	130-112-932	1:50
APC mouse IgG2b	Miltenyi Biotec	130-112-932	1:50

**Supplementary Table 2** Oligonucleotide sequences used for quantitative real-time PCR

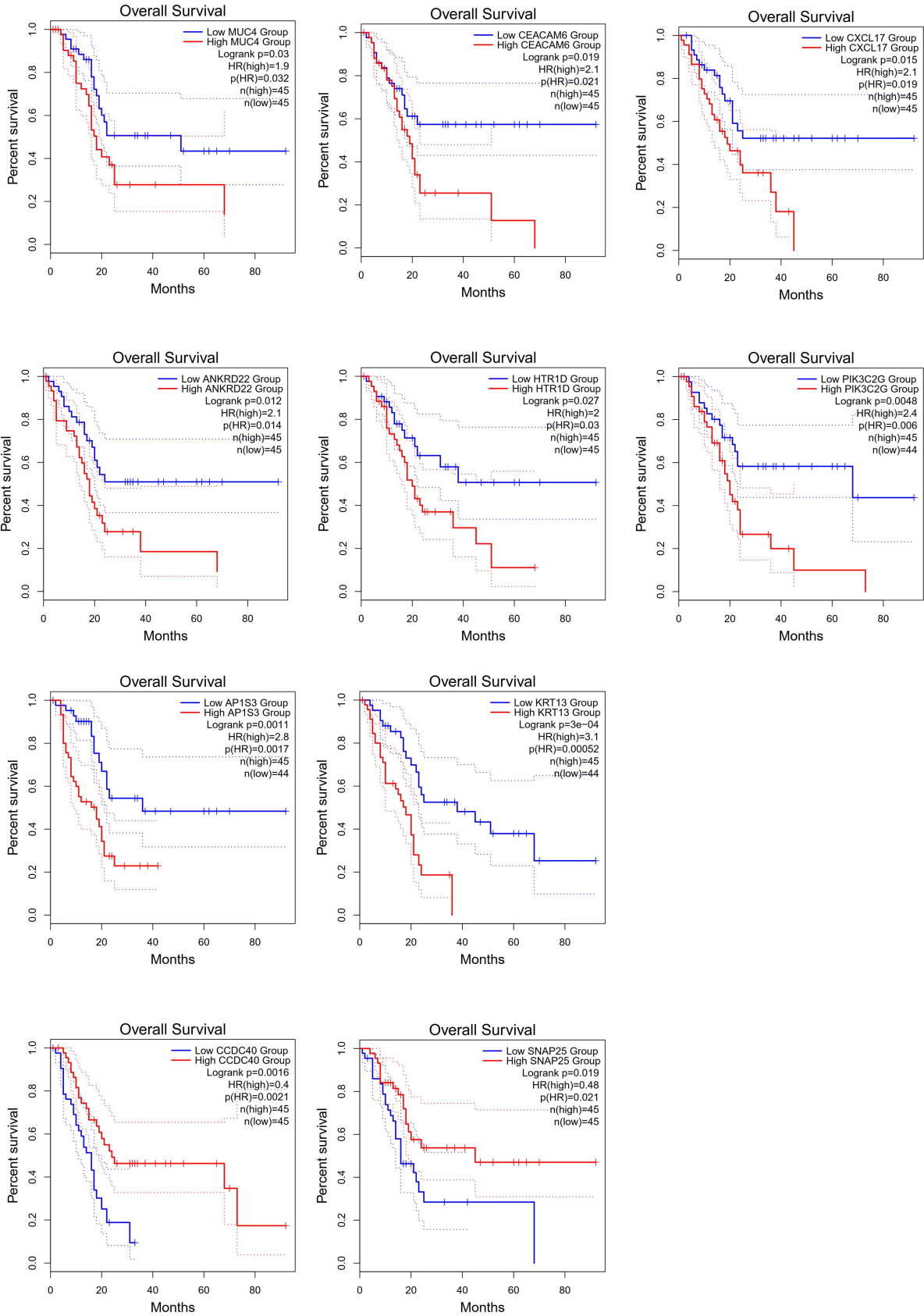
Gene product	Forward primer	Reverse primer
Integrin $\alpha$ 1	AAGTGCAACAAGTGACAGCG	TCAGGGACTGTCTCATTGGC
Integrin $\alpha$ 2	TTAGCGCTCAGTCAAGGCAT	CGGTTCTCAGGAAAGCCACT
Integrin $\alpha$ 3	CATCACCCCTGGCCTACACTC	GTCACGGAGGTTGTCCATCA
Integrin $\alpha$ 5	TTACGGGACTCAACTGCACC	CTCCGGGCATTTTCAGGATCT
Integrin $\alpha$ 6	TATCGGTCTCGGGAGTTGCT	GCTGTGCCGAGGTTTGTAAAG
Integrin $\alpha$ V	CGCTTCTTCTCTCGGGACTC	AGAAACATCCGGGAAGACGC
Integrin $\beta$ 1	TTGTAGCTGGTGTGGTTGCT	TAGGATTTTCACCCGTGTCCC
Integrin $\beta$ 3	GTAGAGCTGGAAGTGCGTGA	AATGCTGAAGCTCACCGTGT
Integrin $\beta$ 4	CCTAAGAACCGGATGCTGCT	AGGGATGATGGGGATGGACA
Integrin $\beta$ 5	GCCCGCTATGAAATGGCTTC	TTTCATCAGATCCCCGCTCC
Integrin $\beta$ 6	TTGCCAACCCCTTGCAAGTAGT	AATCCACCTTCGGGTGTGTC
Integrin $\beta$ 8	TGCTGCTGGTGTGACAGAT	GTGAGGGGTGTTCCATGGTT



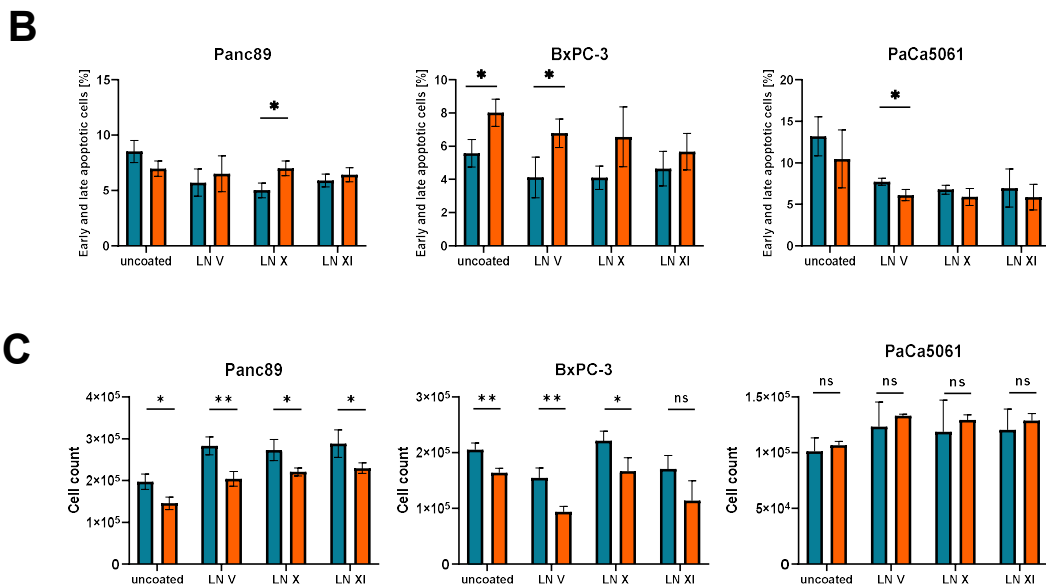
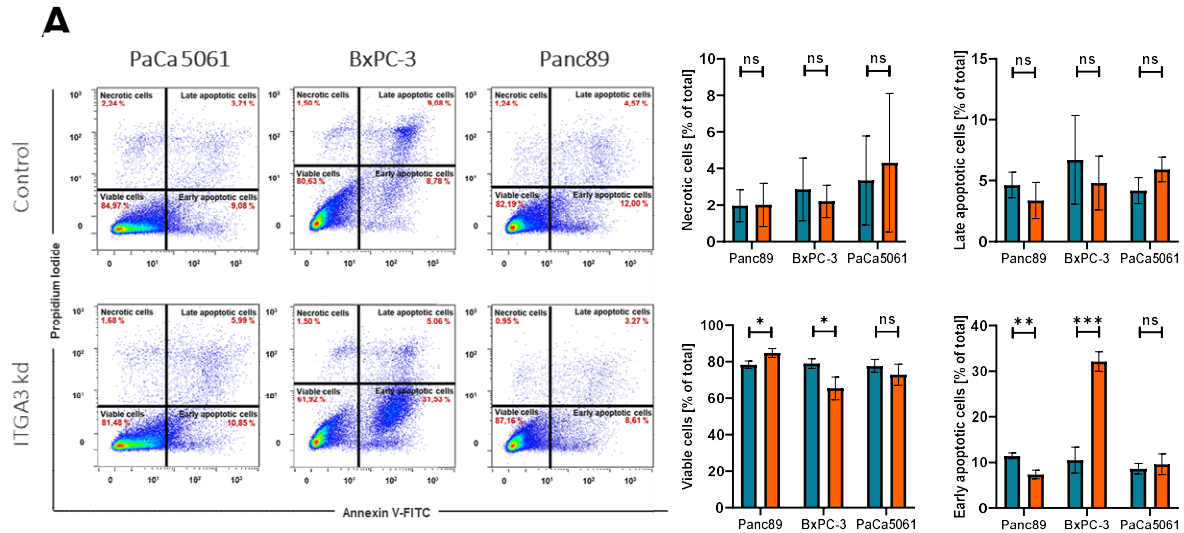
**Supplementary Figure 1** Reduction of ITGA3 expression upon RNAi-mediated knockdown in three human PDAC cell lines (Panc89, BxPC-3 and PaCa5061) using western blot.



**Supplementary Figure 2** Immunohistochemical staining of ITGA1, ITGA2, ITGA5, ITGA6, ITGB1 and ITGB4 on the IP carcinosis. Representative images of the control groups and ITGA3 knockdown groups of Panc89 and BxPC-3 tumours are shown.



**Supplementary Figure 3** Using TCGA data via the Gepia2 site ([gepia2.cancer-pku.cn](http://gepia2.cancer-pku.cn)), the relation between expression of genes from Table1 and survival probability was examined in patients diagnosed with PDAC, quartile group cut-off.



**Supplementary Figure 4** Representative images of flow cytometry and the gating strategy are shown for the anoikis assay, as well as the percentages of necrotic, late apoptotic, early apoptotic and viable cells after cultivation for 96 h (**A**). The varying relative percentages of early and late apoptotic in ITGA3 knockdown cells to control cells on control plates and plates coated with various laminin heterotrimers: LN V, LN X, and LN XI after 96 h (**B**). The proliferation rate was determined by cell counting after PDAC cells were allowed to grow on different substrates (uncoated, LN V, LN X, LN XI,) for 96 (**C**).

## **2.2 Darstellung des Eigenanteils am Manuskript „*Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer*”**

Die wissenschaftliche Arbeit „*Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer*” befindet sich zum jetzigen Stand (September 2023) im Peer-Review-Verfahren. Außer mir (alleinige Erstantorin) haben auch noch weitere Co-Autoren an diesem Manuskript gearbeitet, daher erläutere ich hier meinen Anteil im Detail.

Die Fragestellung und die daraus resultierende Ausarbeitung dieses Projekts habe ich gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Wicklein vorgenommen. Ich habe die erste Version dieses Manuskripts eigenständig verfasst.

Die Stabilität des ITGA3-*knockdowns in vitro* wurde mittels qRT-PCR, Durchflusszytometrie und Western Blot dargestellt (Fig. 1, Supplementary Fig. 1). Die Planung aller Versuche wurde eigenständig von mir vorgenommen, ebenso die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR und der durchflusszytometrischen Messung. Die Durchführung und Auswertung des Western Blots (Supplementary Fig. 1) erfolgte durch eine hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin unter meiner Anleitung. Die Planung, Betreuung, Durchführung und Auswertung sowie die Erstellung der Abbildungen aller Tierversuche und der damit einhergehenden Daten habe ich eigenständig vorgenommen. Dabei halfen unterstützend Tobias Gosau und Mia Beine (BTAs) (Fig. 2, 3). Die immunhistochemischen Färbungen (Fig. 4, 7, Supplementary Fig. 2) und deren Quantifizierung wurden von mir geplant. Die Durchführung und Analyse mittels ImageJ wurden von technischen Assistent:innen und Frau Bettina Breitenborn (Doktorandin) übernommen. Die Beispielabbildungen, die auch Grundlage für die Quantifizierung waren, habe ich erstellt, ebenso die Auswertung und die grafische Darstellung.

Die Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten und die Erstellung der Tabelle 1 erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Tobias Lange und Herrn Prof. Dr. Daniel Wicklein. Die Erhebung der Daten und Erstellung der Grafiken aus der TCGA-Datenbank mittels GEPIA2-Webseite (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) erfolgten durch Herrn Prof. Dr. Wicklein (Supplementary Fig. 3) und durch mich (Fig. 5). Die Aufarbeitung der Proben für die RNA-Sequenzierung erfolgte durch Frau Hanna Maar (Doktorandin) und die Analyse sowie die grafische Darstellung (Fig. 6) durch Michael Spohn (wissenschaftlicher Mitarbeiter der Core Facility Bioinformatics des UKE).

Die Planung, Durchführung, Auswertung und die Erstellung der Abbildungen aller *in vitro*-Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt (Fig. 8., Supplementary Fig. 4). Dafür wurden einige Assays neu etabliert wie beispielsweise die Viabilitätsmessung (Fig. 8A, E) und der Adhäsions-Assay (Fig. 8B).

(Siehe: Darstellung des Eigenanteils am Manuskript „*Inhibition of peritoneal carcinomatosis and prolonged survival by low integrin alpha-3 expression in human pancreatic cancer*“ auf der vorherigen Seite.)

Hamburg,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "D. Wicklein". The signature is written in a cursive style with a prominent initial "D".

.....  
Betreuer (Prof. Dr. Daniel Wicklein)




**2.3 Manuskript „*Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression*”**

RESEARCH

Open Access



# Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression

Marius Kemper<sup>1,2\*</sup> , Alina Schiecke<sup>2</sup>, Hanna Maar<sup>2</sup>, Sergey Nikulin<sup>3</sup>, Andrey Poloznikov<sup>3</sup>, Vladimir Galatenko<sup>4</sup>, Michael Tachezy<sup>1</sup>, Florian Gebauer<sup>5</sup>, Tobias Lange<sup>2</sup>, Kristoffer Riecken<sup>6</sup>, Alexander Tonevitsky<sup>7</sup>, Achim Aigner<sup>8</sup>, Jakob Izbicki<sup>1</sup>, Udo Schumacher<sup>2</sup> and Daniel Wicklein<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** Mesothelial E- and P-selectins substantially mediate the intraperitoneal spread of Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) cells in xenograft models. In the absence of selectins in the host, the integrin subunit alpha-V (ITGAV, CD51) was upregulated in the remaining metastatic deposits. Here we present the first experimental study to investigate if ITGAV plays a functional role in PDA tumor growth and progression with a particular focus on intraperitoneal carcinomatosis.

**Methods:** Knockdown of ITGAV was generated using an RNA interference-mediated approach in two PDA cell lines. Tumor growth, intraperitoneal and distant metastasis were analyzed in a xenograft model. Cell lines were characterized in vitro. Gene expression of the xenograft tumors was analyzed. Patient samples were histologically classified and associations to survival were evaluated.

**Results:** The knockdown of ITGAV in PDA cells strongly reduces primary tumor growth, peritoneal carcinomatosis and spontaneous pulmonary metastasis. ITGAV activates latent TGF- $\beta$  and thereby drives epithelial-mesenchymal transition. Combined depletion of ITGAV on the tumor cells and E- and P-selectins in the tumor-host synergistically almost abolishes intraperitoneal spread. Accordingly, high expression of ITGAV in PDA cells was associated with reduced survival in patients.

**Conclusion:** Combined depletion of ITGAV in PDA cells and E- and P-selectins in host mice massively suppresses intraperitoneal carcinomatosis of PDA cells xenografted into immunodeficient mice, confirming the hypothesis of a partly redundant adhesion cascade of metastasizing cancer cells. Our data strongly encourage developing novel therapeutic approaches for the combined targeting of E- and P-selectins and ITGAV in PDA.

**Keywords:** Pancreatic cancer, Integrin alpha-V, Metastatic cascade, TGF-beta signaling, EMT

\* Correspondence: [m.kemper@uke.de](mailto:m.kemper@uke.de)

<sup>1</sup>Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Medical-Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) belongs to the most lethal malignancies in industrialized countries. By 2040 an increase to 777,423 death per year worldwide is expected [1]. Despite advances in diagnostics and therapy, the five-year survival rate is only 9% [1]. These data indicate that the vast majority of patients relapse within 5 years after surgery. Besides locoregional relapse or distant metastasis to lungs or liver, recurrence manifests as peritoneal carcinomatosis in many cases [2], making this process an important target for therapeutic intervention. In fact, the median overall survival for patients diagnosed with intraperitoneal carcinomatosis amounts 14.1 months only [2].

In a previous study, we demonstrated that tumor cell adherence to the peritoneal mesothelium is highly dependent on the binding of carbohydrate structures present of the cancer cells' outer cell membrane to E- and P-selectins expressed on the peritoneal mesothelial cells using a xenograft model with selectin-deficient mice [3]. In the absence of selectins, only a minority of cells could adhere to the peritoneum, which considerably inhibited intraperitoneal tumor growth [3]. In the present study, we investigated the underlying mechanism for the remaining metastatic deposit in selectin-deficient mice in which we found Integrin  $\alpha$ V (ITGAV) to be functionally involved. ITGAV has recently been reported to be an important driver of cancer progression in prostate [4, 5] and colon carcinoma [6]. In PDA, recent studies demonstrate that the dimer of Integrins  $\alpha$ V $\beta$ 6 (ITGAV / ITGB6) is overexpressed in most tumors (with overexpression being retained in the corresponding metastases) and is a feasible target for novel therapeutic approaches [7, 8].

## Methods

### Cell lines and RNA interference-mediated ITGAV knockdown

Authenticated PDA cell lines PaCa 5061 [9] and BxPC3 [10] were used. ITGAV knockdown was achieved using a short hairpin RNA (shRNA) mediated approach: A 65 bp hairpin DNA oligomer containing a 19 bp anti-ITGAV sequence (GGATGGTGTCCACTTCAAA) was inserted into the pLVX vector (Clontech). Potential off-target effects were checked (NCBI BLAST). An shRNA sequence against firefly luciferase was used for the control cell line [11]. Knockdown and control cells were seeded at three cells per well. Sublines with normal ITGAV and low ITGAV expression were pooled respectively and tested for Mycoplasma. The passage number of used cell lines never exceeded 20.

### Flow cytometry

Flow cytometry was performed as described [12]. Following antibodies were used: ITGAV (327,907, BioLegend),

ITGB1 (11–0299, Thermo Fisher Scientific), ITGB3 (336, 403, BioLegend), ITGB5 (11–0497-42, Thermo Fisher Scientific), ITGB6 (FAB4155P, R&D), HLA-DR (347,401, BD). Stained cells were subjected to FACS Calibur Flow Cytometry System (BD).

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cells were seeded in a T25 cell culture flask. After 48 h, they were changed to 1.5 mL serum-free medium. After another 24 h of incubation, the medium was harvested and centrifuged. Supernatants were collected. The measurement of TGF- $\beta$ 1 was made using the Free Active TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit (cat. 437,707, BioLegend), respectively Total TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit (cat. 436,707, BioLegend).

### In vitro characterization of ITGAV knockdown cells

Cell proliferation was assessed using the XTT assay (Roche Diagnostics).  $3 \times 10^3$  cells were plated per well (96-well plate) and incubated for 72 h. Fifty microliter XTT labeling mixture was added per well. After 5 h incubation, spectrophotometrical absorbance (450 nm) was measured using a microplate reader (MR5000 Multiplate Reader, Dynatech).

Static cell adhesion assays were performed in fibronectin-coated  $\mu$ -Slides (ibidi). Cells were expanded to a concentration of  $1 \times 10^5$  cells and added to a suspension volume of 60  $\mu$ L. After 1 h of incubation, visual fields were documented (Axio Cam MRm, Carl Zeiss). To calculate the fraction of adherent cells, slides were washed with PBS and the same predefined visual fields were documented.

Differences in cell migration were assessed using the FluoroBlok Migration Assay with a 24-well plate with 8.0- $\mu$ m pore size inserts (BD Bioscience). Cells were trypsinized and resuspended in serum-free medium in a concentration of  $3 \times 10^5$  cells/ml. Four hundred microliter cell suspension was added to the apical chamber and 1200  $\mu$ L medium with 10% FCS (Gibco) as chemoattractant was added to the bottom chamber. The assay was incubated for 24 h. After removing the chemoattractant from the bottom chamber, visualization of migrated cells was performed by adding 500  $\mu$ L/well HBSS buffer with Calcein AM (Invitrogen) 4  $\mu$ g/mL in the bottom well and incubating for 1 h. The readout was conducted at 485/530 nm (Ex/Em) on a Genios bottom-reading fluorescence plate reader (Tecan). To assess the invasive potential, cells were seeded on a 24-multiwell insert plate uniformly coated with basement membrane equivalent Matrigel (FluoroBlok Invasion System, BD Biosciences). After rehydration according to the manufacturer's guidelines for use, all further steps were identical to those described for the migration assay.

For the colony-forming assay, 1500  $\mu$ L single-cell suspension (1200 cells/ml) was mixed with 1500  $\mu$ L growth

factor reduced Matrigel (cat.: 356230, BD Biosciences). Fifty microliter of this suspension was seeded per well (96-well plate). After 30 min incubation, 200  $\mu$ l medium was added per well. The plates were kept in an incubator for 14 d.

#### Animal experiments: xenograft mouse model

C57BL/6 pfp<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup> mice and E- and P-selectin double deficient pfp<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup> [3] at the age of 8–12 weeks and bodyweight of 21–29 g were used for the study. For the intraperitoneal and the subcutaneous xenograft model,  $1 \times 10^6$  viable, mycoplasma-free tumor cells suspended in 200  $\mu$ l RPMI were injected intraperitoneally or subcutaneously. Peritoneal carcinomatoses were quantified by an adapted peritoneal carcinomatosis index (PCI). Briefly, the murine peritoneum was divided into 9 sections (upper left to lower right) and every section was attributed with a carcinoma score from 0 to 3, resulting in a total PCI score of 0 to 27 for each animal [3, 13]. For the subcutaneous experiment, mice were injected subcutaneously directly under the right scapula with  $1 \times 10^6$  mycoplasma-free cells. Animals were sacrificed when primary tumors exceeded 1.5 cm<sup>3</sup> or ulcerated the mouse skin. All animal experiments were performed following the United Kingdom Coordinating Committee of Cancer Research Guidelines [14]. The experiment was approved by the local licensing authority (project no. G09/88 and G10/55).

#### Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

After sacrifice, the left lungs were homogenized (Tissue-Lyser II, Qiagen) and subjected to DNA isolation (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen). Two hundred microliter blood was subjected to DNA isolation. DNA concentrations were quantified (NanoDrop, Peqlab). All lung DNA samples were normalized to 30 ng/ $\mu$ L. The concentrations of blood DNA were similar in all samples (approx. 10 ng/ $\mu$ L) and were therefore not normalized. qRT-PCR was performed with established human-specific Alu primers [15]. Numerical data were determined against a standard curve as described [16].

#### Western blot

Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay. Western blots were performed as described [17]. Briefly, 30  $\mu$ g of protein of each sample was added per well. Electrophoresis was performed in 10% polyacrylamide separating gel with a 5% stacking gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (0.45  $\mu$ m, GE Healthcare). After overnight incubation in blocking solution (5% milk powder), membranes were incubated with the respective antibody: ITGAV (cat. sc-376,156, Santa Cruz), ITGB1 (cat. sc-374,429, Santa

Cruz), ITGB6 (cat. c-293,194, Santa Cruz) and a c-terminal SMAD 4 antibody (cat. ab217267, Abcam). HSC70 (cat. Sc-7298, Santa Cruz) was used as intrinsic control. Goat anti-Mouse IgG (cat. P0447, Dako) or, respectively, Goat anti-rabbit IgG (cat. Sc-2054, Santa Cruz) were used as a secondary antibodies.

#### Affymetrix gene arrays

RNA was extracted (miRNeasy Mini Kit, Qiagen) and concentrations were determined (NanoDrop). The RNA integrity number was higher than 7 for all samples (Agilent Bioanalyzer 2100 system). Expression analysis was performed using the GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Thermo Fisher Scientific). For cDNA synthesis, labeling and hybridization, the GeneChip WT PLUS Reagent Kit and GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) were used.

#### Immunohistochemical analysis

Sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors were used. Briefly, after antigen retrieval, the following primary antibodies were used: ITGAV (sc-376,156, Santa Cruz); ITGB1 (AB3167, Abcam), ITGB6 (HPA023626, Atlas), CEACAM7 (LS-B13068, LSBio), TGFBR1 (PA5-98192, Thermo Scientific), phospho-SMAD2 (AB3849, Millipore), TGFBI (MA526731, Thermo Fisher Scientific), Twist (ab50581, Abcam), Ki 67 (M7240, Agilent); human-specific fibronectin (NCL-FIB, Leica Biosystems); fibronectin, cross-reacting with the fibronectin-equivalent protein in mouse (A0245, Dako); STAT1 (HPA000931, Sigma-Aldrich), HLA-DR (M0746, Agilent). Vectastain ABC kit (Vector) was used. Slides were scanned by Axio Scan Z1 (Zeiss). For quantification with Image J (NIH), images of four randomly chosen vision fields (not containing necrotic areas) were analyzed. If artifacts interfered with automated quantification by Image J, the staining was quantified by two experienced investigators: grade 0: no reaction or weak focal reaction; grade 1 intense focal or diffuse weak reaction; grade 2 moderate diffuse reaction; grade 3 for an intense diffuse reaction.

#### Study population

Two hundred nine patients with PDA who underwent pancreaticoduodenectomy at the University Medical Centre Hamburg-Eppendorf between 2000 and 2012 were included. Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol was approved by the Hamburg Medical Chamber's ethics committee (Approval number: PV3548).

#### Tissue microarray (TMA) construction and analysis

TMA construction was performed as previously described [18]. Only punches with clearly detectable tumor

tissue were included. The staining intensity and quantity of the tumor cells of each tissue spot were scored. To analyze the phospho-SMAD2 staining, all cell nuclei in a visual field were counted and the percentage of phospho-SMAD2 -positive cell nuclei was determined. If this was more than 75%, the tissue sample was classified as high. Of the initial 209 samples, ITGAV could be analyzed in 183, pSMAD2 in 180, STAT1 in 160, and HLA-DR in 192 samples. Immunohistochemical analysis of the sections was performed without knowledge of the patients' identity or clinical status.

### Data analyses

GraphPad Prism was used for in vitro and in vivo statistical calculations (Student's *t*-test, Kaplan-Meier method, Log-rank test). To analyze the TMA, SPSS was used: Relationships between categorical variables were calculated using chi-square tests. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and analyzed by the log-rank test. For data obtained by gene expression array, statistical analysis was performed using Transcriptome Analysis Console (4.0.0.25) with summation method Gene + Exon - SST-RMA (version 1) and empirical Bayes method. Calculated *p*-values were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg (FDR) procedure. The sample sets with expression fold changes of at least  $\pm 1.5$  and with an FDR *p*-value  $< 0.05$  were considered significantly differentially expressed. Further analysis was performed with R 3.5.1 programming language with IDE RStudio 1.1. The heat maps were constructed with the "heatmap.2" function from "gplots" package.

## Results

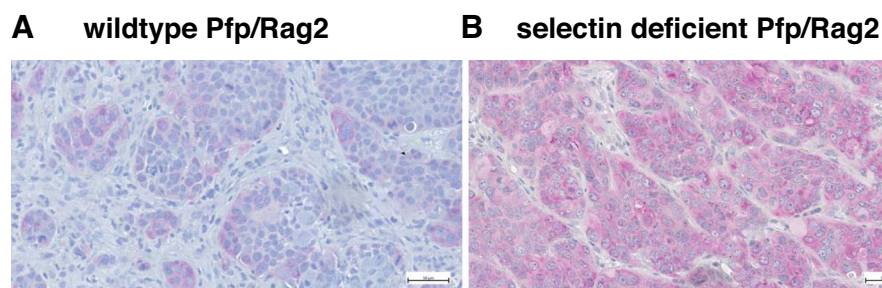
### Integrin expression was upregulated in intraperitoneal carcinomatosis grown in selectin-deficient mice

The gene expression profiles of tumors that had developed in the host animals despite selectin deficiency were compared with the gene expression profiles in tumors grown in wild-type *Pfp<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>* mice: Integrins  $\beta 1$  (1.56-fold),  $\alpha 2$  (1.67-fold),  $\beta 6$  (1.69-fold) and  $\alpha V$  (1.70-

fold) were found to be upregulated in the tumors of the selectin deficient animals. We selected integrin  $\alpha V$  (ITGAV) - which displayed the highest upregulation - to further study integrin influence in PDA. We confirmed the upregulation of ITGAV in xenograft carcinomas using immunohistochemistry (Fig. 1). We then generated a subline of the PaCa 5061 cell line with stable knock-down of ITGAV (shRNA), termed PaCa 5061 ITGAV KD and a respective control subline with unchanged ITGAV designated as PaCa 5061 control. The expression of ITGAV was reduced by  $> 65\%$  in PaCa 5061 as determined by flow cytometry and western blot (Fig. 2a).

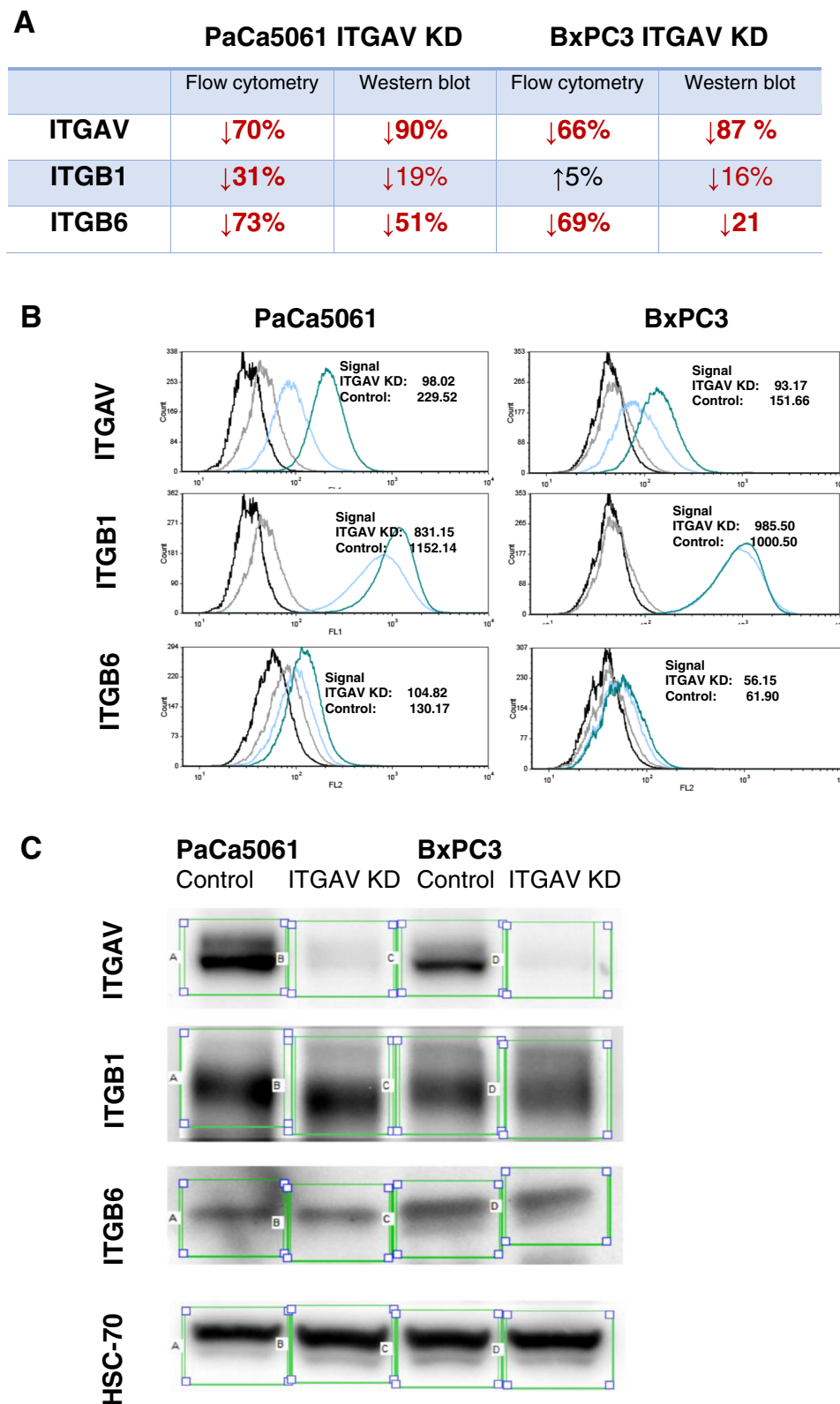
### ITGAV KD massively suppressed intraperitoneal carcinomatosis and reduced primary tumor development and distant metastasis in SMAD4-intact PaCa 5061 cells

To answer the question of whether ITGAV on the tumor cells alone or in combination with E- and P-selectins in the tumor environment has a functional effect on intraperitoneal carcinomatosis formation, PaCa 5061 ITGAV KD and PaCa 5061 control cells were intraperitoneally injected into selectin-deficient and wild-type *Pfp<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>* mice (12 animals each group for the selectin-deficient mice, 14 and 15 selectin-competent animals for the control PaCa 5061 and the ITGAV KD group, respectively). After a growth period of 62 days, the ITGAV KD alone almost completely abolished intraperitoneal carcinomatosis in wild-type mice. Only 7 of 15 mice (47%) showed any sign of tumor development (small tumors at the injection site with only one animal displaying macroscopically visible intraperitoneal carcinomatosis (with a minimal PCI of 1). In the experimental group with control PaCa 5061 cells injected into selectin-deficient mice, 11 of 12 mice showed a tumor take (92%), with all of them displaying intraperitoneal carcinomas (mean PCI of 12.92;  $P < 0.001$ , Fig. 3a). After 62 d, only 2 of 12 selectin k.o. mice (17%) injected with ITGAV KD cells displayed any small tumors at the injection site and no carcinomatosis was observed. Due to this, the presumed synergistic effect of the selectin



**Fig. 1** In a xenograft model of human PDAC, Integrin  $\alpha V$  is upregulated in intraperitoneal carcinomatosis grown in E- and P-selectin knockout mice. Immunohistochemical staining for human Integrin  $\alpha V$ : Carcinomatosis from wild-type (a) compared with those grown in E-/P-selectin-deficient *pfp<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup>* mice (b). Scale bar: 50  $\mu m$





**Fig. 2** Changes of ITGAV and corresponding beta-subunits ITGB1 and ITGB6 (a) using flow cytometry (b) and Western blot (c). The expression of ITGAV was reduced by > 65% in PaCa 5061 and BxPC3 ITGAV KD cells. Subunits ITGB1 and ITGB6 were found to be downregulated on PaCa 5061 ITGAV KD cells. In contrast, only ITGB6 was downregulated on BxPC3 ITGAV KD cells, while the expression of ITGB1 remained almost unchanged

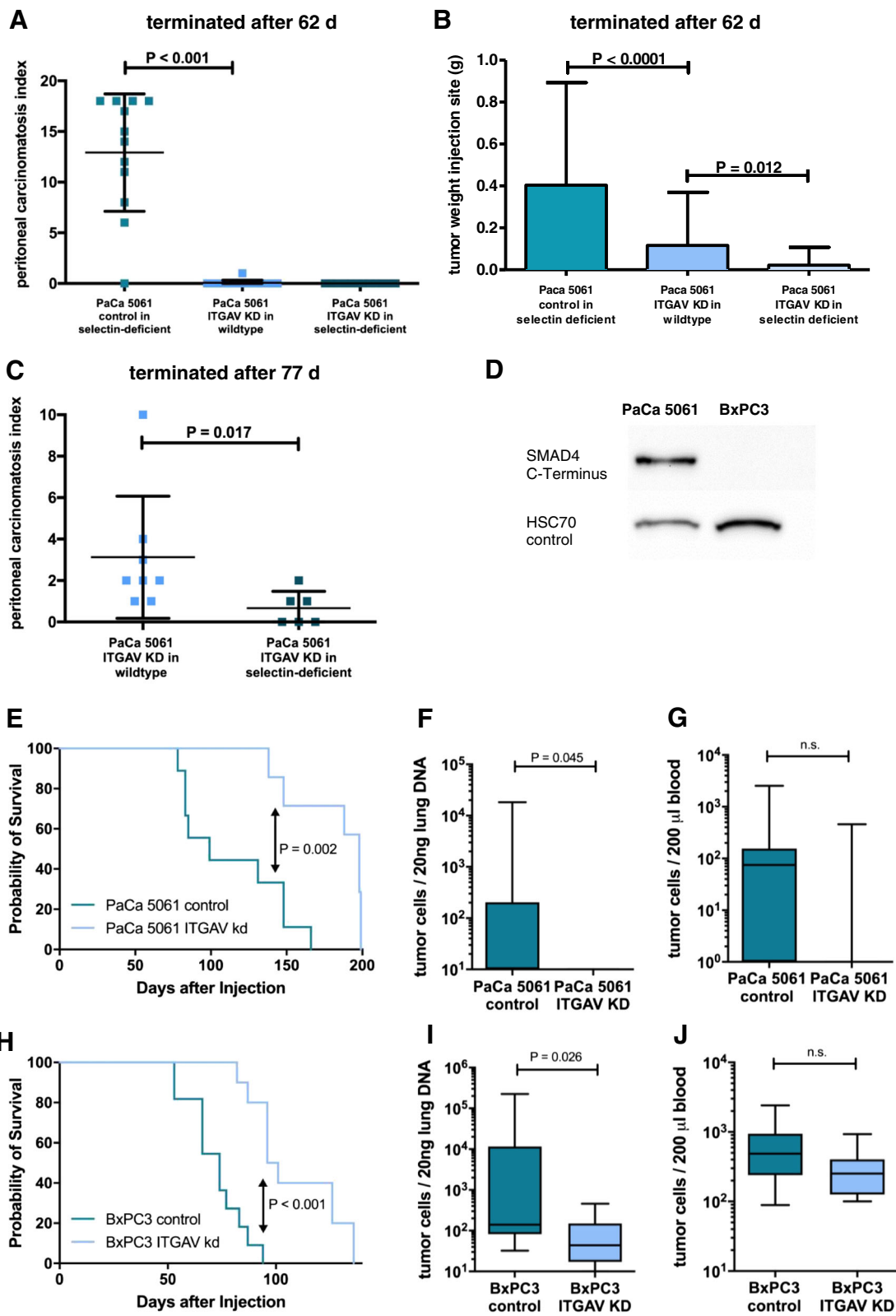


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Fig. 3** Knockdown of ITGAV in PaCa 5061 led to an effective reduction of intraperitoneal carcinomatosis after 62 d compared with control PaCa 5061 in E-/P-selectin deficient mice: Only 1/15 animals of the PaCa 5061 ITGAV KD group in wild-type mice showed carcinomatosis formation vs. 11/12 mice with carcinomatosis in the control group ( $P < 0.0001$ , **a**). ITGAV knockdown also reduced tumor growth at the injection site ( $P < 0.0001$ , **B**). 7/15 (ITGAV KD cells in E-/P-selectin k.o. mice) displayed tumors at the injection site vs. 11/12 in the control group (control PaCa 5061 in E-/P-selectin deficient mice). Combination of ITGAV KD and selectin knockout led to further reduction of injection site tumors ( $P = 0.012$ ; only 2/14 animals with tumors, **b**). After 77 days, this synergistic effect of ITGAV and E-/P-selectins could also be demonstrated for intraperitoneal carcinomatosis formation ( $P = 0.017$ , **C**; 8/13 mice with tumor take with all eight displaying carcinomatosis with ITGAV KD in wild-type mice vs. 6/14 mice with tumor take and 3 of them displaying carcinomatosis with ITGAV KD in E-/P-selectin deficient animals). Using western blot, the C-terminal deletion of SMAD 4 in BxPC3 cells was confirmed (**d**). Wild-type mice inoculated subcutaneously with PaCa 5061 ITGAV KD cells showed significantly prolonged survival (tumor take rate 7/10) compared with control cells in wild-type animals (take rate 9/10;  $P = 0.002$ , **e**). Similar results were found for BxPC3 (100% take rate, both groups;  $P < 0.001$ , 2H). The number of human cells in the animals' lungs was significantly reduced in mice injected with PaCa 5061 ( $P = 0.045$ , **f**) and BxPC3 ITGAV KD cells ( $P = 0.045$ , **l**). There was no significant difference for the PaCa5061 (**g**) or BxPC3 tumor cells circulating in the animals' blood (**j**)

knockout could not be determined. Therefore, we extended the experimental time to 77 days and demonstrated a synergistic effect of ITGAV knockdown and selectin knockout (13 and 14 selectin-deficient *Pfp*<sup>-/-</sup>/*Rag2*<sup>-/-</sup> for the control cells and the ITGAV KD cells, respectively,  $P = 0.017$ , Fig. 3c). Tumor take rates were as follows: selectin k.o. mice injected with control cells: 8 of 13 (62%) and k.o. mice injected with ITGAV KD cells: 6 of 14 (43%). Of the latter, half of the mice developed no peritoneal carcinomatosis, while in the remaining half, only minimal peritoneal carcinomatosis was observed, resulting in a mean PCI of 0.67. In contrast, injection of ITGAV KD cells into wild-type mice led to a mean PCI of 3.13 after 77 days, with at least small macroscopically visible tumor masses being present in all eight animals with tumor take.

As mentioned above, PaCa 5061 cells formed subcutaneous primary tumors in and around the injection channel after intraperitoneal injection: tumor weight in the group of wild-type mice with ITGAV KD cells was significantly reduced (mean of 116 mg,  $P = 0.003$ ) and a synergistic effect could be observed for the selectin-deficient animals with ITGAV KD cells. Here, tumor weights of the injection channel tumors (mean of 22 mg,  $P = 0.017$ ) were again significantly reduced compared with their wild-type counterparts (Fig. 3b).

Due to the different sizes of injection-site tumors of ITGAV KD and control cells in selectin-deficient and wild-type mice, we expected a functional effect of ITGAV on primary tumor development. To verify this observation, we performed an additional subcutaneous xenograft experiment with ITGAV KD and control cells in selectin wild-type mice. In other cancer entities, it could be shown that ITGAV activates latent TGF- $\beta$  in the extracellular matrix (ECM) [19]. As SMAD4 is part of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway and is inactivated in 50% of PDA patients [20] – resulting in dysfunctional canonical TGF- $\beta$  signaling in the corresponding tumors – we additionally included the cell line BxPC3 with SMAD4 deletion as a model cell

line for this patient subset. SMAD4 deletion was confirmed by absent SMAD4 protein levels in the case of BxPC3 (Fig. 3d). Again, sublines with and without stable knockdown of ITGAV, designated BxPC3 ITGAV KD and BxPC3 control, were generated. The expression of ITGAV was reduced by >65% in the KD cell line compared to the expression levels of the control cells (Fig. 2).

After subcutaneous tumor cell injection (10 pfp<sup>-</sup>/*rag2*<sup>-/-</sup> mice each s.c. injected with control and ITGAV KD PaCa 5061, respectively), 9 of 10 animals (90%) injected with control cells and 7 of 10 (70%) mice injected with ITGAV KD cells developed s.c. tumors until the experiment was terminated after 199 days. Mice inoculated with PaCa 5061 ITGAV KD cells showed a significantly prolonged overall survival until reaching the termination criteria (median survival 198.5 vs. 115 d for the control cells,  $P = 0.01$ , Fig. 3e). Similar results were found for BxPC3 (median survival 74 vs. 99 d,  $P < 0.001$ , Fig. 3h). All animals injected with BxPC3 cells (11 with control and 10 with ITGAV KD) developed s.c. tumors, except one animal from the ITGAV KD group, found dead 1 week after injection. It showed no sign of tumor development and was thus excluded from all further analyses. As tumor size and weight at the time of death did not differ significantly between the ITGAV and control groups for both cell lines, a significantly reduced growth of the ITGAV KD tumors can be assumed for PaCa 5061 and BxPC3 cells.

To analyze the influence of ITGAV knockdown on hematogenous metastasis, tumor cells in the animals' lungs and blood were quantified for all mice by qRT-PCR. The PaCa 5061 ITGAV KD ( $P = 0.045$ , Fig. 3f) and BxPC3 ITGAV KD ( $P = 0.026$ , Fig. 3i) groups showed significantly less human DNA in the lungs, reflecting significantly fewer PDA cells than the control group. The numbers of circulating tumor cells in the animals' peripheral blood decreased due to the ITGAV KD, albeit not reaching statistical significance (Fig. 3g and j).



### Effects of ITGAV knockdown in PaCa 5061 und BxPC3 cells in vitro

The possible integrin-beta subunits corresponding with ITGAV (ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6 and ITGB8) were determined in vitro using flow cytometry. Of these, only ITGB1 and ITGB6 were relevantly expressed in PaCa5061 and BxPC3 cells. Subunits ITGB1 and ITGB6 were found to be downregulated on PaCa 5061 ITGAV KD cells in vitro (Fig. 2b). In contrast, only ITGB6 was downregulated on BxPC3 ITGAV KD cells, while the expression of ITGB1 remained almost unchanged (Fig. 2b). These changes were confirmed for the xenograft tumors by western blot (Fig. 2c) and immunohistochemistry (Fig. 6).

To elucidate whether ITGAV activates TGF- $\beta$ 1 in vitro, an ELISA was used to determine the concentration of active and latent TGF- $\beta$ 1 in supernatants from cell culture medium. The concentration of active TGF- $\beta$ 1 decreased by 57% to 5.11 pg/mL ( $P = 0.005$ , Fig. 4a), whereas the concentration of total TGF- $\beta$ 1 did not differ significantly. Obviously, ITGAV activates latent TGF- $\beta$ 1 for PaCa 5061 cells in vitro.

To characterize the functional effects of ITGAV KD in vitro, proliferation, adhesion, migration, invasion and colony-forming assays were performed. No significant differences were detected in cell proliferation between knockdown and control cells in vitro as determined by XTT assays (Fig. 4b). In line with this finding, in vivo proliferation rates analyzed by determining the Ki-67 staining index of vital xenograft tumor tissue revealed no significant differences between the groups (Fig. 6).

The basal membrane / extracellular Matrix (ECM) lies open between the peritoneal cells [21], which might enable direct contact between ITGAV on the intraperitoneal tumor cells and its ligands such as fibronectin. Adhesion of ITGAV KD cells on fibronectin was analyzed under static conditions: PaCa 5061 cells with ITGAV KD showed a distinctly reduced number of adhering cells, with 11% compared with 39% for the controls ( $P = 0.006$ ). Likewise, a reduction in the adhesive potential of BxPC3 cells could be demonstrated ( $P = 0.025$ , Fig. 4c).

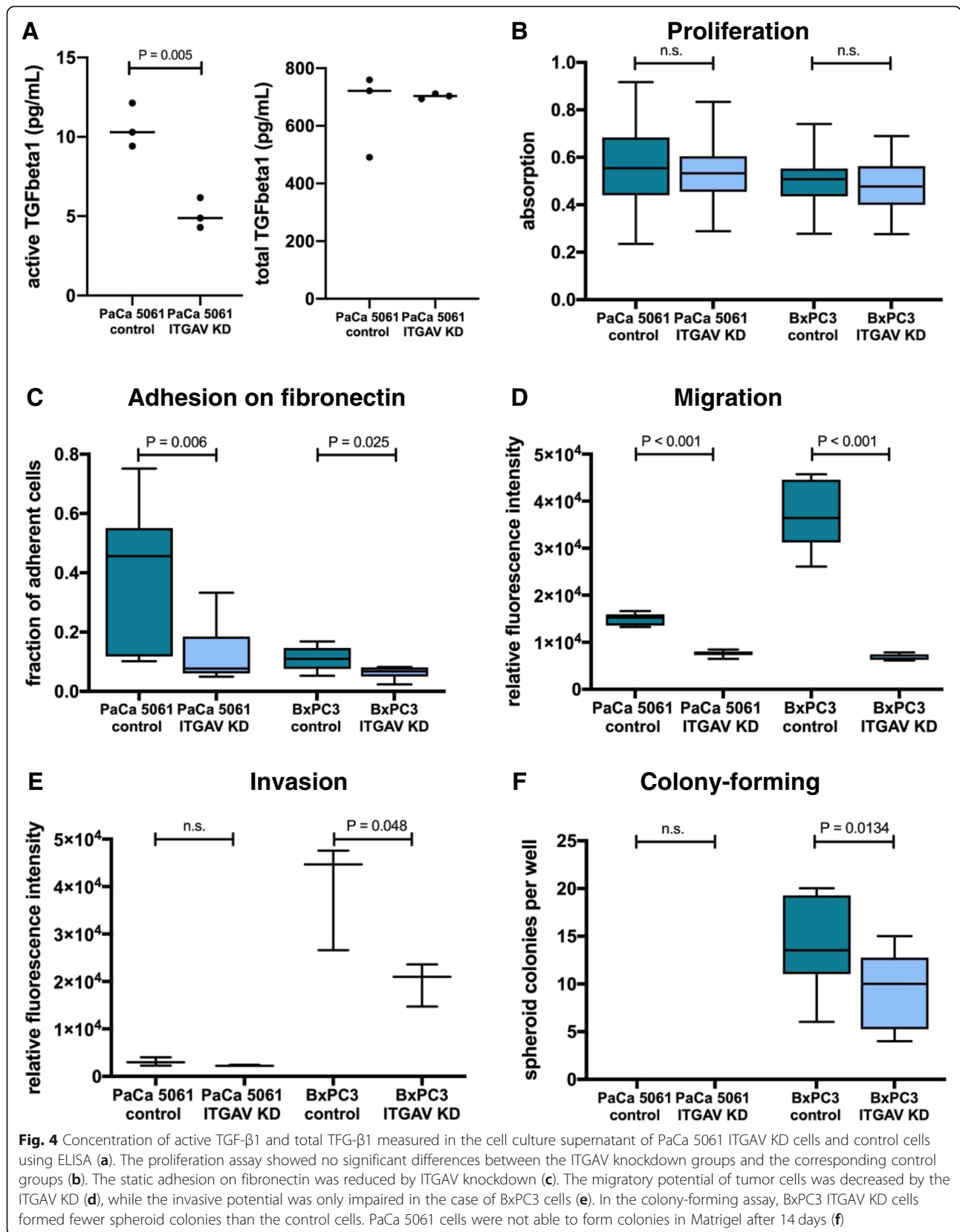
The proportion of migrating tumor cells was reduced for both cell lines upon ITGAV KD ( $P < 0.001$ , Fig. 4d). Moreover, BxPC3 ITGAV knockdown cells showed a reduced invasive potential compared with the control cells ( $P = 0.048$ ). PaCa 5061 cells were not able to pass the Matrigel layer at all (Fig. 4e). In line with the invasion assay finding, BxPC3 ITGAV KD cells formed fewer spheroid colonies per well than the control cells ( $P = 0.0134$ , Fig. 4f). Representative images of colonies formed by BxPC3 control and BxPC3 ITGAV KD cells are shown in Supplementary Fig. 1. PaCa 5061 cells were not able to form colonies in Matrigel after 14 days.

### Gene expression and immunohistochemical analysis of the primary tumors

To gain insight into how the ITGAV knockdown might cause the reduction in tumor growth and metastasis/carcinomatosis formation observed in vivo, we performed whole human genome expression analyses. Genes of interest were defined and categorized into groups according to their functional context (Table 1, Fig. 5). Differences in selected proteins were validated by immunohistochemistry (Fig. 6).

Starting with the SMAD4-intact PaCa 5061 cells, changes regarding the TGF- $\beta$  signaling are compiled first: The non-signaling reservoir TGF- $\beta$  receptor 3 (TGFBR3) was found to be downregulated in the ITGAV KD tumors. In contrast, the expression of TGF- $\beta$ 2 (activation not dependent on ITGAV) and TGF- $\beta$ R1 (receptor for TGF- $\beta$ 1, 2 and 3) were upregulated. Expression of the fibronectin-anchored, latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 (LTBP1), which is essential for activating TGF- $\beta$ 3 with integrin  $\alpha\beta$ 6 [22], was downregulated in PaCa 5061 ITGAV KD tumors. Regarding the regulation of the SMAD2/3:SMAD4 complex, expression levels of several involved genes were significantly regulated, including E2F4, PPM1A, SERPINE1, SKIL and STUB1. To confirm the changed activity of TGF- $\beta$  activation, staining for phospho-SMAD2 was performed (Fig. 6): The proportion of phospho-SMAD2-positive tumor cell nuclei was significantly higher in the PaCa 5061 control group compared with the ITGAV KD group ( $P = 0.03$ , Fig. 6b). Besides, transforming growth factor beta-induced (TGFBI), located in the ECM and associated with poor survival [23], is downregulated as a result of the ITGAV knockdown, which was again immunohistochemically confirmed (Fig. 6b).

Secondly, changes regarding epithelial-mesenchymal transition (EMT) were as follows: Weaker intranuclear staining signals for Twist, a master regulator of EMT, which is controlled by TGF- $\beta$ 1 [24], was observed in PaCa 5061 ITGAV KD tumors (Fig. 6b). In line with the KD cells' more epithelial phenotype, Occludin was found to be 17.35-fold upregulated in the PaCa 5061 ITGAV KD tumors; accordingly, E-cadherin staining signals were enhanced in the ITGAV KD tumors (Fig. 6b). CD44, which correlated with EMT and poor survival in a clinical study of PDA [25], was downregulated 8.94-fold upon knockdown of ITGAV. The secretion of matrix proteins and proteases was also found to be modulated to favor tumor progression in PDA [19]. Exemplarily, MMP-10 was decreased upon knockdown of ITGAV accompanied by increased stromal (murine) fibronectin: Staining for both human and murine fibronectin using a cross-reactive antibody revealed a moderate signal in the ITGAV knockdown groups, whereas the control groups were predominantly only weakly stained



**Fig. 4** Concentration of active TGF-β1 and total TGF-β1 measured in the cell culture supernatant of PaCa 5061 ITGAV KD cells and control cells using ELISA (a). The proliferation assay showed no significant differences between the ITGAV knockdown groups and the corresponding control groups (b). The static adhesion on fibronectin was reduced by ITGAV knockdown (c). The migratory potential of tumor cells was decreased by the ITGAV KD (d), while the invasive potential was only impaired in the case of BxPC3 cells (e). In the colony-forming assay, BxPC3 ITGAV KD cells formed fewer spheroid colonies than the control cells. PaCa 5061 cells were not able to form colonies in Matrigel after 14 days (f)

**Table 1** Selected gene expression changes in PaCa 5061 xenograft tumors upon ITGAV KD. FDR adjusted *P*-values < 0.10 are highlighted (bold font)

Gene Symbol	Fold Change	P	FDR adj. P
<b>TGF-<math>\beta</math> signaling</b>			
CDK8	1.8	0.007	0.108
E2F4	<b>-2.3</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.007</b>
LTBP1	<b>-2.61</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0201</b>
NEDD4L	-1.3	0.096	0.462
PARD3	<b>-2.43</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.001</b>
PPM1A	<b>2.42</b>	<b>0.002</b>	<b>0.051</b>
PPP1CA	<b>-1.55</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.013</b>
PPP1CB	<b>2.59</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.003</b>
RAP1B	1.5	0.0064	0.1065
SERPINE1	<b>-2.83</b>	<b>0.004</b>	<b>0.077</b>
SKIL	<b>2.92</b>	<b>0.002</b>	<b>0.051</b>
SMAD1	-1.18	0.310	0.733
SMAD2	1.09	0.809	0.958
SMAD3	1.79	0.273	0.704
SMAD4	-1.08	0.917	0.982
SMAD6	-1.13	0.289	0.717
SMAD7	1.06	0.505	0.851
SMAD9	-1.01	0.595	0.887
STUB1	<b>-1.84</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.019</b>
TGFB1	-1.59	0.014	0.170
TGFB2	<b>3.61</b>	<b>0.003</b>	<b>0.071</b>
TGFB1	<b>-0.11</b>	<b>0.065</b>	<b>0.384</b>
TGFBR1	<b>1.68</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.015</b>
TGFBR2	1.22	0.971	0.994
TGFBR3	<b>-2.75</b>	<b>0.005</b>	<b>0.090</b>
<b>Epithelial-mesenchymal transition</b>			
ACTA2	-1.04	0.6051	0.8912
ADAM10	<b>2.26</b>	<b>0.003</b>	<b>0.063</b>
ADAM12	1.01	0.897	0.979
BSG	<b>-2.65</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.002</b>
CDH1	-1.21	0.3769	0.7813
CDH2	<b>-5.04</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>&lt; 0.001</b>
FGFBP1	-1.86	0.007	0.107
FLG	<b>265.8</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.002</b>
FN1	<b>-2.57</b>	<b>0.002</b>	<b>0.048</b>
HSPG2	<b>-1.78</b>	<b>0.001</b>	<b>0.039</b>
JAG1	<b>-3.05</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.005</b>
KLK13	<b>2.06</b>	<b>0.001</b>	<b>0.043</b>
KLK7	3.18	0.008	0.125
LAMA2	<b>-1.61</b>	<b>0.001</b>	<b>0.028</b>
LAMA3	<b>-6.57</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.003</b>
LAMA5	-1.74	0.072	0.404

**Table 1** Selected gene expression changes in PaCa 5061 xenograft tumors upon ITGAV KD. FDR adjusted *P*-values < 0.10 are highlighted (bold font) (Continued)

Gene Symbol	Fold Change	P	FDR adj. P
LAMB1	<b>-4.02</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>&lt; 0.001</b>
LAMC1	<b>-1.99</b>	<b>0.001</b>	<b>0.039</b>
LUM	1.14	0.249	0.682
MMP1	-2.59	0.160	0.577
MMP10	<b>-7.92</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.001</b>
MMP12	1.29	0.918	0.983
MMP13	-1.42	0.200	0.629
MMP14	-1.73	0.008	0.124
MMP15	1.01	0.960	0.992
MMP16	1.09	0.175	0.598
MMP17	-1	0.851	0.968
MMP2	1.06	0.159	0.576
MMP20	1.01	0.562	0.875
MMP24	1.03	0.990	0.998
MMP3	1.07	0.635	0.903
MMP7	<b>2.95</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.010</b>
MMP9	-1	0.945	0.990
MUC4	5.58	0.001	0.0366
NID1	<b>-2.3</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.009</b>
OCLN	<b>17.35</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.010</b>
POSTN	1.03	0.1091	0.4901
SNAI1	1.19	0.107	0.486
SNAI2	-1.11	0.459	0.828
SPP1	1.08	0.9279	0.9849
TWIST1	1.08	0.313	0.734
TWIST2	1.09	0.203	0.633
VIM	1.2	0.1338	0.5344
<b>Immune status</b>			
CD2	-1.08	0.312	0.734
CD4	<b>2.46</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.002</b>
CD46	<b>2.88</b>	<b>0.001</b>	<b>0.029</b>
CD48	1.05	0.464	0.830
CD55	1.75	0.016	0.177
CD74	-1.05	0.891	0.978
CNN2	<b>-1.62</b>	<b>0.001</b>	<b>0.046</b>
CTSS	<b>3.59</b>	<b>0.001</b>	<b>0.033</b>
DAPK1	<b>3.58</b>	<b>0.001</b>	<b>0.027</b>
FYB	-5.95	0.036	0.279
GBP2	<b>7.67</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.012</b>
HLA-A	-1.09	0.306	0.730
HLA-B	-1.13	0.439	0.818
HLA-C	1.03	0.745	0.941
HLA-DMA	1.58	0.007	0.110

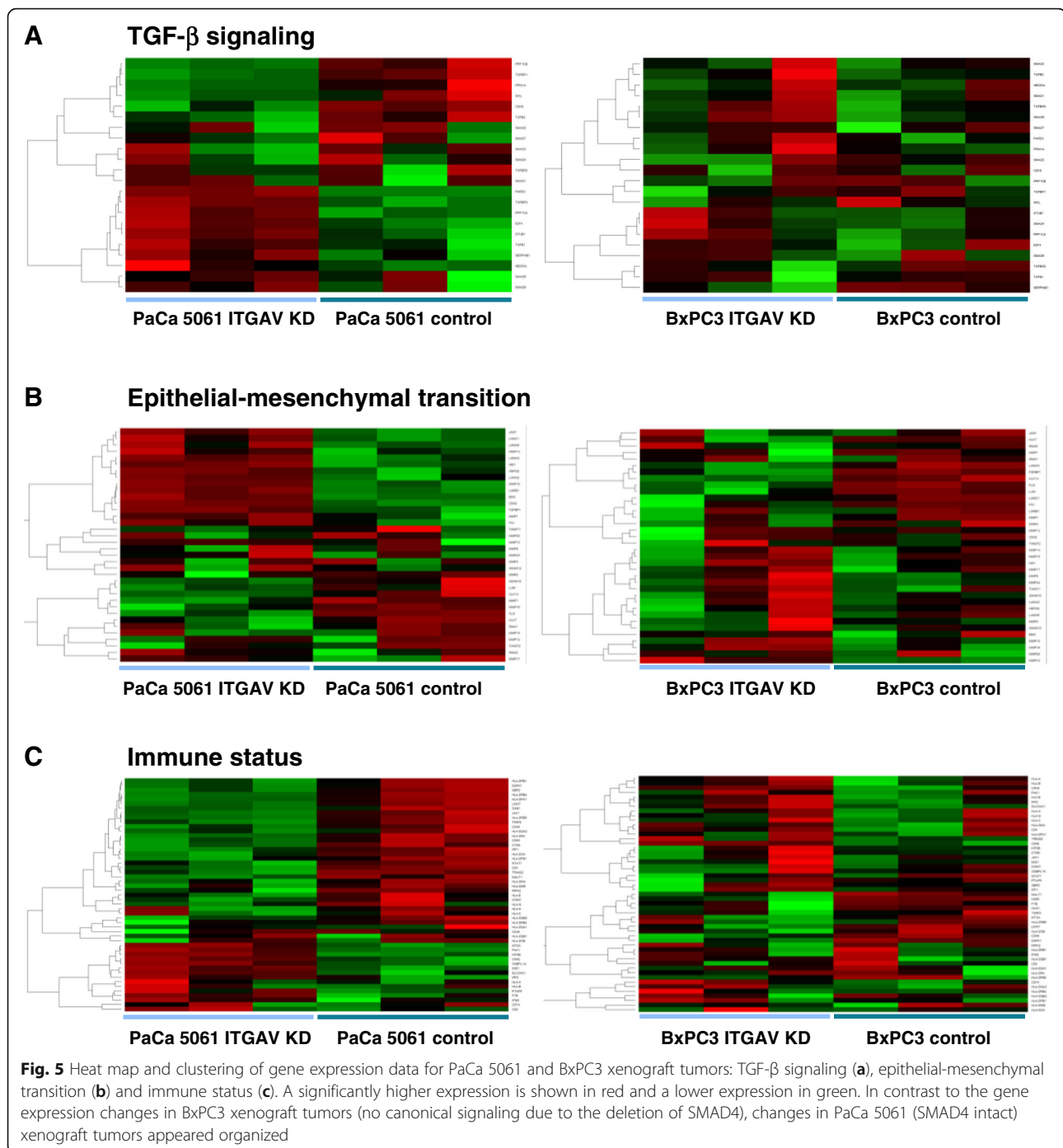
**Table 1** Selected gene expression changes in PaCa 5061 xenograft tumors upon ITGAV KD. FDR adjusted *P*-values < 0.10 are highlighted (bold font) (Continued)

Gene Symbol	Fold Change	P	FDR adj. P
HLA-DMB	1.41	0.009	0.129
HLA-DOA	1.26	0.009	0.129
HLA-DOB	1.09	0.437	0.817
HLA-DPA1	<b>3.32</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.005</b>
HLA-DPB1	1.4	0.019	0.197
HLA-DPB2	1.21	0.031	0.257
HLA-DQA1	-1.14	0.294	0.721
HLA-DQA2	1.77	0.008	0.123
HLA-DQB1	-1.14	0.492	0.845
HLA-DQB2	<b>1.41</b>	<b>0.003</b>	<b>0.065</b>
HLA-DRA	<b>14.81</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.004</b>
HLA-DRB1	<b>19.95</b>	<b>0.001</b>	<b>0.025</b>
HLA-DRB4	<b>12.38</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.005</b>
HLA-DRB5	<b>3.45</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.002</b>
HLA-E	1.17	0.199	0.628
HLA-G	1.64	0.048	0.328
HLA-H	1.13	0.298	0.724
ICAM1	1.71	0.065	0.385
IFNG	-1.07	0.179	0.603
IRF1	<b>1.37</b>	<b>0.005</b>	<b>0.094</b>
IRF2	-1.56	0.014	0.170
JAK1	<b>1.82</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.015</b>
KIF3B	-1.73	0.004	0.076
LMO7	<b>5.19</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.005</b>
MALT1	<b>1.72</b>	<b>0.003</b>	<b>0.069</b>
MID1	<b>-3.3</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.007</b>
MT2A	<b>-2.36</b>	<b>0.002</b>	<b>0.049</b>
OAS1	1.78	0.014	0.169
OSBPL1A	<b>-2.52</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.010</b>
PAK1	<b>-2.66</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.004</b>
PTAFR	-2.09	0.006	0.102
RIPK2	2.56	0.020	0.205
SLCO4C1	<b>-2.93</b>	<b>0.001</b>	<b>0.040</b>
STAT1	<b>2.58</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.019</b>
TIMP2	<b>4.83</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.008</b>
TRIM22	<b>2.28</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.004</b>

for fibronectin (Fig. 6). In contrast, specific staining for human fibronectin revealed no differences between the two groups, indicating that the stromal fibronectin was deposited by murine stromal cells and not by human cancer cells.

Thirdly, changes regarding the immune status were as follows: MHC class II molecules, part of the human

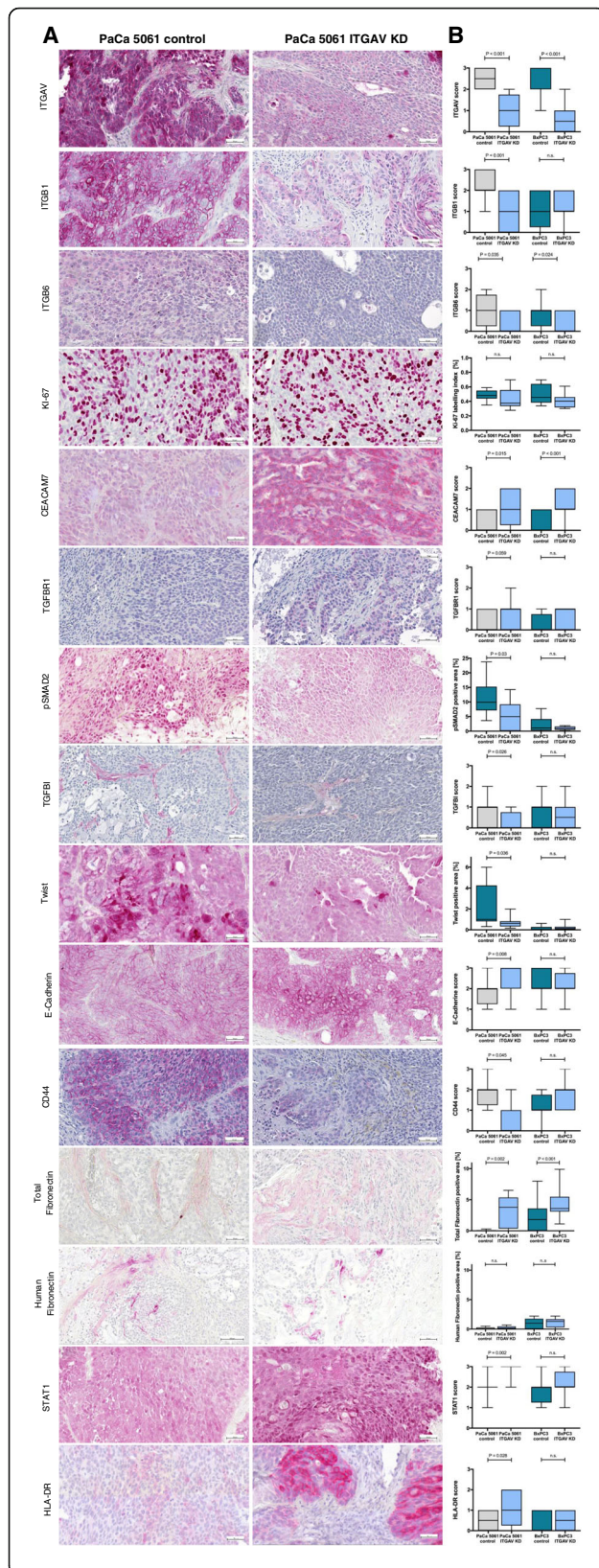
leukocyte antigen (HLA) system, were upregulated in the ITGAV KD xenograft tumors (i.e. HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB4, HLA-DRB5, HLA-DPA1 and HLA-DQB2). Exemplarily, we verified the upregulation of HLA-DR by immunohistochemistry (Fig. 6). Additionally, the upregulation of HLA-DR on PaCa 5061 ITGAV KD cells was also confirmed in vitro using flow



cytometry (Supplementary Fig. 2). Increased JAK-STAT signaling leads to increased expression of MHC class II genes [26] and, indeed, both JAK1 and STAT1 were found to be increased in the ITGAV KD xenografts. Using immunohistochemistry, an increased intranuclear STAT1 signal could also be confirmed in the corresponding ITGAV KD xenograft tumors at the protein level (Fig. 6).

When gene expression profiles of the SMAD4-deficient BxPC3 xenografts with knockdown of ITGAV were analyzed, no genes associated with TGF- $\beta$  signaling, EMT or immune status were found to be significantly regulated. We attribute this gene expression pattern to the malfunction of the canonical TGF- $\beta$  signaling pathway caused by the confirmed deletion of SMAD4 (Fig. 3d).





**Fig. 6** Representative images of immunohistochemical staining of ITGAV, ITGB1, ITGB6, Ki-67, CEACAM7, TGFBR1, pSMAD2, pSMAD2, TGFBI, Twist, E-cadherin, CD44, total and human fibronectin, STAT1 and HLA-DR (a) and quantification (b). The shown images are representative of three tumors harvested

Finally, ITGAV targets concordantly altered in both PaCa5061 and BxPC3 xenograft tumors could be assigned to the group of cell surface interactions (s. Supplementary Table 1). E.g., the adhesion molecule CEACAM7 was significantly upregulated in both models, as demonstrated by immunohistochemistry (Fig. 6).

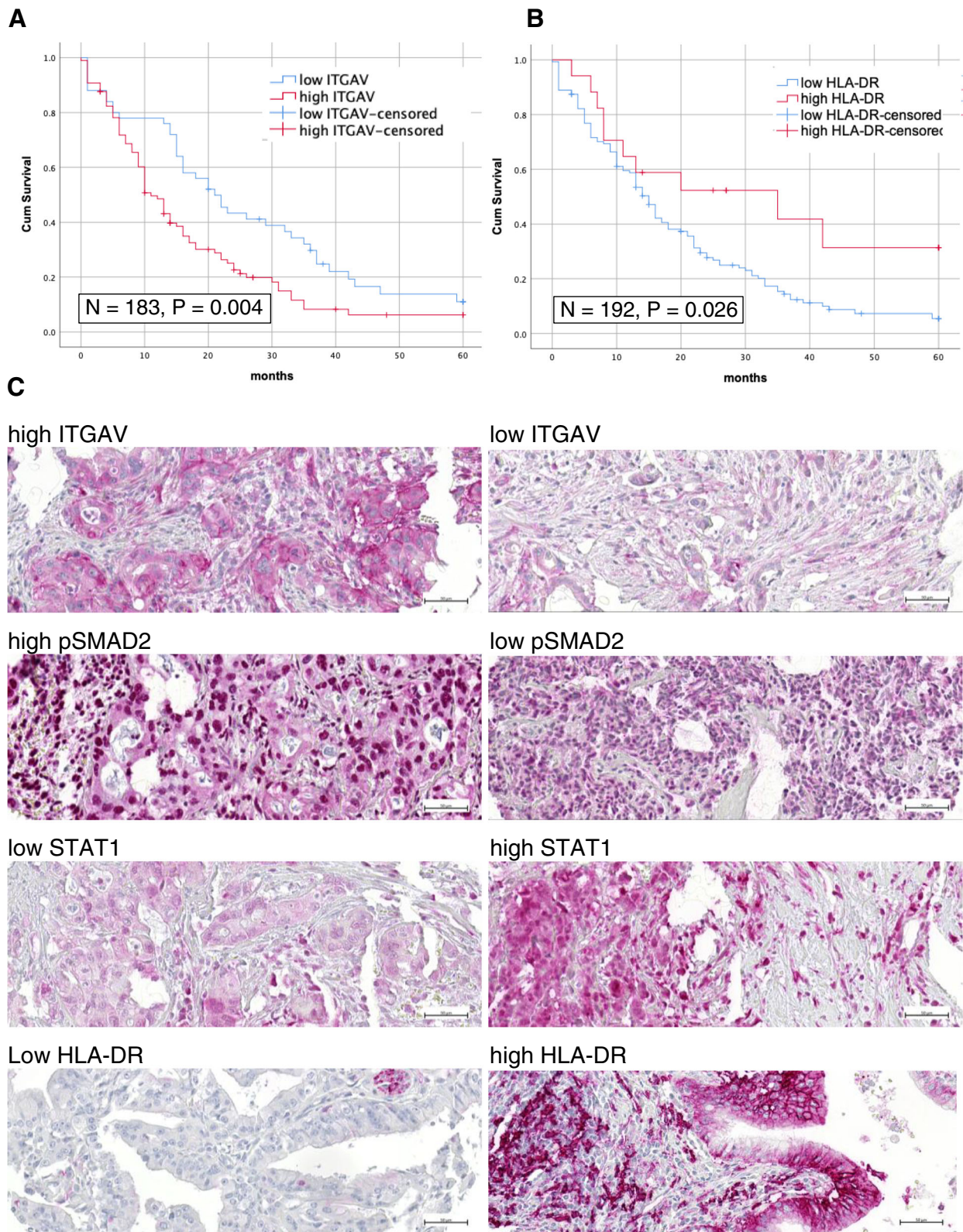
#### Clinical proof of concept using a tissue microarray

A high level of ITGAV expression in the PDA cells was found in 129 tissue samples (71%). These patients showed a significantly poorer outcome with a median survival of 11 (95% CI 8.6–13.3) months instead of 21 (95% CI 15.5–26.5) months in the group of patients with low ITGAV expression ( $P = 0.004$ , Fig. 7a). For 125 tissue samples (69%), a high percentage of pSMAD2-positive tumor cell nuclei was identified and ITGAV and phospho-SMAD2 staining intensities were positively correlated (Supplementary Table 2,  $P = 0.014$ ). However, there was no significant correlation for phospho-SMAD2 with survival ( $P = 0.127$ ). Ninety three tissue samples (58%) displayed a high expression of STAT1. No significant association existed between STAT1 and survival ( $P = 0.310$ ). High expression of HLA-DR was found in 22 tumor samples. Of these 22 tumors, 17 were also STAT1 positive. Hence, a positive correlation between STAT1 and HLA-DR expression was observed (Supplementary Table 2,  $P = 0.019$ ). This observation supports the connection between JAK-STAT signaling and the expression of HLA-DR. In our cohort, a better survival could be demonstrated for patients with high expression of HLA-DR by tumor cells with a median survival of 35 (95% CI 0.6–69.4) months compared with 15 (95% CI 12.9–17.1) months for patients with low HLA-DR expression (Fig. 7b). None of the staining results showed any correlation with gender, grading or tumor stage (Supplementary Table 2).

#### Discussion

In the present study, we could show that ITGAV expression was upregulated in intraperitoneal pancreatic ductal adenocarcinoma xenograft tumor cells that grew under selectin-deficient conditions, suggesting a compensatory increase in integrin expression. We could demonstrate that the knockdown of ITGAV led to a massive reduction in intraperitoneal carcinomatosis, primary tumor growth and pulmonary metastasis. Even more importantly, the effects of the absence of host selectins and ITGAV were synergistic, as clearly demonstrated in our





**Fig. 7** (See legend on next page.)



(See figure on previous page.)

**Fig. 7** Patients with high expression of ITGAV ( $N = 129$ ) had a significantly poorer survival with a mean survival of 11 months than patients with low expression of ITGAV ( $N = 54$ ) with a mean survival of 21 months (a). Patients with high expression of HLA-DR ( $N = 22$ ) showed a significantly better survival with a mean survival of 35 months than patients with low expression of HLA-DR ( $N = 170$ ) with a mean survival of 15 months (b). Representative tissue samples are given (c). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

intraperitoneal tumor model. This is the first model to describe such a synergism experimentally. These findings validate the hypothesis that cancer cell adhesion to mesothelial cells follows similar mechanisms as the leukocyte adhesion cascade, which is initiated by selectins followed by integrins [27]. Integrin-mediated cell adhesion also seems to be essential in compensating for the absence of selectin expression [28]. The observed increased expression in other cell adhesion molecules in the ITGAV KD tumors (e.g. the adhesion molecule CEACAM-7) might partly compensate for the reduction of ITGAV. Our findings indicate that the adhesion to the peritoneal mesothelium or its underlying basal lamina is the rate-limiting step of peritoneal carcinomatosis formation in PDA. Fortunately, this step is particularly amenable to therapeutic invention as the molecules involved are located on the cell surface. Therefore, blockade of both selectins and integrins is an attractive option to inhibit peritoneal metastasis in PDA.

A body of literature suggests that ITGAV activates latent TGF- $\beta$  in the ECM [19, 29]. We could demonstrate this for the SMAD4-intact PaCa 5061 cells, for which the concentration of active TGF- $\beta$ 1 is reduced due to the knockdown of ITGAV in vitro. Furthermore, the knockdown of ITGAV reduced the activity of phospho-SMAD2 in the xenograft tumors of the SMAD4-intact PaCa 5061 cells in vivo. Our gene expression analyses confirmed altered TGF- $\beta$ -signaling due to the knockdown of ITGAV in PaCa 5061 tumors, as described above. Moreover, there is an association between ITGAV and pSMAD2-positive tumors in the analyzed patient samples: high expression of ITGAV is connected with poorer survival. This observation corroborates data in the GEPIA2 webserver (Supplementary Fig. 3, [30]) and Human Protein Atlas [31], which show a correlation between ITGAV mRNA expression level and poor patient survival. Moreover, a recent study demonstrated that elevated serum soluble TGF- $\beta$  predicted poor survival in PDA [32].

At the beginning of the tumorigenic process, TGF- $\beta$ 1 functions as a tumor suppressor due to its ability to suppress cell division in epithelial cells [33]. Hezel et al. used a genetically engineered mouse model with  $Kras^{G12D}$ -initiated, SMAD4-deficient murine PDAs reflecting an early disease state and identified increased tumor cell proliferation through the blockade of integrin  $\alpha\beta$ 6 [34]. The cell lines used in our study originate from locally advanced human tumors, as commonly

present at the time of diagnosis. Our proliferation assay in vitro and the determination of the Ki-67 Labeling Index in the xenograft tumors show no changes in cell proliferation (Fig. 5b), suggesting that the examined cell lines are already resistant to the anti-proliferative effects of TGF- $\beta$ .

Bates et al. reported that a high level of integrin  $\alpha\beta$ 6 is accompanied by a poorer overall survival for colon carcinoma. They assumed the reason for this to be the integrin  $\alpha\beta$ 6-dependent activation of TGF- $\beta$ 1 and the resulting stimulation of EMT [35]. In PDA, high integrin  $\alpha\beta$ 6 mRNA levels were associated with shortened patient survival and antibody therapy directed against this dimer suppressed the pro-tumorigenic microenvironment (e.g. by suppression of TGF- $\beta$  signaling) in mouse models [7]. Besides the critical alterations induced by ITGAV in TGF- $\beta$  signaling for SMAD4 intact PDA (represented by PaCa 5061 in this study), the xenograft model with the SMAD4 dysfunctional BxPC3 cells demonstrates that there are also TGF- $\beta$  independent effects of ITGAV in PDA. The TMA data further corroborate this observation: Although Tumors were not stratified for functional SMAD4, ITGAV expression was still prognostic in the overall cohort. Together with the fact that half of all PDA display deletions / inactivating mutations of SMAD4 [20], this indicates that ITGAV is prognostic for SMAD4 functional as well as dysfunctional tumors. In prostate cancer, for example, AKT activation has been described as an additional mechanism for ITGAV involvement in a recent study [4]. Our study shows that the proportion of Twist-positive cells decreases through the knockdown of ITGAV in the SMAD4-intact PaCa 5061 cells. Twist controls the expression of epithelial gene signatures such as Occludin and E-cadherin [36] and indeed, expression of these epithelial genes increased upon ITGAV KD. In pharyngeal carcinoma, Van Aarsen et al. demonstrated that blocking with an integrin  $\alpha\beta$ 6 antibody reduced TGF- $\beta$ -induced SMAD2 phosphorylation, which resulted in diminished tumor growth and reduced invasive potential while an impact of the treatment on cell proliferation was not observed [37]. These effects were confirmed for PDA in our study.

In vivo, TGF- $\beta$ 1 is a potent activator of the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts, which are referred to as cancer-associated fibroblasts (CAFs) [38]. The increase in the ECM contraction caused by CAFs increases the probability of TGF- $\beta$  activation [38].

Interestingly, it has been shown that the heterogeneity of CAFs in PDA is mediated by JAK/STAT signaling antagonized by TGF- $\beta$  [39]. CAFs themselves interact with integrins and secrete a large number of proteins into the ECM matrix, proteases and cytokines, which can further increase cancer progression [40]. For example, CAFs deposit fibronectin in the ECM, thereby creating promigratory tracks [41]. It is assumed that CAFs themselves express ITGAV and hence can also activate latent TGF- $\beta$  [42]. Consistently, we found an upregulation of murine fibronectin in the xenograft tumors with ITGAV KD (see Fig. 5a and e).

Highly interesting is the immunomodulatory effect of the ITGAV knockdown found in our study, especially since results for immunotherapy of PDA [43] must be considered disappointing so far. To our knowledge, the observed changes in MHC-II expression by PDA have not been described before. However, to fully investigate the implications of these alterations, a suitable new in vivo model with an intact adaptive immune system would be needed, e.g. a syngenic model. As MHC-II is required for CD4+ T-cell activation, which also plays essential roles in antitumor immunity [44], further investigations in this field could prove highly rewarding.

## Conclusions

The ITGAV knockdown of PDA massively suppressed the intraperitoneal carcinomatosis of these cells. Moreover, the effects of the absence of selectins and reduced expression of ITGAV on intraperitoneal carcinomatosis are synergistic, confirming the hypothesis of a multistep and partly redundant leukocyte adhesion cascade as the rate-limiting step within the metastatic cascade. Mechanistically, ITGAV activates TGF- $\beta$  and drives epithelial-mesenchymal transition PDA cells. Specific inhibition of ITGAV may have the potential to impede intraperitoneal carcinomatosis, tumor growth and distant metastasis.

## Abbreviations

PDA: Pancreatic ductal adenocarcinoma; shRNA: Short hairpin RNA; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; PCI: Peritoneal carcinomatosis index; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; TMA: Tissue microarray; KD: Knockdown; ECM: Extracellular matrix; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; HLA: Human leucocyte antigen; CAFs: Cancer-associated fibroblasts

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01946-2>.

**Additional file 1: Supplementary Figure 1.** Representative images of colonies formed by BxPC3 control (A) and BxPC3 ITGAV KD (B) cells after 14 d. BxPC3 ITGAV KD cells formed fewer spheroid colonies per well than the control cells ( $P = 0.0134$ , Fig. 4F).

**Additional file 2: Supplementary Figure 2.** Changes HLA-DR using flow cytometry: HLA-DR is upregulated on PaCa 5061 ITGAV KD cells. The signal of HLA-DR on BxPC3 cells was very low.

**Additional file 3: Supplementary Figure 3.** For an in silico analysis of the association between gene expression and patient survival in the GEPI A2 webserver, we used the heterodimer ITGAV and ITGB6 as a signature. High expression of ITGAV and ITGB6 is associated with poor survival ( $P < 0.001$ ).

**Additional file 4: Supplementary Table 1.** Changes in expression of genes involved in cell surface interaction of PaCa 5061 and BxPC3 xenograft tumors. **Supplementary Table 2.** Clinico-pathological data of patients with pancreatic adenocarcinoma correlated with ITGAV, pSMAD2, STAT1 and HLA-DR.

## Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Guido Sauter for providing the tissue microarray and Christine Knies, Tobias Gosau, Jenniffer Schröder-Schwarz, Maïke Märker, Lisa Staffeldt and Ursula Makowski for excellent technical and organizational support.

## Authors' contributions

MK, AS, HM, SN, AP, MT and FG designed experiments, conducted experiments and analyzed data. MK and DW drafted the manuscript. VG, TL, KR, AT, AA, JI, US, DW interpreted data and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work was supported by grants from the Hamburger Gesellschaft zur Förderung der Krebsbekämpfung (Project no. 192, Daniel Wicklein) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI 5115/2–1, Daniel Wicklein and AI 24/21–1, Achim Aigner). Marius Kemper was supported by the Clinician Scientist Program of the University Medical Centre Hamburg-Eppendorf.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol was approved by the Hamburg Medical Chamber's ethics committee (Approval number: PV3548).

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

### Author details

<sup>1</sup>Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. <sup>2</sup>Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Medical-Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>3</sup>Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia. <sup>4</sup>Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. <sup>5</sup>Department of General, Visceral and Tumor Surgery, University Hospital Cologne, Köln, Germany. <sup>6</sup>Research Department Cell and Gene Therapy, Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>7</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics University, Moscow, Russia. <sup>8</sup>Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

Received: 1 December 2020 Accepted: 13 April 2021

Published online: 26 June 2021

## References

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN

- sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941–53. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
2. Tanaka M, Mihaljevic AL, Probst P, Heckler M, Klaiber U, Heger U, et al. Meta-analysis of recurrence pattern after resection for pancreatic cancer. *BJS*. 2019;106(12):1590–601. <https://doi.org/10.1002/bjs.11295>.
  3. Gebauer F, Wicklein D, Stübke K, Nehmann N, Schmidt A, Salamon J, et al. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp<sup>−</sup>/rag2<sup>−</sup> mice. *Gut*. 2013;62(5):741–50. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300629>.
  4. Ciardiello C, Leone A, Lanuti P, Roca MS, Moccia T, Minciaccchi VR, et al. Large oncosomes overexpressing integrin alpha-V promote prostate cancer adhesion and invasion via AKT activation. *J Exp Clin Cancer Res Cr*. 2019;38(1):317. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1317-6>.
  5. Milone MR, Pucci B, Bifulco K, Iannelli F, Lombardi R, Ciardiello C, et al. Proteomic analysis of zoledronic-acid resistant prostate cancer cells unveils novel pathways characterizing an invasive phenotype. *Oncotarget*. 2014;6:5324–41.
  6. Wang Q, Yu C. Identification of biomarkers associated with extracellular vesicles based on an integrative pan-cancer bioinformatics analysis. *Med Oncol*. 2020;37(9):79. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01404-7>.
  7. Reader CS, Vallath S, Steele CW, Haider S, Brentnall A, Desai A, et al. The integrin  $\alpha v \beta 6$  drives pancreatic cancer through diverse mechanisms and represents an effective target for therapy. *J Pathol*. 2019;249(3):332–42. <https://doi.org/10.1002/path.5320>.
  8. Moore KM, Desai A, de Delgado B, Trabulo SMD, Reader C, Brown NF, et al. Integrin  $\alpha v \beta 6$ -specific therapy for pancreatic cancer developed from foot-and-mouth-disease virus. *Theranostics*. 2020;10:2930–42.
  9. Kalinina T, Güngör C, Thielges S, Möller-Krull M, Penas EMM, Wicklein D, et al. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*. 2010;10(1):295. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-295>.
  10. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*. 1986;4(1):15–23. <https://doi.org/10.3109/07357908609039823>.
  11. Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U, Fehse B. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther*. 2009;17:511–20.
  12. Wicklein D. RNAi technology to block the expression of molecules relevant to metastasis: the cell adhesion molecule CEACAM1 as an instructive example. *Methods Mol Biol Clifton N J*. 2012;878:241–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_16).
  13. Sugarbaker PH. Surgical responsibilities in the management of peritoneal carcinomatosis. *J Surg Oncol*. 2010;101:713–24.
  14. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Brit J Cancer*. 2010;102(11):1555–77. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642>.
  15. Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, Müller R. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem*. 2010;112(5):489–96. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.05.004>.
  16. Lange T, Ullrich S, Müller I, Nentwich MF, Stübke K, Feldhaus S, et al. Human prostate cancer in a clinically relevant Xenograft mouse model: identification of  $\beta(1,6)$ -branched oligosaccharides as a marker of tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1364–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2900>.
  17. Bamberger A, Methner C, Lisboa B, Städtler C, Schulte H, Löning T, et al. Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer*. 1999;84(5):533–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991022\)84:5<533::AID-IJC16>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19991022)84:5<533::AID-IJC16>3.0.CO;2-J).
  18. Dancau A-M, Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Methods in molecular biology. *Methods Mol Biol*. 2016;1381:53–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3204-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3204-7_3).
  19. Khan Z, Marshall JF. The role of integrins in TGF $\beta$  activation in the tumour stroma. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3): 657–73. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2474-y>.
  20. 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. <https://doi.org/10.1038/nature14169>.
  21. Birbeck M, Wheatley D. An electron microscopic study of the invasion of ascites tumor cells into the abdominal wall. *Cancer Res*. 1965;25:490–7.
  22. Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB. Integrin  $\alpha v \beta 6$ -mediated activation of latent TGF- $\beta$  requires the latent TGF- $\beta$  binding protein-1. *J Cell Biol*. 2004;165(5):723–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>.
  23. Costanza B, Rademaker G, Tamiou A, Tullio PD, Leenders J, Blomme A, et al. Transforming growth factor beta-induced, an extracellular matrix interacting protein, enhances glycolysis and promotes pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer*. 2019;145(6):1570–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.32247>.
  24. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>.
  25. Li X-P, Zhang X-W, Zheng L-Z, Guo W-J. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:6724–31.
  26. Stickle N, Hanke K, Marschner D, Prinz G, Köhler M, Melchinger W, et al. MicroRNA-146a reduces MHC-II expression via targeting JAK/STAT signaling in dendritic cells after stem cell transplantation. *Leukemia*. 2017;31(12):2732–41. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.137>.
  27. Sökelland G, Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer*. 2019;18(1):12. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0937-3>.
  28. Schwankhaus N, Gathmann C, Wicklein D, Riecken K, Schumacher U, Valentiner U. Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(4):483–96. <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9643-8>.
  29. Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, et al. Targeting of  $\alpha v$  integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med*. 2013;19:1617–24.
  30. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W98–102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>.
  31. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhorji G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017;357: eaan2507.
  32. Park H, Bang J, Nam A, Park J, Jin M, Bang Y, et al. The prognostic role of soluble TGF- $\beta$  and its dynamics in unresectable pancreatic cancer treated with chemotherapy. *Cancer Med*. 2020;9(1):43–51. <https://doi.org/10.1002/cam4.2677>.
  33. Zhao M, Mishra L, Deng C-X. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci*. 2018;14(2):111–23. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23230>.
  34. Hezel AF, Deshpande V, Zimmerman SM, Contino G, Alagesan B, O'Dell MR, et al. TGF- $\beta$  and  $\alpha v \beta 6$  integrin act in a common pathway to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Res*. 2012;72(18):4840–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0634>.
  35. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, et al. Transcriptional activation of integrin  $\beta 6$  during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest*. 2005;115(2):339–47. <https://doi.org/10.1172/JCI200523183>.
  36. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156–72. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.
  37. Aarsen LAKV, Leone DR, Ho S, Dolinski BM, McCoon PE, LePage DJ, et al. Antibody-mediated blockade of integrin  $\alpha v \beta 6$  inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor- $\beta$ -regulated mechanism. *Cancer Res*. 2008;68(2):561–70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2307>.
  38. Wipff P-J, Rifkin DB, Meister J-J, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- $\beta$ 1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*. 2007;179(6):1311–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>.
  39. Biffi G, Oni T, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, et al. IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF $\beta$  to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;9:282–301.
  40. Miles FL, Sikes RA. Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. *Mol Cancer Res Mcr*. 2014;12(3):297–312. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0535>.
  41. Attieh Y, Clark AG, Grass C, Richon S, Pocard M, Mariani P, et al. Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin- $\beta 3$ -dependent fibronectin assembly. *J Cell Biol*. 2017;216(11):3509–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702033>.
  42. Hinz B. It has to be the  $\alpha v$ : myofibroblast integrins activate latent TGF- $\beta$ 1. *Nat Med*. 2013;19(12):1567–8. <https://doi.org/10.1038/nm.3421>.

43. Aroldi F, Zaniboni A. Immunotherapy for pancreatic cancer: present and future. *Immunotherapy*. 2017;9(7):607–16. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0142>.
44. Haabeth O, Tveita A, Fauskanger M, Schjesvold F, Lørvik K, Hofgaard P, et al. How do CD4+ T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules? *Front Immunol*. 2014;5:174.

### **Publisher's Note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

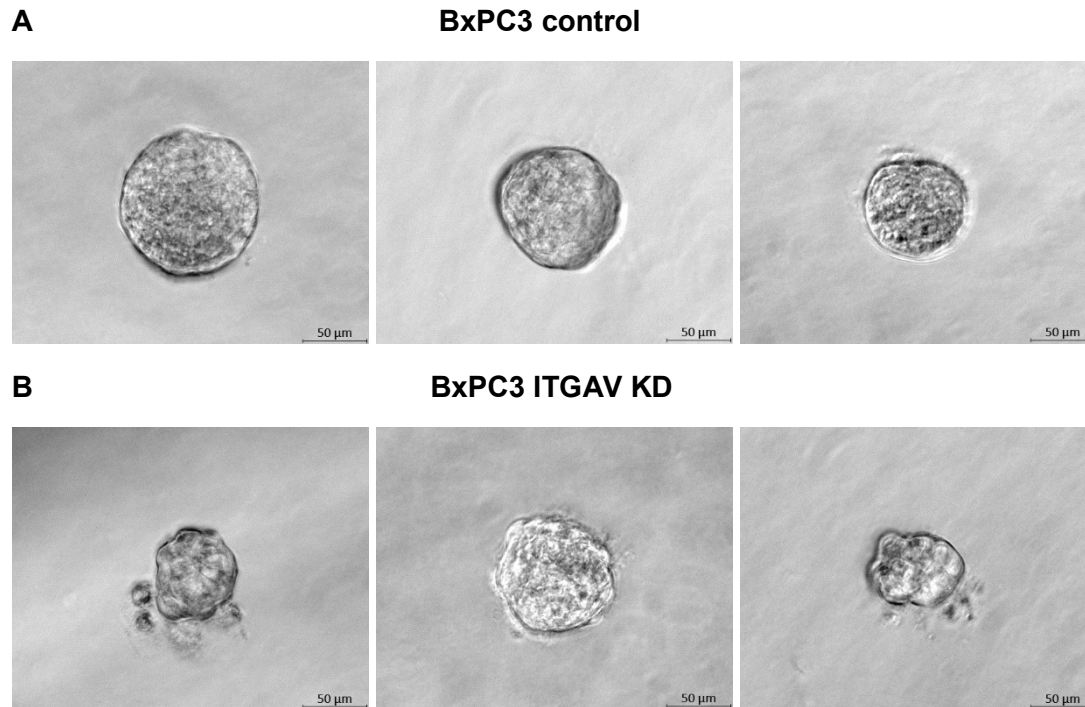
- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

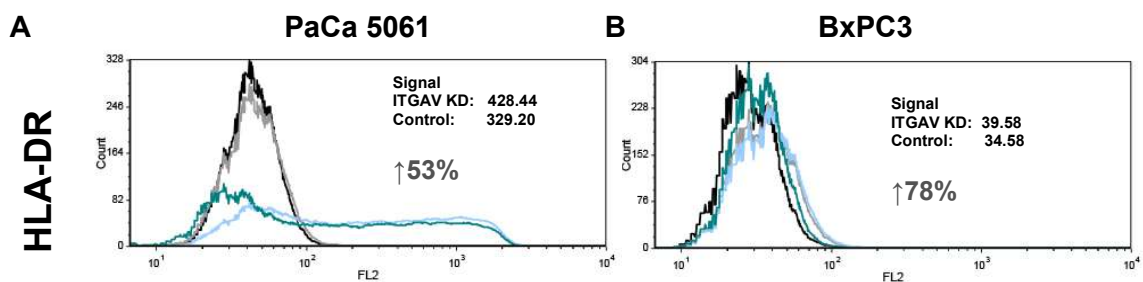
Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



### 2.3.1 Additional files

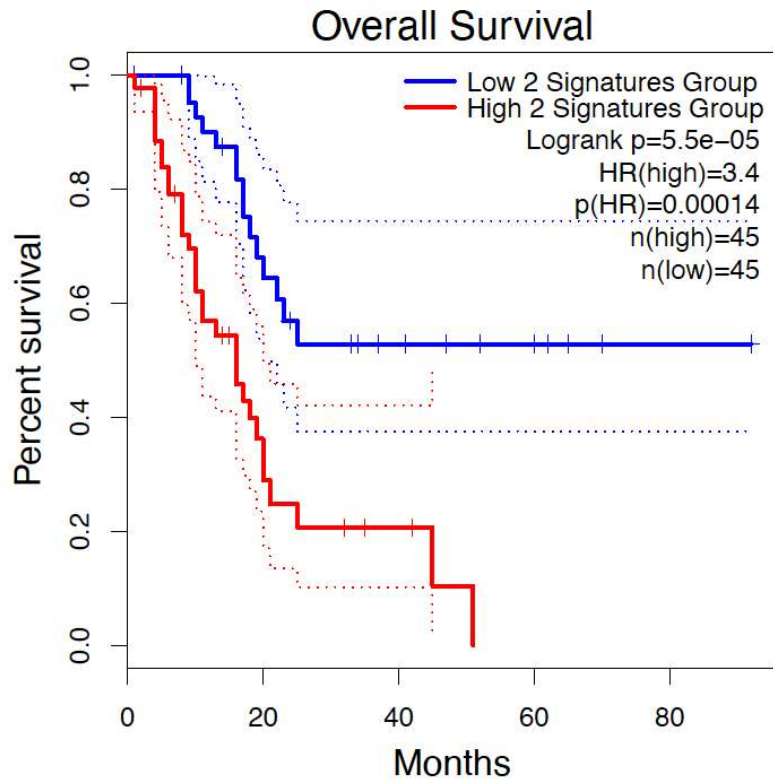


**Supplementary Figure 1** Representative images of colonies formed by BxPC3 control (**A**) and BxPC3 ITGAV KD (**B**) cells after 14 d. BxPC3 ITGAV KD cells formed fewer spheroid colonies per well than the control cells ( $P = 0.0134$ , Fig. 4F).



**Supplementary Figure 2** Changes HLA-DR using flow cytometry: HLA-DR is upregulated on PaCa 5061 ITGAV KD cells (**A**). The signal of HLA-DR on BxPC3 cells was very low (**B**).





**Supplementary Figure 3** For an in silico analysis of the association between gene expression and patient survival in the GEPIA2 webserver, we used the heterodimer ITGAV and ITGB6 as a signature. High expression of ITGAV and ITGB6 is associated with poor survival ( $P < 0.001$ ).

**Supplementary Table 1** Changes in expression of genes involved in cell surface interaction of PaCa 5061 and BxPC3 xenograft tumors.

Gene Symbol	PaCa 5061			BxPC3		
	Fold Change	P	FDR adj. P	Fold Change	P	FDR adj. P
CD44	<b>-8.94</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.007</b>	1.21	0.492	0.987
CEACAM1	2.94	0.027	0.242	2.58	<b>0.017</b>	0.886
CEACAM3	1.03	0.387	0.787	1.13	0.249	0.958
CEACAM5	7.07	<b>0.024</b>	0.224	2.79	0.184	0.944
CEACAM7	<b>9.7</b>	<b>0.003</b>	<b>0.062</b>	7.56	<b>0.002</b>	0.582
CEACAM8	1.21	0.435	0.816	1.56	0.065	0.907
DSG3	-2.17	0.102	0.475	4.5	0.022	0.887
ITGA10	1.03	0.761	0.945	1	0.976	0.999
ITGA11	1.04	0.480	0.839	1.01	0.936	0.999
ITGA2	-1.51	0.883	0.976	1.45	0.107	0.910
ITGA2B	1.01	0.787	0.952	1.05	0.492	0.987
ITGA3	<b>-1.91</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.012</b>	1.39	0.408	0.979
ITGA4	1.08	0.469	0.833	1.04	0.831	0.999
ITGA5	1.23	0.681	0.920	2.69	<b>0.005</b>	0.778
ITGA6	-2.39	<b>0.034</b>	0.271	1.91	0.012	0.864
ITGA7	1.22	0.182	0.608	1.05	0.972	0.999
ITGA8	1.03	0.811	0.958	1.03	0.571	0.992
ITGA9	1.07	0.543	0.867	1.02	0.382	0.974
ITGAM	-1.23	0.028	0.248	1.03	0.848	0.999
ITGB1	-1.29	0.265	0.697	1.55	0.114	0.913
ITGB2	1.04	0.706	0.929	-1.06	0.563	0.991
ITGB3	<b>1.46</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.010</b>	-1.02	0.934	0.999
ITGB5	1.19	0.437	0.817	1.25	<b>0.084</b>	0.910
ITGB6	1.7	<b>0.010</b>	0.140	1.54	<b>0.024</b>	0.887
ITGB7	1.12	<b>0.034</b>	0.271	1.08	<b>0.078</b>	0.910
ITGB8	1.33	<b>0.035</b>	0.273	2.31	<b>0.012</b>	0.864
OCLN	<b>17.35</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.010</b>	-1.01	0.596	0.992
PDPK1	-1.66	<b>0.008</b>	0.119	-1.23	0.714	0.996
RAP1A	<b>2.34</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0.011</b>	-1.23	0,5672	0,9912
ROCK1P1	<b>-3.31</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>	1,26	0,8422	0,9992

**Supplementary Table 2** Clinico-pathological data of patients with pancreatic adenocarcinoma correlated with ITGAV, pSMAD2, STAT1 and HLA-DR.

	low ITGAV	High ITGAV	P	Low pSMA2	High pSMA2	P	Low STAT1	High STAT1	P	Low HLA-DR	High HLA-DR	P
<b>Gender</b>			0.297			0.426			0.174			0.137
<b>Male</b>	33	68		33	67		39	44		98	9	
<b>Female</b>	21	61		22	58		28	49		72	13	
<b>pT</b>			0.866			0.345			0.950			0.551
<b>pT1</b>	2	5		2	4		2	3		5	2	
<b>pT2</b>	13	38		12	37		20	24		48	6	
<b>pT3</b>	37	80		40	76		42	61		109	13	
<b>pT4</b>	2	6		1	8		3	5		8	1	
<b>pN</b>			0.078			0.874			0.366			0.865
<b>pN0</b>	25	42		20	47		27	31		65	8	
<b>pN1</b>	29	87		35	78		40	62		105	14	
<b>pM</b>			0.215			0.853			0.225			0.090
<b>M0</b>	53	121		52	119		62	90		162	19	
<b>M1</b>	1	8		3	6		5	3		8	3	
<b>Grading</b>			0.922			0.642			0.701			0.522
<b>G1</b>	2	5		2	4		3	2		9	0	
<b>G2</b>	26	57		22	60		29	42		75	11	
<b>G3</b>	26	56		30	60		34	48		84	11	
<b>AJCC classification</b>			0.384			0.926			0.289			0.563
<b>IA</b>	1	4		1	3		0	3		4	1	
<b>IB</b>	7	14		7	15		10	9		20	3	
<b>IIA</b>	16	22		12	26		16	17		38	3	
<b>IIB</b>	27	76		31	68		34	56		93	11	
<b>III</b>	2	5		1	7		2	5		7	1	
<b>IV</b>	1	8		3	6		5	3		8	3	
<b>ITGAV</b>						<b>0.014</b>			0.607			0.578
<b>Low</b>	-	-		23	30		19	24		46	5	
<b>High</b>	-	-		30	91		44	67		109	16	
<b>STAT1</b>			0.607			0.680						<b>0.019</b>
<b>Low</b>	19	44		21	41		-	-		61	4	
<b>High</b>	24	67		27	61		-	-		71	17	



## 2.4 Darstellung des Eigenanteils am Manuskript „*Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression*“

Die wissenschaftliche Arbeit „*Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression*“ wurde in der Fachzeitschrift *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2021 veröffentlicht. Diese Arbeit wurde von mehreren Autoren angefertigt, daher möchte ich hier genau darlegen, welchen Beitrag ich für dieses Manuskript geleistet habe.

Die Ausarbeitung der Erstschrift stammt von Dr. Marius Kemper (Erstautor), ich habe Anmerkungen oder Verbesserungsvorschläge mit eingebracht und Teile bei den Materialien und Methoden (Durchflusszytometrie, Western Blot und Kolonieformation) ergänzt.

Die durchflusszytometrische Messung für die Darstellung der Integrin- und HLA-DR-Expressionslevel sowie die dazugehörigen Histogramme (Fig. 2A, B, Supplementary Fig. 2) habe ich durchgeführt beziehungsweise erstellt. Die Zellyse für die Proteingewinnung und die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test beider dargestellter Western Blots wurden von mir durchgeführt. Ebenso wurde die Durchführung des Western Blots (Fig. 2C) von mir geplant, allerdings von einer hilfswissenschaftlichen Mitarbeiterin durchgeführt. Der Western Blot, der die Expression des SMAD4-C-Terminus zeigt (Fig. 3D), wurde von mir geplant, durchgeführt und die Abbildung erstellt. Der Assay zur Analyse der Kolonieformation wurde gleichfalls von mir geplant, durchgeführt und ausgewertet, ebenso habe ich die Beispielbilder erstellt (Fig. 4F, Supplementary Fig. 1).

Hamburg,



.....  
Betreuer (Prof. Dr. Daniel Wicklein)

## 2.5 Zusätzlich durchgeführte Versuche

Im Rahmen beider Projekte wurden zusätzliche Versuche zur funktionellen Untersuchung von ITGA3 beziehungsweise ITGAV durchgeführt, die allerdings nicht in die Manuskripte aufgenommen wurden. Alle unten aufgeführten Versuche habe ich selbstständig geplant, durchgeführt, ausgewertet und die Abbildungen erstellt. Die Tierversuche habe ich selbst betreut und die Mäuse beurteilt. Sie erfolgten mit Unterstützung von Tobias Gosau und Espen Matschl (BTAs).

Da in dem beschriebenen Überlebensversuch (siehe Abschnitt 2.1) aufgrund mehrerer Abbruchkriterien die Bewertung der entstandenen Peritonealkarzinosen manchmal sehr schwierig war, wurde ein weiterer Tierversuch mit gesetztem Endpunkt durchgeführt. Bei diesem Endpunktversuch wurden mehrere Integrin-Untereinheiten gleichzeitig getestet, wodurch sich die unterschiedlichen Effekte beim Vergleich der PDAC-Zelllinien gut bewerten ließen. Der Versuch wurde gleichermaßen, wie in Abschnitt 2.1 (*Methods: Intraperitoneal xenograft mouse model*) beschrieben, durchgeführt. Allerdings unterschied er sich insofern, als dass alle Tiere am gleichen Tag (beim PaCa5061-Modell nach 33 Tagen und beim BxPC-3-Modell nach 34 Tagen) aus dem Versuch genommen wurden, sobald eine Maus innerhalb des Versuchs eines der Abbruchkriterien erreicht hatte. Danach wurde die entstandene Peritonealkarzinose bewertet und das Gewicht der Stichkanaltumore, die infolge der Injektion entstanden waren, bestimmt (Abb. 4). Bei den SCID-Mäusen, denen PaCa5061-Zellen (Kontroll- und ITGA3-*knockdown*-Gruppe n=6, ITGAV-*knockdown*-Gruppe n=7) injiziert worden waren, zeigte sich in der ITGA3-*knockdown*-Gruppe auch hier kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die entstandene Peritonealkarzinose sowie auf die Stichkanaltumore. Allerdings konnte auch bei diesem Versuch beobachtet werden, dass durch die ITGAV-Depletion von PaCa5061 signifikant weniger Peritonealkarzinose entstanden war ( $p < 0,001$ ; Abb. 4A). Nach der Injektion von BxPC-3-Zellen (Kontrollgruppe: n=7, ITGA3- und ITGAV-*knockdown*-Gruppe n=8) zeigten sich sowohl nach ITGA3- als auch nach ITGAV-Depletion zwar keine signifikanten Unterschiede in der Ausbildung peritonealer Metastasen im Vergleich zu den Mäusen aus der Kontrollgruppe, es hatte jedoch lediglich eine Maus aus der ITGA3-*knockdown*-Gruppe überhaupt eine Peritonealkarzinose entwickelt. Zusätzlich waren die Stichkanaltumore in der ITGA3-*knockdown*-Gruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ( $p = 0.0198$ ). Der ITGAV-*knockdown* hatte keinen Effekt auf die Größe der Stichkanaltumore (Abb. 4B). Trotz der relativ kurzen Versuchszeit wurde mittels Alu-PCR (siehe Abschnitt 2.3, *Methods: Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)*) überprüft, ob CTCs im Blut oder Fernmetastasen in der Lunge, der Leber oder im Knochenmark der Mäuse nachweisbar waren. Insgesamt ließen sich, bis auf wenige Individuen, kaum humane Zellen in der Maus-DNA detektieren. Es gab bei keiner der

Untersuchungen signifikante Unterschiede in der CTC-/Metastasenlast infolge des ITGA3- oder ITGAV-*knockdowns* im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5).

Für das Vorhaben eines Nanopartikel-basierten therapeutischen Modells sollte die E- und P-Selektin-Expression auf den Endothel-/Mesothelzellen der Mäuse und die ITGA3-beziehungsweise ITGAV-Expression auf den humanen Tumorzellen durch siRNA *in vivo* reduziert werden. Die besten siRNA-Sequenzen gegen murines E- und P-Selektin und humanes ITGA3 und ITGAV wurden zunächst *in vitro* validiert. Der Transport der siRNA sollte mittels Bildung von Nanopartikelkomplexen durch die Kopplung an Polyethylenimin (PEI) möglich gemacht werden (Aigner, 2006). Diese Nanopartikelkomplexe haben den Vorteil einer geringen Toxizität, sie schützen die siRNA gegen den schnellen Abbau oder die Ausscheidung und gelangen aufgrund ihrer geringen Größe vermutlich besser und zuverlässiger in das Zielgewebe. Diese siRNA/PEI-Komplexe wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Aigner intensiv untersucht und in *in vivo*-Studien zur Behandlung von Tumor-tragenden Mäusen erfolgreich eingesetzt (Höbel et al., 2010; Höbel et al., 2008).

Es wurden mehrere siRNA-Sequenzen in Kombination mit unterschiedlichen Polymeren *in vitro* getestet. Die durchflusszytometrische Messung zum Nachweis der transienten *knockdown*-Effizienzen erfolgte 72 h nach Transfektion und wurde in den meisten Fällen in Kombination mit dem Polymer LP10Y (*tyrosine-modified linear 10 kDa polyethylenimine*) erzielt. Daher wurden für die folgenden *in vitro*-Versuche siRNA/LP10Y-Komplexe eingesetzt. Die murine Endothelzelllinie bEND3 wurde vier Stunden vor der Messung mit IL-1 $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert, um die Expression von E-/P-Selektin zu induzieren. Durch Inkubation der bEND3-Zellen mit einem gegen E- oder P-Selektin gerichteten siRNA/LP10Y-Komplex ließ sich die Expression des E-Selektins um 59 % und die des P-Selektins um 75 % reduzieren (Abb. 6A). Durch Inkubation der Tumorzellen mit gegen ITGA3 beziehungsweise ITGAV gerichteten siRNA/LP10Y-Komplexen konnte die ITGA3-Expression nach 72 h auf Panc89-Zellen um 64 %, auf BxPC-3-Zellen um 57 % und auf PaCa5061-Zellen um 41 % reduziert werden. Die ITGAV-Expression war auf Panc89- und BxPC-3-Zellen jeweils um 75 % und auf PaCa5061-Zellen um 39 % reduziert (Abb. 6B).

Da in den vorangegangenen Tierversuchen der größte Überlebensvorteil durch die shRNA-vermittelte ITGA3-Depletion in Panc89-Zellen erzielt werden konnte (die Mäuse überlebten im Schnitt 42,5 Tage länger als die aus der Kontrollgruppe (siehe Abschnitt 2.1, Fig. 2A)), lag es nahe, das Therapie-Xenograftmodell mit Panc89-Zellen durchzuführen und mit siITGA3/LP10Y-Lipopolyplexen zu behandeln. Parentale Panc89-Zellen wurden intraperitoneal in SCID-Mäuse (n=15 je Gruppe) injiziert (siehe Abschnitt 2.1, *Methods: Intraperitoneal xenograft mouse model*). Die erste therapeutische Behandlung wurde 72 h nach der Tumorzellinjektion ebenfalls intraperitoneal verabreicht. Eine Gruppe wurde mit siITGA3/LP10Y- und die Kontrollgruppe mit siLuc3/LP10Y-Lipopolyplexen behandelt. Die

therapeutische Injektion wurde zweimal wöchentlich und insgesamt 13-mal gegeben (Abb. 7). Die einzigen Abbruchkriterien für diesen Versuch waren die Größe der Stichkanaltumore und/oder eine Ulzeration der Haut. Es ließ sich kein Überlebensvorteil und auch kein Unterschied in der Größe der Stichkanaltumore zugunsten der siITGA3-*knockdown*-Gruppe feststellen (Abb. 8A, B). Die Mäuse beider Versuchsgruppen entwickelten nur in Ausnahmefällen überhaupt eine Peritonealkarzinose, die nur in wenigen Bereichen der Peritonealhöhle detektiert werden konnte (Abb. 8C, D). Ebenso zeigten sich auch bei der Bildung von malignem Aszites keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 8E). Da nur bei sehr wenigen Mäusen überhaupt eine Peritonealkarzinose entstanden war, wurden in diesem Versuch die Stichkanaltumore für die Analyse aufbereitet (siehe Abschnitt 2.1, *Methods: Ex vivo flow cytometric analysis of xenograft tumour samples*). Es ließen sich weder eine ITGA3-Reduktion noch eine Gegenregulation anderer Integrin-Untereinheiten in den Stichkanaltumoren infolge der siITGA3/LP10Y- im Vergleich zur siLuc3/LP10Y-Behandlung nachweisen (Abb. 9).

Des Weiteren wurde für die ITGAV-Studie ergänzend untersucht, ob es zur Gegenregulation anderer Integrin-Untereinheiten infolge des ITGAV-*knockdowns in vitro* gekommen war. Diese Messung erfolgte gleichfalls mittels Durchflusszytometrie und für beide PDAC-Zelllinien. Bei PaCa5061-Zellen wurden durch den ITGAV-*knockdown* die Untereinheiten ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGB1 und ITGB6 um mehr als 30 % herunterreguliert. Bei BxPC-3 hingegen wurde nur ITGB6 um mehr als 30 % herunterreguliert und ITGA5 um mehr als 30 % hochreguliert. Die Expression der anderen Integrin-Untereinheiten veränderte sich nur geringfügig (Abb. 10). Es wurde der in Abschnitt 2.1 beschriebene Adhäsions-Assay (*Methods: Adhesion assay to ECM*) auch mit PaCa5061-Zellen und dem ITGAV-*knockdown* durchgeführt, allerdings nur auf Collagen I und Collagen IV, Fibronektin und Laminin I. Die PaCa5061 ITGAV-*knockdown*-Zellen adhärirten signifikant weniger an Fibronektin ( $p < 0.001$ ) als die Zellen mit einer normalen ITGAV-Expression. Auf den anderen Substraten ließen sich keine Unterschiede aufgrund des *knockdowns* nachweisen (Abb. 11).

### 3 Diskussion

Die Diagnose eines Pankreaskarzinoms bedeutet für die Patient:innen in den meisten Fällen eine äußerst geringe Überlebenswahrscheinlichkeit. Zum Zeitpunkt des Krankheitsbefundes haben fast immer bereits metastatische Prozesse stattgefunden und der Primärtumor hat in das Peritoneum, die Lunge und/oder die Leber gestreut, wodurch eine kurative Therapie so gut wie unmöglich ist. Trotz erheblicher Fortschritte in der medizinischen Forschung konnte in den letzten Jahren keine bedeutende Verbesserung der therapeutischen Optionen für PDAC-Patient:innen erreicht werden. Umso wichtiger ist es, die Progression und die einzelnen molekularen Schritte der Metastasierungskaskade des Pankreaskarzinoms besser zu verstehen, sie genau zu analysieren und neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien BxPC-3 und PaCa5061 ausgewählt. Beide Zelllinien entstammen einem humanen Primärtumor des Pankreas. Für die ITGA3-Studie wurde noch zusätzlich eine dritte humane Zelllinie, Panc89, untersucht, welche aus einer Lymphknotenmetastase stammt. Diese Zelllinien weisen verschiedene genetische Veränderungen auf: PaCa5061 hat ein mutiertes KRAS-Gen, während die p53- und SMAD4-Gene in der Wildtyp-Form vorliegen und CEACAM1, 5 und 6 stark überexprimiert sind (Kalinina et al., 2010). BxPC-3 hat ein KRAS-Wildtyp-Gen und mutierte p53-, p16- und SMAD4-Gene (Berrozpe et al., 1994; Moore et al., 2001). Panc89 ist KRAS-Wildtyp (Moore et al., 2001), p53 und p16 sind mutiert und SMAD4 liegt als Wildtyp vor (Moore et al., 2001). Alle drei Zelllinien zeigen eine Überexpression von CEA (Kalinina et al., 2010; Sipos et al., 2003). Auch bei Patient:innen ist die genetische Variabilität der Pankreaskarzinome sehr hoch (siehe Abschnitt 1.1), dies wird durch die Zelllinien gut repräsentiert.

#### 3.1 ITGA3 sowie ITGAV begünstigen die Progression der Peritonealkarzinose und führen zu einem verringerten Überleben

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhebliche Reduktion des ITGA3-Levels auf der Oberfläche der PDAC-Zellen zu einem Überlebensvorteil *in vivo* führte. Durch die ITGA3-Depletion wurden sowohl das Gesamtgewicht der Peritonealkarzinose-Tumormasse als auch deren Verbreitung in der Peritonealhöhle und die Entstehung von malignem Aszites gehemmt. In einer multivariaten Analyse konnte ebenfalls herausgefunden werden, dass die Expression von ITGA3 die Bildung von Lebermetastasen unabhängig von den klinisch-pathologischen Merkmalen beeinflusste und die ITGA3-Expression einen starken Einfluss auf die Entstehung von Peritonealmetastasen sowie die Invasionstiefe hatte (Ura et al., 1998). Demzufolge konnte nachgewiesen werden, dass ITGA3 funktionell eine verstärkte Aggressivität beim PDAC bewirkte. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von ITGA3 im PDAC zu einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit führte (Zhang et al.,

2021). Zudem scheinen PDAC-Tumore mit hoher ITGA3-Expression eine verringerte Zugänglichkeit für Chemotherapeutika und Immuntherapien aufzuweisen (Zheng et al., 2023). Interessanterweise zeigte der ITGA3-*knockdown* nur bei zwei von drei Zelllinien im Xenograftmodell diesen starken Effekt. Nach Injektion mit Panc89- und BxPC-3-Zellen konnte ein signifikanter Überlebensvorteil zugunsten der ITGA3-*knockdown*-Gruppe beobachtet werden, bei BxPC-3 war sogar zusätzlich weniger Peritonealkarzinose entstanden, wohingegen der ITGA3-*knockdown* bei PaCa5061 keine Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte. In einem zusätzlichen Endpunktversuch, der auf 34 Tage terminiert war, entwickelte aus der BxPC-3-*knockdown*-Gruppe lediglich eine von sieben Mäusen eine Peritonealkarzinose. Das Ergebnis war allerdings aufgrund der kleinen Stichprobengröße nicht signifikant. Die Stichkanaltumore der ITGA3-*knockdown*-Gruppe waren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe. Erneut gab es bei PaCa5061 keinen Unterschied aufgrund des ITGA3-*knockdowns*. Dieses Ergebnis spiegelt auch die klinische Situation wieder: Die meisten Patient:innen, die nach der Diagnose länger als fünf Jahre überleben, haben einen niedrigen ITGA3-Status. Allerdings überleben nicht alle Patient:innen mit einem niedrigen ITGA3-Status überhaupt so lange (Jiao et al., 2019; Tang et al., 2019) (Abschnitt 2.1, Fig. 5). Dies führt zu der Hypothese, dass die Patient:innen, die am längsten überleben, auch mit hoher Wahrscheinlichkeit eine sehr geringe ITGA3-Expression aufweisen. Die Befunde der multivariaten Analyse von Jiao et al. (2019) zeigten, dass ITGA3 ein signifikanter und prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und rückfallfreie Überleben ist, was diese Hypothese stützt. Sowohl mittels Western Blot und Durchflusszytometrie *in vitro* als auch *ex vivo* konnte bei PaCa5061 die höchste verbleibende ITGA3-Expression nach ITGA3-*knockdown* gemessen werden. Dies wäre eine einfache Erklärung, warum der starke Effekt, der bei Panc89 und BxPC-3 beobachtet werden konnte, bei PaCa5061 ausblieb.

Es wurden die einzelnen Schritte der intraperitonealen Metastasierung *in vitro* untersucht (Abschnitt 2.1, Fig. 8, Supplementary Fig. 4). Die phänotypischen Unterschiede zwischen PaCa5061 und den beiden anderen Zelllinien im Xenograftmodell zeigten sich auch in den *in vitro*-Untersuchungen. Die erste Schwierigkeit für Tumorzellen ist es, in der Peritonealflüssigkeit ohne Anhaftung an ein Substrat zu überleben. Bei dem ITGA3-*knockdown* von Panc89- und BxPC-3-Zellen gingen signifikant mehr Zellen in Apoptose über als bei den Zellen mit normaler ITGA3-Expression. So konnte auch bereits beim Kolonkarzinom gezeigt werden, dass das Ausschalten von ITGA3 nicht nur die Fernmetastasierung verringerte, sondern die Zellen auch empfindlicher für Anoikis werden ließ (Sa et al., 2018). Bei PaCa5061 konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die in der Peritonealflüssigkeit vorliegenden Tumorzellen treffen zunächst auf die Mesothelzellen des viszeralen und parietalen Peritoneums. Durch Spalten zwischen den Mesothelzellen können die Tumorzellen auch direkt an die darunter liegende submesotheliale Schicht, die reich an

EZM-Proteinen ist, binden (Cotran & Karnovsky, 1968). Wie erwartet zeigten alle drei Zelllinien infolge der ITGA3-Depletion eine verringerte Adhäsionsfähigkeit an die ITGA3-Hauptliganden Laminin V, X und XI (Ramovs et al., 2017; Takatsuki et al., 2004). Zusätzlich gingen die ITGA3-*knockdown*-Zellen nach einer Kultivierung auf Laminin vermehrt in Apoptose über. Auch Brustkrebszellen mit ITGA3-*knockout* zeigten einheitlich eine verringerte Adhäsion an Laminin V (Ramovs et al., 2019). Die Proliferation von Panc89- und BxPC-3-Zellen war nach ITGA3-*knockdown* verringert. Dementsprechend wurde auch die Proliferation von Mammakarzinomzellen (Cagnet et al., 2014) und Glioblastomzellen (Yao & Wang, 2023) durch ITGA3 gefördert. Trotz verringerter Expression von ITGA3 in den ITGA3-*knockdown*-Zellen gab es bei PaCa5061 jedoch keinen proliferativen Unterschied, übereinstimmend mit dem Ergebnis des Tierversuchs. Panc89- und BxPC-3-Zellen invadierten mit normaler ITGA3-Expression vermehrt durch eine Matrigelschicht und bildeten signifikant größere und vitalere sphäroide Kolonien aus als die ITGA3-*knockdown*-Zellen. In einer Studie mit drei anderen PDAC-Zelllinien wurde ebenfalls ein signifikant verringertes Invasionspotential nach siRNA-vermitteltem ITGA3-*knockdown* festgestellt (Idichi et al., 2018). PaCa5061 war in einer dünnen Aussaat nicht befähigt, im Matrigel Kolonien auszubilden. Mit einer höheren Zellzahl ließ sich dann allerdings feststellen, dass auch hier aufgrund des ITGA3-*knockdowns* die Zellen eher zugrunde gingen.

Es lässt sich demzufolge sagen, dass die *in vitro*-Ergebnisse von Panc89 und BxPC-3 sehr ähnlich waren und auch hier deutliche Unterschiede zwischen den Kontroll- und den ITGA3-*knockdown*-Zellen zu erkennen waren. Dies unterstreicht den *in vivo* beobachteten Überlebensvorteil. Im Gegensatz dazu ergab sich bei PaCa5061 kein einheitliches Bild bei den Ergebnissen der oben genannten Untersuchungen *in vitro*.

Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist das ausgeprägte desmoplastische Stroma, welches diverse EZM-Proteine aufweist. Bei der desmoplastischen Reaktion wird unter anderem auch die Expression von Laminin hochreguliert (Mahadevan & Von Hoff, 2007). Diese spezielle Stromareaktion infolge der Karzinogenese ist ein entscheidender Faktor im Hinblick auf Aggressivität und Behandelbarkeit des PDACs (Provenzano & Hingorani, 2013; Sada et al., 2016). Der hohe und dichte EZM-Anteil, aber auch dessen Zusammensetzung begünstigen die Proliferation, Migration und Invasion des Tumors. Zusätzlich agiert dieser dichte EZM-Anteil auch als Barriere, wodurch der Tumor geradezu unerreichbar für Therapeutika wird (Bouzin & Feron, 2007; Hosein et al., 2020; Ligorio et al., 2019; Neesse et al., 2011; Sada et al., 2016).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte im Xenograftmodell gezeigt werden, dass die stabile Depletion von ITGA3 einen direkten Einfluss auf die Expression der Hauptliganden Laminin X und XI (Laminin  $\alpha 5$ ) und somit auf die Zusammensetzung des Tumor-assoziierten Stromas bei allen drei PDAC-Zelllinien hatte (Abschnitt 2.1, Fig. 4). Infolge des *knockdowns* von ITGA3

vermehrten sich zwar die Stromalen Anteile der Peritonealkarzinosen, allerdings war das Stromale Laminin  $\alpha 5$  signifikant verringert (Abschnitt 2.1, Fig. 4). Durch diese Veränderung der Stromazusammensetzung änderte sich möglicherweise auch der desmoplastische Phänotyp. Zusammenfassend zeigten Maltseva und Rodin (2018), dass unterschiedliche Laminin-Heterotrimere an allen wichtigen Schritten der Karzinogenese und Metastasierung funktionell beteiligt sind. Laminin X stabilisiert bei der Angiogenese innerhalb eines Tumors die Gefäßwände und die Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen (Maltseva & Rodin, 2018; Simon-Assmann et al., 2011; Song et al., 2017). Außerdem fördert Laminin X das Überleben und den Selbsterneuerungsprozess von embryonalen und induzierten Stammzellen, auf diese Weise kann auch der Stammzellcharakter erhalten bleiben. Das lässt vermuten, dass so die Voraussetzung geschaffen ist, dass CSCs überleben können (Maltseva & Rodin, 2018; Qin et al., 2017). In den Peritonealkarzinosen der ITGA3-*knockdown*-Gruppe waren vermehrte Stroma-Anteile und signifikant weniger Tumorzellen nachweisbar (Abschnitt 2.1, Fig. 4). Daher war bei gleicher Tumormasse nach ITGA3-Depletion die Anzahl der Tumorzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit normaler ITGA3-Expression verringert, was auf ein weniger aggressives und metastatisches Tumorwachstum hindeutet. Die fundamentale Umstrukturierung des Tumorstromas aufgrund der reduzierten ITGA3-Expression der PDAC-Zellen könnte die Zugänglichkeit für Chemotherapeutika und ihre Effizienz erheblich verbessern, insbesondere da bereits gezeigt wurde, dass eine hohe ITGA3-Expression einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Chemotherapie hatte (Provenzano et al., 2012; Zheng et al., 2023). In einer Studie von Huanwen et al. (2009) konnte ferner gezeigt werden, dass sowohl die konstitutive als auch die Laminin-induzierte FAK-Phosphorylierung eine erhöhte intrinsische Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin im PDAC bewirkte. Die ITGA3-Depletion in Panc89- und BxPC-3-Zellen führte also nicht nur zur Hemmung der Peritonealkarzinose und somit zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere, sondern auch zu einer Umstrukturierung des desmoplastischen Stromas.

Der ITGAV-*knockdown* führte im Gegensatz zum ITGA3-*knockdown* in PaCa5061-Zellen zu einer erheblichen Reduktion der Peritonealkarzinose. Dieser Effekt konnte in einem weiteren Endpunktversuch mit PaCa5061-ITGAV-*knockdown*-Zellen reproduziert werden, blieb allerdings bei ITGAV-Depletion von BxPC-3-Zellen aus (Abb. 4). In einer Studie von Lepsenyi et al. (2021) konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des ITGAV auf Kolonkarzinomzellen die Anzahl der peritonealen Tumorknoten signifikant um etwa 70 % reduzierte. Im Magenkarzinom korrelierte eine hohe ITGAV-Expression mit einem kürzeren Überleben und der Entstehung von Lymphknotenmetastasen (Wang et al., 2019).

In einer Vorarbeit zu dieser Studie konnten Gebauer et al. (2013) zeigen, dass die peritoneale Metastasierung nach PDAC-Zellinjektion in Mäusen mit E- und P-Selektin-*knockout* im



Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert war. Auch in anderen Studien dieser Arbeitsgruppe konnten durch den E- und P-Selektin-*knockout* in verschiedenen Xenograftmodellen erhebliche Effekte auf Tumorwachstum und Metastasierung erzielt werden (Genduso et al., 2023; Köhler et al., 2010). Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass mehrere Integrin-Untereinheiten (insbesondere ITGAV) in den Peritonealkarzinosen, die in Abwesenheit von E- und P-Selektin gewachsen waren, hochreguliert wurden. Dieser möglicherweise kompensatorische Effekt aufgrund der Abwesenheit von Selektinen wurde ebenfalls von Schwankhaus et al. (2014) beobachtet. In einem weiteren intraperitonealen Xenograftmodell unserer Studie wurde ITGAV auf den Tumorzellen depletiert und das E- und P-Selektin in den Versuchstieren durch *knockout* ausgeschaltet. Durch diese Kombination kam es zu einer weiteren Hemmung der Peritonealkarzinose, sodass diese nur noch bei wenigen Mäusen überhaupt nachweisbar war. Es konnte erstmalig experimentell ein solcher synergistischer Effekt dargestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme von Sökeland und Schumacher (2019), dass Tumorzellen einen ähnlichen Mechanismus nutzen wie Leukozyten bei der Adhäsionskaskade, welche durch Selektine initiiert und durch Integrine fortgesetzt wird.

Des Weiteren wurde die funktionelle Relevanz von ITGAV für das Primärtumorwachstum und die Fernmetastasierung in einem subkutanen PDAC-Xenograftmodell untersucht. Die Mäuse aus den ITGAV-*knockdown*-Gruppen von PaCa5061 sowie BxPC-3 überlebten signifikant länger, wobei die beiden Abbruchkriterien lediglich die Größe des Primärtumors oder eine Ulzeration der Haut waren (Abschnitt 2.3, Fig. 3E, H). Zusätzlich wurde durch die ITGAV-Depletion die hämatogene Metastasierung in die Lunge signifikant gehemmt (Abschnitt 2.3, Fig. 3F, I).

*In vitro* wurden die funktionellen Effekte des ITGAV-*knockdowns* auf einige Schritte der Metastasierungskaskade analysiert (Abschnitt 2.3, Fig. 4). Bei beiden Zelllinien konnte eine verringerte statische Adhäsionsfähigkeit auf Fibronektin infolge des ITGAV-*knockdowns* beobachtet werden (Abschnitt 2.3, Fig. 4C; Abb. 11). Da ITGAV bevorzugt an EZM-Proteine, die eine RGD-Sequenz enthalten, binden, war dieses Ergebnis zu erwarten (Humphries et al., 2006; Hynes, 2002). Bei PaCa5061 und BxPC-3 war das Migrations- und Invasionspotential durch die ITGAV-Depletion verringert (Invasion bei PaCa5061 allerdings ohne signifikanten Unterschied). Beim Magenkarzinom konnte Ähnliches belegt werden. Eine reduzierte ITGAV-Expression in den Magenkarzinomzellen führte zu einer reduzierten Migration und Invasion (Wang et al., 2019). Es ließen sich keine proliferativen Unterschiede feststellen, was darauf hindeutet, dass die beiden Zelllinien bereits resistent gegen anti-proliferative Effekte von TGF- $\beta$  waren (Abschnitt 2.3, Fig. 4B). So konnte hingegen in einem frühen Krankheitsstadium eine erhöhte Tumorzellproliferation durch die Blockade von ITGAVB6 in einem Mausmodell mit KRAS<sup>G12D</sup>-initiierten, SMAD4-defizienten murinen PDACs nachgewiesen werden (Hezel et al.,

2012). Durch die reduzierte Expression von ITGAV formierten sich signifikant weniger sphäroide Kolonien im Matrigel.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen unterstützten demzufolge in den meisten Fällen die Resultate der *in vivo*-Versuche. Auch hier zeigte der ITGAV-*knockdown* in PaCa5061-Zellen funktionell größere Effekte als in BxPC-3-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ITGA3 und ITGAV im intraperitonealen Xenograftmodell vollkommen unterschiedlich zu bewerten sind. Der ITGA3-*knockdown* in PaCa5061-Zellen zeigte keinen Effekt auf die Entstehung peritonealer Metastasen, wohingegen der *knockdown* von ITGAV zu signifikant weniger Peritonealkarzinose führte. Es kam aufgrund der ITGA3-Depletion in BxPC-3-Zellen zu einem Überlebensvorteil und zusätzlich zu reduzierter Peritonealkarzinose. Der ITGAV-*knockdown* in BxPC-3-Zellen erzielte im Endpunktversuch (Abb. 4) keinen Effekt. Allerdings gelang es in beiden Studien, die Peritonealkarzinose infolge von peritoneal disseminierten PDAC-Zellen Zelllinien-abhängig zu hemmen.

Der erhebliche synergistische Effekt durch ITGAV-Depletion der Tumorzellen einerseits und E- und P-Selektin-*knockout* des Wirts andererseits wurde mit einem ITGA3-*knockdown* bisher noch nicht betrachtet. Es wäre interessant zu untersuchen, ob hier ähnliche Beobachtungen gemacht werden können, vermutlich allerdings eher mit den Zelllinien Panc89 oder BxPC-3. Ebenso wurde bislang auch kein subkutanes Tiermodell durchgeführt, um das Primärtumorwachstum und die Fernmetastasen zu bewerten. Zwar wurden auch in der ITGA3-Studie in allen durchgeführten Tierversuchen Fernmetastasen betrachtet, allerdings konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen der Kontroll- und der *knockdown*-Gruppe festgestellt werden.

*In vitro* zeigte sich, dass die Adhäsionsfähigkeit an den jeweiligen Hauptliganden, ITGA3 an Laminin und ITGAV an Fibronectin, infolge des *knockdowns* abnahm. Der ITGA3-*knockdown* in BxPC-3-Zellen reduzierte signifikant die Proliferation (auch Substrat-ungebunden), der ITGAV-*knockdown* hingegen nicht. PaCa5061 zeigte bei beiden Integrin-*knockdowns* keine proliferativen Unterschiede. Die Tatsache, dass PaCa5061 in einer dünnen Aussaat nicht imstande war, im Matrigel Kolonien auszubilden, konnte in beiden Studien gezeigt werden. Der ITGA3-*knockdown* in BxPC-3-Zellen führte zu kleineren und weniger vitalen Kolonien und der ITGAV-*knockdown* zu weniger sphäroiden Kolonien.

Es lässt sich also nicht grundsätzlich sagen, dass, sobald eine Integrin-Untereinheit herunterreguliert ist, die Peritonealkarzinose aufgrund einer partiell unterbrochenen Adhäsionskaskade notwendigerweise gehemmt wird. Dies kann offensichtlich ebenso vom restlichen Expressionsniveau des jeweiligen Integrins abhängig sein. Sowohl ITGA3 als auch ITGAV sind dennoch signifikant an der Metastasierungskaskade des PDACs beteiligt.

### 3.2 ITGA3- sowie ITGAV-Depletion bewirken eine Integrin-Gegenregulation und Veränderung des Transkriptoms

Integrine haben eine ganz besondere Bedeutung im Pankreaskarzinom. Laut TCGA-Datenbank (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) sind fast alle Integrin-Untereinheiten im Vergleich zum Normalgewebe des Pankreas hochreguliert (Samaržija et al., 2020; Tang et al., 2019). Mittels Durchflusszytometrie konnte herausgefunden werden, dass viele Integrin-Untereinheiten auf der Zelloberfläche von PDAC-Zelllinien nachweislich exprimiert waren. So konnte auch gezeigt werden, dass die Untereinheiten ITGA3 und ITGAV auf den untersuchten Zelllinien deutlich exprimiert waren (Tab. 1). Außerdem wurde in Studien nachgewiesen, dass in einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium sowohl ITGA3 als auch ITGAV höher exprimiert waren als in einem früheren Stadium (Jiao et al., 2019; Lian et al., 2016; Peng et al., 2014).

Zunächst ließ sich mittels Transkriptomanalyse bestätigen, dass der ITGA3-*knockdown* aller drei Zelllinien in den Peritonealkarzinosen der Mäuse stabil geblieben war (Abschnitt 2.1, Tab. 1). Dies bestätigten auch die durchflusszytometrischen Analysen und die immunhistochemischen Färbungen (Abschnitt 2.1, Fig. 3A, 4). Durch den ITGA3-*knockdown* in PaCa5061-Xenografts kam es *in vivo* im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien zu keiner Gegenregulation anderer Integrin-Untereinheiten. Vor Tumorzellinjektion wurde nur ITGB6 leicht hochreguliert. Der ITGA3-*knockdown* in Panc89- und BxPC-3-Zellen wirkte sich hingegen ziemlich stark auf das Proteinlevel anderer Integrin-Untereinheiten aus (Abschnitt 2.1, Fig. 3B, Supplementary Fig. 2). Durch die erhebliche ITGA3-Depletion in Panc89- und BxPC-3-Zellen konnte der einzige Bindungspartner von ITGA3 (ITGB1) alternative Heterodimerisierungspartner binden, welche infolgedessen ein verändertes Proteinlevel aufwiesen. Dies ließ sich bereits vor Tumorzellinjektion feststellen, wurde aber *in vivo* noch verstärkt (Abschnitt 2.1, Fig. 3B). Panc89 regulierte infolge der ITGA3-Depletion andere Integrin-Untereinheiten als BxPC-3. Diese Gegenregulation wurde bereits als Integrin-*crossstalk* beschrieben, welcher infolge eines *knockdowns* enorme Auswirkungen auf die Expression anderer Integrin-Untereinheiten haben kann (Samaržija et al., 2020). In den Peritonealkarzinosen ließ sich auf Transkriptom-Ebene diese Integrin-Gegenregulation aufgrund des ITGA3-*knockdowns* nur teilweise nachweisen. So lässt sich schlussfolgern, dass die tatsächliche Protein-Expression der Integrine in erster Linie durch die Heterodimerbildung auf der Zelloberfläche zustande kam und nur sekundär durch die Expression der Integrin-Transkripte beeinflusst wurde.

Eine hohe ITGA3-Expression begünstigte in unserer Studie signifikant die Entstehung und Ausbreitung peritonealer Metastasen, was zu einer verringerten Überlebenserwartung führte. Dies konnte sowohl im Xenograftmodell als auch bei Pankreaskarzinom-Patient:innen gezeigt

werden. Die RNA-Sequenzierungsdaten aus der ITGA3-Studie zeigten, dass übereinstimmend in den Peritonealkarzinosen des Panc89- und BxPC-3-Modells, bei denen der ITGA3-*knockdown* die Peritonealkarzinose verringerte, verschiedene Gene im Zuge des ITGA3-*knockdowns* hoch- oder herunterreguliert wurden. Diese Gene waren wiederum im PaCa5061-Modell, bei dem der ITGA3-*knockdown* zu keiner Verringerung der Peritonealkarzinose führte, auf Transkriptom-Ebene nicht reguliert (Abschnitt 2.1, Fig. 6). Zusätzlich zur ausgebliebenen Integrin-Gegenregulation auf Protein-Ebene unterstützt dies die Annahme, dass der ITGA3-*knockdown* in PaCa5061-Zellen nicht stark genug war beziehungsweise die Restexpression von ITGA3 noch zu hoch war, um einen ähnlichen Effekt wie bei Panc89 und BxPC-3 zu erreichen. Die im Panc89- und BxPC-3-Modell regulierten Gene sind bei der Karzinogenese des Pankreas relevant. Bemerkenswerterweise waren 25 Gene im Panc89- und BxPC-3-Modell und auch bei den Patient:innen konkordant reguliert. Unter diesen 25 übereinstimmend regulierten Genen befanden sich zehn etablierte, prognostisch relevante Marker für das Überleben von Patient:innen mit einem diagnostizierten Pankreaskarzinom (Abschnitt 2.1, Tab. 1, Supplementary Fig. 3). Besonders hervorzuheben ist die Herunterregulation von CEACAM6 im ITGA3-*knockdown*. Dies konnte nicht nur auf Transkriptom-Ebene gezeigt werden, sondern auch mittels immunhistochemischer Färbung an Xenografttumor-Schnitten validiert werden (Abschnitt 2.1, Tab. 1, Fig. 7). In den differentiellen Genexpressionsdaten von Patient:innen mit einem diagnostizierten Pankreaskarzinom konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Patient:innen mit einem niedrigen ITGA3-Status auch eine reduzierte CEACAM6-Expression aufwiesen. CEACAM6 ist in mehreren Tumorentitäten hochreguliert, so auch beim Pankreaskarzinom (Duxbury et al., 2005; Han et al., 2002; Iacobuzio-Donahue et al., 2003; Schölzel et al., 2000). Die Überexpression von CEACAM6 führte zu einer gesteigerten Tumorprogression, Proliferation, Invasion und Migration im PDAC und wurde daher mit einer geringeren Überlebenschance in Verbindung gebracht (Burgos et al., 2022; Chen et al., 2013; Cheng et al., 2014; Gebauer et al., 2014). In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Integrine wie ITGAVB3 mit CEACAM6 interagierten und so die Anhaftung an EZM-Proteine verstärken konnten (Cheng et al., 2021; Duxbury et al., 2004). So war es auch in unserem Xenograftmodell naheliegend, dass ITGA3 nicht nur mit CEACAM6 co-reguliert war, sondern auch funktionell an der Aufrechterhaltung des hohen CEACAM6-Phänotyps beteiligt war, da der ITGA3-*knockdown* zu einer Herunterregulation von CEACAM6 führte.

Die Genexpressionsanalyse der Patient:innen ist nicht direkt mit den Daten des Xenograftmodells vergleichbar. Zum einen handelte es sich bei den Versuchstieren um genetisch identische Wirte, was selbstverständlich bei Patient:innen, die individuell betrachtet werden müssen, nicht der Fall ist. Dies trifft auch auf die Genetik der Tumorzellen selbst zu, insbesondere in Anbetracht der oben geschilderten KRAS-, BRCA1/2-, p16-, p53- und

SMAD4-Mutationen/Deletionen, die für das PDAC typisch sind und in den Patient:innen unterschiedlich vorkommen. Hier wurden letztlich nur noch das Panc89- und BxPC-3-Modell mit den jeweiligen Mutationen betrachtet, was sicherlich nur einen kleinen Ausschnitt der klinischen Realität widerspiegelt. Außerdem muss bei den Genexpressionsdaten der Patient:innen der Stromaanteil der Tumore zusätzlich bedacht werden, wohingegen dieser Anteil aufgrund der murinen Gene im Xenograftmodell bereits exkludiert wurde. Hinzu kommt, dass Tumorwachstum und -progression in Patient:innen zumindest teilweise unter dem Einfluss eines adaptiven Immunsystems stattfinden, welches in den Wirtstieren für das Xenograftmodell ausgeschaltet wurde, um ein Anwachsen der humanen Tumorzellen überhaupt zu ermöglichen. Daher wurden in der Transkriptomanalyse noch weitere sich überschneidende Gene bei Panc89 und BxPC-3 identifiziert, die von Bedeutung sind. Diese wurden aber nicht in den Patient:innendaten wiedergefunden (Tab. 2). So waren Pankreaskarzinom-bezogene Biomarker wie Mucin 4 (MUC4) und Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) in den Peritonealkarzinosen von Panc89 und BxPC-3 nach ITGA3-*knockdown* ebenfalls herunterreguliert. Eine hohe MUC4-Expression führte zu verstärkter Zellproliferation, Invasion und Adhäsion an EZM-Proteinen, ebenso zu einer vermehrten Tumorprogression und Metastasierung im PDAC (Chaturvedi et al., 2007; Gautam et al., 2020). ALDH1A1 regulierte die Genexpression in Krebsstammzellen (CSC) (Yue et al., 2022), welche zentral das Tumorwachstum, die Progression und die Ausbildung von Metastasen beeinflusste (Nimmakayala et al., 2021). Zhang et al. (2020) zeigten in ihrer Studie, dass ITGA3 auf den Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 verstärkt exprimiert war. Sie konnten nicht nur nachweisen, dass eine hohe ITGA3-Expression die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Mammakarzinomzellen förderte, sondern auch den Stammzellcharakter regulierte. So konnte gezeigt werden, dass auch hier die Expression des Stammzellmarkers ALDH1 infolge des ITGA3-*knockdowns* reduziert wurde, wodurch die Brustkrebszellen einen geringer ausgeprägten Stammzell-ähnlichen Charakter annahmen. Es konnte in einer weiteren Studie die Aussage bestätigt werden, dass auch ITGA3 ein molekularer Marker für EMT-Prozesse sein kann. Es wurde herausgefunden, dass ITGA3 in humanen Brustkrebszellen mit aggressivem Phänotyp (basales Mammakarzinom) hochreguliert war und mit dem Schlüsselregulator  $\delta$ EF-1 der EMT korrelierte (Shirakihara et al., 2013).

In der ITGAV-Studie zeigten bei der durchflusszytometrischen Messung der parentalen Zellen der Linien PaCa5061 und BxPC-3 nur die ITGAV-Bindungspartner ITGB1 und ITGB6 ein deutliches Signal. Andere Bindungspartner wie ITGB3, ITGB5 und ITGB8 zeigten lediglich ein sehr schwaches oder gar nicht nachweisbares Signal (Tab. 1). Sowohl gemäß Durchflusszytometrie als auch Western Blot war bei beiden Zelllinien im *knockdown* vergleichbar wenig ITGAV nachweisbar. Allerdings hatten PaCa5061-Kontrollzellen ein deutlich höheres ITGAV-Ausgangslevel als BxPC-3-Kontrollzellen (Abschnitt 2.3, Fig. 2B, C).

Folglich bewirkte der ITGAV-*knockdown* in PaCa5061-Zellen *in vitro* funktionell größere Effekte als der ITGAV-*knockdown* in BxPC-3-Zellen. Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass bei PaCa5061 sehr viele andere Integrin-Untereinheiten herunterreguliert waren (Abb. 10). Auch im Tiermodell zeigte sich im Endpunktversuch eine verringerte Peritonealkarzinose, was bei BxPC-3 nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4).

In dieser Studie wurde die veränderte Genexpression der Peritonealkarzinosen von PaCa5061- und BxPC-3-Xenografts aufgrund des ITGAV-*knockdowns* mittels Mikroarray analysiert. Die Analyse der Mikroarray-Daten ergab, dass CEACAM7 in PaCa5061- und BxPC-3-ITGAV-*knockdown*-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert war. Dies konnte mittels immunhistochemischer Färbung für PaCa5061 bestätigt werden (Abschnitt 2.3, Fig. 6). Das Ergebnis zeigte wenig überraschend, dass nach Depletion unterschiedlicher Integrine auch unterschiedliche CEACAMs in teils entgegengesetzte Richtung reguliert werden konnten und dass es sich hierbei weiterhin um Zelllinien-spezifische Effekte handelte.

Wie in Abschnitt 1.4.3.2 beschrieben, müssen einzelne Tumorzellen befähigt sein, sich aus dem Verband des Primärtumors zu lösen. Dies geschieht infolge der EMT, wobei es sich um einen physiologischen Vorgang in der Embryonalperiode (Gastrulation) handelt, der bei der Tumorprogression reaktiviert werden kann. Tumorzellen verlieren ihre homophilen Zell-Zell-Verbindungen, die Expression von Proteinen, die diese Verbindungen begünstigen, und exprimieren vermehrt Proteine, die als mesenchymale Marker bekannt sind (Sarkar et al., 2009). Der Prozess der EMT wird durch ein komplexes molekulares Zusammenspiel von extrazellulären Signalen und Wachstumsfaktoren (wie TGF- $\beta$ ) ausgelöst (Sarkar et al., 2009). In der Literatur wird häufig berichtet, dass ITGAVB6 in der Lage ist, latentes TGF- $\beta$  zu aktivieren (Annes et al., 2004; Khan & Marshall, 2016; Liu et al., 2014; Mamuya & Duncan, 2012). Gerade zu Beginn der Karzinogenese kann TGF- $\beta$  als Tumorsuppressor fungieren (siehe Abschnitt 1.4.3.2) (Connolly et al., 2012). Sowohl die PaCa5061- als auch die BxPC-3-Zelllinie wurden aus lokal fortgeschrittenen humanen Tumoren etabliert, wie sie häufig zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorliegen. In diesem Fall treibt TGF- $\beta$  die Tumorprogression voran. In dieser Studie konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass bei den SMAD4-intakten PaCa5061-Zellen aufgrund des ITGAV-*knockdowns* die Konzentration des sezernierten, aktiven TGF- $\beta$  in den Zellkulturüberständen reduziert war (Abschnitt 2.3, Fig. 4A). Darüber hinaus konnte mittels immunhistochemischer Färbung der PaCa5061-Xenografttumore gezeigt werden, dass nach Depletion von ITGAV die intratumorale Menge an phospho-SMAD2 (p-SMAD2) reduziert war, was auf eine geringere Aktivität im TGF- $\beta$ -Signalweg hindeutet. Diese veränderte TGF- $\beta$ -Signalübertragung aufgrund des ITGAV-*knockdowns* konnte auch in den Genexpressionsanalysen bestätigt werden. Darüber hinaus gab es einen Zusammenhang zwischen ITGAV und p-SMAD2-positiven Tumoren in den analysierten Patient:innenproben. Diese untersuchten Patient:innendaten zeigten, dass eine hohe ITGAV-Expression mit einer

schlechten Überlebensprognose einherging. Diese Beobachtung deckt sich mit den Datenbankanalysen (GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn>; Tang et al., 2019) und Human Protein Atlas (<https://v21.proteinatlas.org>; Uhlen et al., 2017)), welche zeigten, dass es eine Korrelation zwischen der ITGAV-mRNA-Expressionsrate und einem verringerten Überleben der Patient:innen gibt. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte außerdem, dass ein Anstieg von löslichem TGF- $\beta$  im Serum ein schlechtes Überleben beim PDAC prognostizierte (Park et al., 2020). In einer Studie von Bates et al. (2005) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ITGAVB6 mit einem verschlechterten Gesamtüberleben beim Kolonkarzinom einherging. Auch hier wurde vermutet, dass der Grund dafür die ITGAVB6-abhängige TGF- $\beta$ -Aktivierung und die daraus resultierende Stimulation der EMT war. Anhand der SMAD4-intakten PaCa5061-Zellen der hier vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil TWIST-positiver Zellen durch den *knockdown* von ITGAV abnahm. TWIST steuerte die Expression epithelialer Gen-Signaturen wie Occludin und E-Cadherin (Xu et al., 2009). So konnte ein Anstieg von Occludin und E-Cadherin ebenfalls in den Peritonealkarzinosen der Versuchstiere mittels Genexpressionsanalyse und immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden (Abschnitt 2.3, Tab. 1, Fig. 6). *In vivo* ist TGF- $\beta$ 1 ein starker Aktivator der Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten, die als Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs) bezeichnet werden (Wipff et al., 2007). Die Wahrscheinlichkeit einer TGF- $\beta$ -Aktivierung wird durch die Zunahme der EZM-Kontraktion, welche durch CAFs verursacht wird, erhöht (Wipff et al., 2007). Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die Heterogenität der CAFs im PDAC durch JAK/STAT-Signaltransduktion vermittelt wird, die durch TGF- $\beta$  antagonisiert wird (Biffi et al., 2019). CAFs selbst haben eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung der EZM. CAFs sind in der Lage, die Aktivitäten und Expressionslevel von Integrinen, Proteoglykanen und Proteasen zu beeinflussen. Sie können also sowohl die Tumormikroumgebung als auch das Bindegewebe umstrukturieren. Dies kann die Tumorprogression weiter vorantreiben (Miles & Sikes, 2014). So lagern CAFs beispielsweise Fibronectin in der EZM ein und bilden dadurch promigratorische Bahnen (Attieh et al., 2017). Außerdem wird angenommen, dass CAFs selbst ITGAV exprimieren und daher auch latentes TGF- $\beta$  aktivieren können (Hinz, 2013). Auch in unserer Studie wurde nachgewiesen, dass murines Fibronectin in den Xenografttumoren mit verringerter ITGAV-Expression hochreguliert war (Abschnitt 2.3, Fig. 6), was auf einen Einfluss des ITGAV-*knockdowns* der Tumorzellen auf die murinen CAFs in der Mikroumgebung hindeutet.

Neben den wesentlichen Veränderungen, die ITGAV in der TGF- $\beta$ -Signalübertragung von SMAD4-intakten PDACs (in dieser Studie durch PaCa5061 repräsentiert) hervorruft, zeigte das Xenograftmodell mit BxPC-3-Zellen, die ein mutiertes SMAD-4-Gen haben, dass es auch TGF- $\beta$ -unabhängige Effekte von ITGAV beim PDAC geben kann. Die TMA-Daten bestätigten diese Beobachtung: Obwohl die Studienkohorte nicht in Fälle mit mutiertem/ nicht mutiertem

SMAD4-Gen unterteilt war, war die ITGAV-Expression dennoch prognostisch von Bedeutung. ITGAV scheint also sowohl für funktionelle als auch für dysfunktionelle SMAD4-Tumore prognostisch relevant zu sein, denn nur etwa die Hälfte aller PDACs haben ein SMAD4-Wildtyp-Gen (Goral, 2015). Beim Prostatakarzinom wurde beispielsweise in einer kürzlich durchgeführten Studie die AKT-Aktivierung als zusätzlicher Mechanismus für die Beteiligung von ITGAV an der Tumorprogression beschrieben (Ciardiello et al., 2019).

ITGAV förderte die Tumorprogression und Metastasierung insbesondere beim SMAD4-intakten PDAC aufgrund der ITGAV-induzierten TGF- $\beta$ -Aktivierung. Wie oben erläutert, kann es dennoch durch den ITGAV-*knockdown* auch TGF- $\beta$ -unabhängige Effekte geben, die von prognostischer Relevanz sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Expression von ITGA3 als auch von ITGAV in PDAC-Zellen nicht nur Einfluss auf die Anheftung der Tumorzellen an das Peritoneum beziehungsweise an die submesotheliale Schicht hatten, sondern auch die Regulation der Transkription in den Tumorzellen beeinflussten. In der vorliegenden und in weiteren Arbeiten der Gruppe ist es gelungen, zum Teil sehr deutliche Überlebensvorteile der Versuchstiere durch Ausschalten von E- und P-Selektin oder Depletion von ITGA3 oder ITGAV in Xenograftmodellen zu erzielen. Eine vollständige Eindämmung der Peritonealkarzinose konnte allerdings nicht erreicht werden. Dies ist möglicherweise durch die zahlreichen intrazellulären Effekte des ITGA3- beziehungsweise ITGAV-*knockdowns* auf die Transkription und Gegenregulation der Integrin-Untereinheiten zu erklären. Der E- und P-Selektin-*knockout* führte zur kompensatorischen Gegenregulation von Integrinen (Gebauer et al., 2013). Durch den Integrin-*crosstalk* kann infolge einer Reduktion der Expression einer Integrin-Untereinheit eine andere hochreguliert werden und dadurch zu verstärkter Tumorprogression und Metastasierung führen (Samaržija et al., 2020). Ein solcher Progression-fördernder Effekt war bei den PDAC-Xenografts jedoch weder beim *knockout* von E- und P-Selektin noch beim *knockdown* von ITGA3 oder ITGAV trotz nachgewiesener Regulation anderer Integrin-Untereinheiten zu verzeichnen. Sowohl ITGA3 als auch ITGAV sind wichtige Biomarker für EMT-Prozesse, was in beiden Genexpressionsanalysen belegt werden konnte. Dennoch vermitteln sie auch unterschiedliche Effekte auf die Transkription, wie beispielsweise durch die Herunterregulation von CEACAM6 (siehe Abschnitt 2.1) und die Hochregulation von CEACAM7 (siehe Abschnitt 2.3) deutlich wurde.

Es ist ein noch besseres Verständnis der Integrin-abhängigen Regulation der Transkription und des Integrin-*crosstalks* erforderlich. Zukünftig wäre eine Kombinationstherapie, bei der mehrere CAMs adressiert werden, für die vollständige Hemmung der Peritonealkarzinose denkbar.



### 3.3 Neue therapeutische Ansätze und die Problematik einer klinischen Anwendung

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass sowohl E- und P-Selektin als auch ITGA3 und ITGAV an der peritonealen Metastasierung des humanen PDAC funktionell beteiligt waren und somit äußerst vielversprechende Targets für die Therapie von Pankreaskarzinom-Patient:innen darstellen. Nach Analyse der funktionellen Rolle dieser maßgeblich an der Adhäsionskaskade beteiligten Integrin-Untereinheiten war eines der Hauptziele dieser Arbeit, einen Nanopartikel-basierten Therapieansatz zu erarbeiten, um die Entstehung und Ausbreitung der Peritonealkarzinose infolge eines Pankreaskarzinoms zu hemmen. Diese therapeutische Option wäre nicht nur relevant in Bezug auf das Pankreaskarzinom, sondern auch für andere intraperitoneal metastasierende Tumorentitäten wie beispielsweise das Magen- oder Ovarialkarzinom. Ein geeigneter therapeutischer Ansatz ist allerdings stark von dem jeweiligen Integrin-Profil sowie vom Stadium der Tumorprogression der Karzinome abhängig. Solange der Tumor noch resektabel ist, haben die Patient:innen die größte Überlebenswahrscheinlichkeit. In einer Studie von Oettle et al. (2013) konnte gezeigt werden, dass die vollständige Entfernung des makroskopisch sichtbaren Pankreaskarzinoms mit anschließender adjuvanter Gemcitabin-Behandlung über sechs Monate das Gesamtüberleben sowie das krankheitsfreie Überleben verlängerte. Da eine Chemotherapie für den Körper eine große Belastung darstellt, wird vermehrt an neuen Optionen geforscht. Zielgerichtete Krebstherapien, die nur gegen ein ganz spezielles Molekül gerichtet sind, rücken immer mehr in den Fokus der Forschung. Die Grundidee einer solchen zielgerichteten Therapie ist, dass sie effektiver und für den Körper besser verträglich ist (Lee et al., 2018; Smith & Prasad, 2021). Dabei wird auch zunehmend an RNAi-vermittelten *knockdown*-Strategien, basierend auf siRNA, geforscht (Friedrich & Aigner, 2022). Integrin-Inhibitoren werden schon länger als Behandlungsoption gegen Krebs eingesetzt (Tucker, 2006). Diese Inhibitoren können beispielsweise monoklonale Antikörper, Rezeptor-Inhibitoren oder Peptide sein (Chen et al., 2022). Besonders viele erforschte Integrin-Inhibitoren richten sich gegen ITGAV. In einer Studie konnte für ITGAVB6 gezeigt werden, dass eine Blockade mittels Antikörper gegen dieses Integrin in Kombination mit einer Gemcitabin-Behandlung das Tumorwachstum reduzierte und so das Überleben von Mäusen mit ITGAVB6-positiven PDAC-Tumoren verlängert werden konnte. Diese Antikörpertherapie unterdrückte im Mausmodell die protumorigene Mikroumgebung, beispielsweise durch Unterdrückung der TGF- $\beta$ -Signalübertragung (Reader et al., 2019). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass beim Pharynxkarzinom die TGF- $\beta$ -induzierte SMAD2-Phosphorylierung mittels ITGAVB6-Antikörper reduziert werden konnte, was zu vermindertem Tumorwachstum und einem verringerten Invasionspotential führte, während die Behandlung keine Auswirkung auf die Zellproliferation hatte (Van Aarsen et al., 2008). Diese Effekte konnten gleichermaßen in

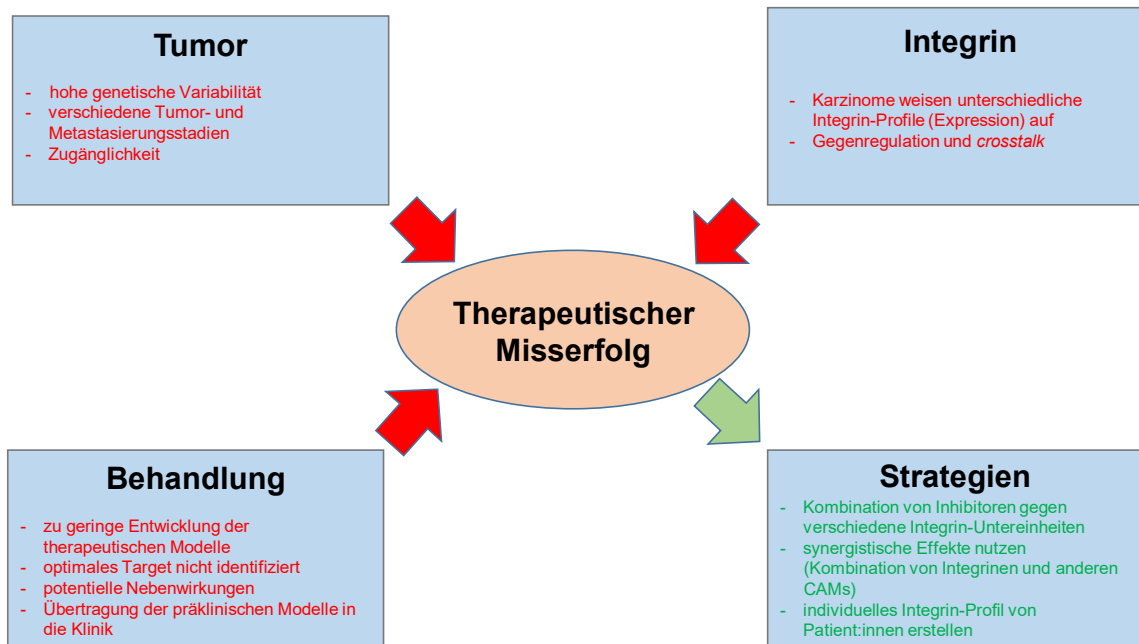
unseren Xenograftmodellen für das PDAC bestätigt werden. In weiteren Studien konnte außerdem nachgewiesen werden, dass RGD-Peptide, spezifisch gegen ITGAVB3 und ITGAVB5 gerichtete Antikörper und das Präparat Cilengitid die Serum-induzierte Differenzierung von sphäroiden Pankreaskolonien inhibierten (Cabarcas et al., 2013). Chen et al. (2022) fassten zusammen, dass außer Cilengitid auch CNTO 95, 17E6, GLPG0187, Vitaxin und Abegrin als ITGAV-Inhibitoren in klinischen Studien eingesetzt wurden. Die Ergebnisse zur Immuntherapie von PDAC-Patient:innen waren bislang eher enttäuschend (Aroldi & Zaniboni, 2017). In unserer ITGAV-Studie konnte beobachtet werden, dass es aufgrund des ITGAV-*knockdowns* zur Veränderung der MHC-II-Expression gekommen war. Da die Tierversuche allerdings mit immundefizienten Mäusen durchgeführt wurden, würde es weitere Untersuchungen benötigen, um die Auswirkungen dieser Veränderung spezifizieren zu können. Es müsste sich um ein syngenes Modell handeln, bei dem die Mäuse ein intaktes adaptives Immunsystem hätten. Da MHC-II für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erforderlich ist, die auch bei der Antitumor-Immunität eine wichtige Rolle spielen (Haabeth et al., 2014), könnten weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet äußerst interessant sein.

Da ITGA3 nur mit ITGB1 interagieren kann und in Bezug auf die Adhäsionskaskade lediglich an die Hauptliganden Laminin und Thrombospondin bindet (Humphries et al., 2006; Hynes, 2002; Ramovs et al., 2017), ist es ein ideales Ziel für Therapien. Aufgrund dieser speziellen Bindungsaffinität sind weniger starke Nebenwirkungen durch eine Blockade zu erwarten als bei Ansätzen, die gegen andere Integrin-Untereinheiten gerichtet sind. Das Risiko, dass disseminierte Tumorzellen frei in die Peritonealhöhle gelangen, ist während oder nach einer Operation besonders hoch. Die Therapeutika/Blocker sollten im besten Fall lokal und während solcher Zeiten einer vermehrten Dissemination verabreicht werden, damit die intraperitoneale Metastasierung gehemmt werden kann. Falls der Tumor nicht mehr resektabel ist, könnte die terminale Phase der Patient:innen durch eine palliative Therapie auf diese Weise hinausgezögert werden. In einer weiteren präklinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade von ITGA3 durch einen Antikörper die Liganden-vermittelte Integrin-FAK-Signaltransduktion hemmen konnte und hierdurch Ovarialkarzinomzellen *in vivo* zugrunde gingen. Die Antikörpertherapie, alleine oder in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel, hemmte die Tumorprogression und verlängerte das Überleben von Tumor-tragenden Mäusen (Ke et al., 2020). In einer weiteren Studie konnte demonstriert werden, dass durch die ITGA3-Blockade mittels Antikörper beim Glioblastom die Tumorgröße reduziert werden konnte, ebenso wurde die POU3F2-Expression herunterreguliert, wodurch der Stammzellcharakter und die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen reduziert werden konnten (Yao & Wang, 2023).

Im Rahmen dieser Studie wurde eine präklinische, therapeutische RNAi-vermittelte *knockdown*-Strategie basierend auf siRNA entwickelt (Friedrich & Aigner, 2022). Der Erfolg dieses Therapie-Modells blieb allerdings aus. Die Tumorzellen wuchsen zwar an, was durch

die Entstehung von Tumoren an der Einstichstelle infolge der Injektion deutlich wurde, es etablierte sich jedoch keine typische Peritonealkarzinose, auch nicht in der Kontrollgruppe. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben und so ist das Scheitern dieser Therapiestudie nicht eindeutig geklärt. Bislang erfolgte die Nanopartikeltherapie nur im subkutanen Tiermodell (Aigner, 2006; Hampl et al., 2013; Höbel et al., 2010). In dieser Arbeit liefen die ersten Studien zur Hemmung der intraperitonealen Metastasierung, die Komplexe wurden also direkt lokal injiziert. Obwohl die erste Verabreichung der siITGA3/LP10Y-Lipopolyplexe erst 72 h nach Panc89-Zellinjektion erfolgte, kann es sein, dass die Komplexe zu hoch dosiert waren und so die noch nicht etablierten peritonealen Mikrometastasen zugrunde gingen. Dabei könnte es sich um unspezifische toxische Effekte handeln, da die Kontrollgruppe (Injektion von siLuc3/LP10Y-Lipopolyplexen) gleichermaßen betroffen war. Die Tumorzellen im Stichkanal waren für die intraperitoneal applizierten Lipopolyplexe weniger zugänglich und hatten möglicherweise deshalb vergleichsweise gute Voraussetzungen anzuwachsen. Hierzu passend konnte in den Stichkanaltumoren mittels Durchflusszytometrie keine Reduktion der ITGA3-Expression in der *knockdown*-Gruppe gemessen werden. Wie bereits beschrieben, ist das Pankreaskarzinom aufgrund des desmoplastischen Stromas ganz besonders schwer zu behandeln (Hosein et al., 2020; Maitra & Hruban, 2008; Neesse et al., 2011). In dieser Arbeitsgruppe konnten zuvor schon ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Die Zugänglichkeit von Tumorzellen für Antikörper oder Therapeutika ist bei vielen Tumorentitäten ein Problem. Es wurde im Primärtumor der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ein hoher interstitieller Flüssigkeitsdruck gemessen, was die begrenzte Diffusion in den Tumor erklären könnte (Heine et al., 2012).

Trotz dieser vielen präklinischen, Integrin-vermittelten Therapieansätze blieb ein Durchbruch in Bezug auf die klinische Anwendung bislang noch aus. In *in vitro*-Vorversuchen konnte eine Reduktion der Integrin-Untereinheiten durch die eingesetzten siRNA/LP10Y-Komplexe beobachtet werden, dies ließ sich allerdings nicht auf das präklinische Mausmodell übertragen (Abb. 6). Eine zusätzliche Herausforderung ist die Übertragung auf die Klinik. Hier kommen weitere Schwierigkeiten wie die genetische Variabilität der Tumore, die verschiedenen Tumorbeziehungsweise Metastasierungsstadien und die Zugänglichkeit der Tumore dazu. In Abb. 3 sind einige Gründe, die zum therapeutischen Misserfolg beim Einsatz von Integrin-Inhibitoren führen können, dargestellt.



**Abbildung 3: Gründe für einen therapeutischen Misserfolg.** Hindernisse (rot) und strategische Optionen (grün) für eine erfolgreiche Therapie mittels Integrin-Inhibitoren. Modifiziert nach Chen et al. (2022).

Es müssen zukünftig vermutlich mehrere CAMs gleichzeitig behandelt werden, um kooperative beziehungsweise synergistische Effekte zu erzielen. Diese Kombinationen müssen eventuell für die Patient:innen personalisiert werden, um die genetische Variabilität abzudecken, und die Tumore müssen für eine Behandlung zugänglich sein. Hierfür könnte eine zusätzliche Behandlung, die das Tumorstroma (Xu et al., 2022) oder den interstitiellen Flüssigkeitsdruck in den Tumoren (Böckelmann & Schumacher, 2019) als Ziel hat, in Betracht gezogen werden.

## 4 Literaturverzeichnis

- Aigner, A. (2006). Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *J Biomed Biotechnol*, 2006(4), 71659. <https://doi.org/10.1155/jbb/2006/71659>
- Alečković, M., McAllister, S. S., & Polyak, K. (2019). Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1872(1), 89-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.06.002>
- Anderson, L. R., Owens, T. W., & Naylor, M. J. (2014). Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys Rev*, 6(2), 203-213. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0124-0>
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2004). Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol*, 165(5), 723-734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>
- Aroldi, F., & Zaniboni, A. (2017). Immunotherapy for pancreatic cancer: present and future. *Immunotherapy*, 9(7), 607-616. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0142>
- Arun, A. S., Tepper, C. G., & Lam, K. S. (2018). Identification of integrin drug targets for 17 solid tumor types. *Oncotarget*, 9(53), 30146-30162. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25731>
- Attieh, Y., Clark, A. G., Grass, C., Richon, S., Pocard, M., Mariani, P., Elkhatib, N., Betz, T., Gurchenkov, B., & Vignjevic, D. M. (2017). Cancer-associated fibroblasts lead tumor invasion through integrin-β3-dependent fibronectin assembly. *J Cell Biol*, 216(11), 3509-3520. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702033>
- Avula, L. R., Hagerty, B., & Alewine, C. (2020). Molecular mediators of peritoneal metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 39(4), 1223-1243. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09924-4>
- Bakir, B., Chiarella, A. M., Pitarresi, J. R., & Rustgi, A. K. (2020). EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol*, 30(10), 764-776. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*, 339(1), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Bates, R. C., Bellovin, D. I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oettgen, P., & Mercurio, A. M. (2005). Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest*, 115(2), 339-347. <https://doi.org/10.1172/jci23183>
- Berrozpe, G., Schaeffer, J., Peinado, M. A., Real, F. X., & Perucho, M. (1994). Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 58(2), 185-191. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580207>
- Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., & Tuveson, D. A. (2019). IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGFβ to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*, 9(2), 282-301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-18-0710>

- Böckelmann, L. C., & Schumacher, U. (2019). Targeting tumor interstitial fluid pressure: will it yield novel successful therapies for solid tumors? *Expert Opin Ther Targets*, 23(12), 1005-1014. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1702974>
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., Negri, E., Li, D., Risch, H. A., Olson, S. H., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., . . . La Vecchia, C. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol*, 23(7), 1880-1888. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr541>
- Bouzin, C., & Feron, O. (2007). Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist Updat*, 10(3), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.03.001>
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(2), 128-134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
- Burgos, M., Cavero-Redondo, I., Álvarez-Bueno, C., Galán-Moya, E. M., Pandiella, A., Amir, E., & Ocaña, A. (2022). Prognostic value of the immune target CEACAM6 in cancer: a meta-analysis. *Ther Adv Med Oncol*, 14, 17588359211072621. <https://doi.org/10.1177/17588359211072621>
- Cabarcas, S. M., Sun, L., Mathews, L., Thomas, S., Zhang, X., & Farrar, W. L. (2013). The differentiation of pancreatic tumor-initiating cells by vitronectin can be blocked by cilengitide. *Pancreas*, 42(5), 861-870. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318279d568>
- Cagnet, S., Faraldo, M. M., Kreft, M., Sonnenberg, A., Raymond, K., & Glukhova, M. A. (2014). Signaling events mediated by  $\alpha 3 \beta 1$  integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene*, 33(34), 4286-4295. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.391>
- Chaturvedi, P., Singh, A. P., Moniaux, N., Senapati, S., Chakraborty, S., Meza, J. L., & Batra, S. K. (2007). MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res*, 5(4), 309-320. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-06-0353>
- Chen, J., Li, Q., An, Y., Lv, N., Xue, X., Wei, J., Jiang, K., Wu, J., Gao, W., Qian, Z., Dai, C., Xu, Z., & Miao, Y. (2013). CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 43(3), 877-885. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2015>
- Chen, J. R., Zhao, J. T., & Xie, Z. Z. (2022). Integrin-mediated cancer progression as a specific target in clinical therapy. *Biomed Pharmacother*, 155, 113745. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113745>
- Cheng, T. M., Chang, W. J., Chu, H. Y., De Luca, R., Pedersen, J. Z., Incerpi, S., Li, Z. L., Shih, Y. J., Lin, H. Y., Wang, K., & Whang-Peng, J. (2021). Nano-Strategies Targeting the Integrin  $\alpha \beta 3$  Network for Cancer Therapy. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071684>
- Cheng, T. M., Murad, Y. M., Chang, C. C., Yang, M. C., Baral, T. N., Cowan, A., Tseng, S. H., Wong, A., Mackenzie, R., Shieh, D. B., & Zhang, J. (2014). Single domain antibody against carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) inhibits proliferation, migration, invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Eur J Cancer*, 50(4), 713-721. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.07.019>

- Cheuk, I. W., Siu, M. T., Ho, J. C., Chen, J., Shin, V. Y., & Kwong, A. (2020). ITGAV targeting as a therapeutic approach for treatment of metastatic breast cancer. *Am J Cancer Res*, *10*(1), 211-223.
- Chung-Welch, N., Patton, W. F., Yen-Patton, G. P., Hechtman, H. B., & Shepro, D. (1989). Phenotypic comparison between mesothelial and microvascular endothelial cell lineages using conventional endothelial cell markers, cytoskeletal protein markers and in vitro assays of angiogenic potential. *Differentiation*, *42*(1), 44-53. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00606.x>
- Ciardiello, C., Leone, A., Lanuti, P., Roca, M. S., Moccia, T., Minciocchi, V. R., Minopoli, M., Gigantino, V., De Cecio, R., Rippa, M., Petti, L., Capone, F., Vitagliano, C., Milone, M. R., Pucci, B., Lombardi, R., Iannelli, F., Di Gennaro, E., Bruzzese, F., . . . Budillon, A. (2019). Large oncosomes overexpressing integrin alpha-V promote prostate cancer adhesion and invasion via AKT activation. *J Exp Clin Cancer Res*, *38*(1), 317. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1317-6>
- Coccolini, F., Gheza, F., Lotti, M., Virzì, S., Iusco, D., Ghermandi, C., Melotti, R., Baiocchi, G., Giulini, S. M., Ansaloni, L., & Catena, F. (2013). Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*, *19*(41), 6979-6994. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i41.6979>
- Collaborators, P. C. (2019). The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, *4*(12), 934-947. [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(19\)30347-4](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(19)30347-4)
- Connolly, E. C., Freimuth, J., & Akhurst, R. J. (2012). Complexities of TGF- $\beta$  targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci*, *8*(7), 964-978. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4564>
- Cooper, J., & Giancotti, F. G. (2019). Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*, *35*(3), 347-367. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.007>
- Cortés-Guiral, D., Hübner, M., Alyami, M., Bhatt, A., Ceelen, W., Glehen, O., Lordick, F., Ramsay, R., Sgarbura, O., Van Der Speeten, K., Turaga, K. K., & Chand, M. (2021). Primary and metastatic peritoneal surface malignancies. *Nat Rev Dis Primers*, *7*(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00326-6>
- Cotran, R. S., & Karnovsky, M. J. (1968). Ultrastructural studies on the permeability of the mesothelium to horseradish peroxidase. *J Cell Biol*, *37*(1), 123-137. <https://doi.org/10.1083/jcb.37.1.123>
- Dai, W., Xiao, Y., Tang, W., Li, J., Hong, L., Zhang, J., Pei, M., Lin, J., Liu, S., Wu, X., Xiang, L., & Wang, J. (2021). Identification of an EMT-Related Gene Signature for Predicting Overall Survival in Gastric Cancer. *Front Genet*, *12*, 661306. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.661306>
- Das, M., Ithychanda, S., Qin, J., & Plow, E. F. (2014). Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim Biophys Acta*, *1838*(2), 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.017>
- Dedhar, S., Saulnier, R., Nagle, R., & Overall, C. M. (1993). Specific alterations in the expression of alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clin Exp Metastasis*, *11*(5), 391-400. <https://doi.org/10.1007/bf00132982>



- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Duell, E. J., Lucenteforte, E., Olson, S. H., Bracci, P. M., Li, D., Risch, H. A., Silverman, D. T., Ji, B. T., Gallinger, S., Holly, E. A., Fontham, E. H., Maisonneuve, P., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ghadirian, P., Kurtz, R. C., Ludwig, E., Yu, H., Lowenfels, A. B., Seminara, D., . . . Boffetta, P. (2012). Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*, 23(11), 2964-2970. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds140>
- Duxbury, M. S., Ito, H., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2004). c-Src-dependent cross-talk between CEACAM6 and alphavbeta3 integrin enhances pancreatic adenocarcinoma cell adhesion to extracellular matrix components. *Biochem Biophys Res Commun*, 317(1), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.018>
- Duxbury, M. S., Matros, E., Clancy, T., Bailey, G., Doff, M., Zinner, M. J., Ashley, S. W., Maitra, A., Redston, M., & Whang, E. E. (2005). CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg*, 241(3), 491-496. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000154455.86404.e9>
- Everhart, J., & Wright, D. (1995). Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *Jama*, 273(20), 1605-1609.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144(8), 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferrone, C. R., Haas, B., Tang, L., Coit, D. G., Fong, Y., Brennan, M. F., & Allen, P. J. (2006). The influence of positive peritoneal cytology on survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*, 10(10), 1347-1353. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2006.07.013>
- Friedrich, M., & Aigner, A. (2022). Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs*, 36(5), 549-571. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3>
- Gahmberg, C. G., Grönholm, M., & Madhavan, S. (2022). Regulation of Dynamic Cell Adhesion by Integrin-Integrin Crosstalk. *Cells*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cells11101685>
- Gautam, S. K., Kumar, S., Dam, V., Ghersi, D., Jain, M., & Batra, S. K. (2020). MUCIN-4 (MUC4) is a novel tumor antigen in pancreatic cancer immunotherapy. *Semin Immunol*, 47, 101391. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101391>
- Gebauer, F., Wicklein, D., Horst, J., Sundermann, P., Maar, H., Streichert, T., Tachezy, M., Izbicki, J. R., Bockhorn, M., & Schumacher, U. (2014). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as biomarkers in pancreatic cancer. *PLoS One*, 9(11), e113023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113023>



- Gebauer, F., Wicklein, D., Stübke, K., Nehmann, N., Schmidt, A., Salamon, J., Peldschus, K., Nentwich, M. F., Adam, G., Tolstonog, G., Bockhorn, M., Izbicki, J. R., Wagener, C., & Schumacher, U. (2013). Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice. *Gut*, 62(5), 741-750. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300629>
- Genduso, S., Freytag, V., Schetler, D., Kirchner, L., Schiecke, A., Maar, H., Wicklein, D., Gebauer, F., Bröker, K., Stürken, C., Milde-Langosch, K., Oliveira-Ferrer, L., Ricklefs, F. L., Ewald, F., Wolters-Eisfeld, G., Riecken, K., Unrau, L., Krause, L., Bohnenberger, H., . . . Lange, T. (2023). Tumor cell integrin  $\beta 4$  and tumor stroma E-/P-selectin cooperatively regulate tumor growth in vivo. *J Hematol Oncol*, 16(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01413-9>
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., & Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5), 509-516. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.010>
- Glehen, O., & Bhatt, A. (2020). *Pathology of Peritoneal Metastases : The Uncharted Fields*. Springer, Singapore. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-3773-8>
- Glehen, O., Gilly, F. N., Boutitie, F., Bereder, J. M., Quenet, F., Sideris, L., Mansvelt, B., Lorimier, G., Msika, S., & Elias, D. (2010). Toward curative treatment of peritoneal carcinomatosis from nonovarian origin by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy: a multi-institutional study of 1,290 patients. *Cancer*, 116(24), 5608-5618. <https://doi.org/10.1002/cncr.25356>
- Goral, V. (2015). Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(14), 5619-5624. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.14.5619>
- Guenther, C. (2022).  $\beta 2$ -Integrins - Regulatory and Executive Bridges in the Signaling Network Controlling Leukocyte Trafficking and Migration. *Front Immunol*, 13, 809590. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.809590>
- Haabeth, O. A., Tveita, A. A., Fauskanger, M., Schjesvold, F., Lorvik, K. B., Hofgaard, P. O., Omholt, H., Munthe, L. A., Dembic, Z., Corthay, A., & Bogen, B. (2014). How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol*, 5, 174. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00174>
- Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, 186(8), 1729-1754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>
- Hampfl, V., Martin, C., Aigner, A., Hoebel, S., Singer, S., Frank, N., Sarikas, A., Ebert, O., Prywes, R., Gudermann, T., & Muehlich, S. (2013). Depletion of the transcriptional coactivators megakaryoblastic leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO Mol Med*, 5(9), 1367-1382. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202406>
- Han, H., Bearss, D. J., Browne, L. W., Calaluce, R., Nagle, R. B., & Von Hoff, D. D. (2002). Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res*, 62(10), 2890-2896.
- Has, C., Spartà, G., Kiritsi, D., Weibel, L., Moeller, A., Vega-Warner, V., Waters, A., He, Y., Anikster, Y., Esser, P., Straub, B. K., Hausser, I., Bockenbauer, D., Dekel, B., Hildebrandt, F., Bruckner-Tuderman, L., & Laube, G. F. (2012). Integrin  $\alpha 3$  mutations with kidney, lung, and skin disease. *N Engl J Med*, 366(16), 1508-1514. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110813>

- Hashida, H., Takabayashi, A., Adachi, M., Imai, T., Kondo, K., Kohno, N., Yamaoka, Y., & Miyake, M. (2001). The novel monoclonal antibody MH8-4 inhibiting cell motility recognizes integrin alpha 3: inverse of its expression with metastases in colon cancer. *Int J Oncol*, 18(1), 89-95. <https://doi.org/10.3892/ijo.18.1.89>
- Hashida, H., Takabayashi, A., Tokuhara, T., Taki, T., Kondo, K., Kohno, N., Yamaoka, Y., & Miyake, M. (2002). Integrin alpha3 expression as a prognostic factor in colon cancer: association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82. *Int J Cancer*, 97(4), 518-525. <https://doi.org/10.1002/ijc.1625>
- He, Y., Balasubramanian, M., Humphreys, N., Waruiru, C., Brauner, M., Kohlhase, J., O'Reilly, R., & Has, C. (2016). Intronic ITGA3 Mutation Impacts Splicing Regulation and Causes Interstitial Lung Disease, Nephrotic Syndrome, and Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol*, 136(5), 1056-1059. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.031>
- Heidemann, F., Schildt, A., Schmid, K., Bruns, O. T., Riecken, K., Jung, C., Ittrich, H., Wicklein, D., Reimer, R., Fehse, B., Heeren, J., Lüers, G., Schumacher, U., & Heine, M. (2014). Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. *PLoS One*, 9(4), e92327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092327>
- Heine, M., Freund, B., Nielsen, P., Jung, C., Reimer, R., Hohenberg, H., Zangemeister-Wittke, U., Wester, H. J., Lüers, G. H., & Schumacher, U. (2012). High interstitial fluid pressure is associated with low tumour penetration of diagnostic monoclonal antibodies applied for molecular imaging purposes. *PLoS One*, 7(5), e36258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036258>
- Hezel, A. F., Deshpande, V., Zimmerman, S. M., Contino, G., Alagesan, B., O'Dell, M. R., Rivera, L. B., Harper, J., Lonning, S., Brekken, R. A., & Bardeesy, N. (2012). TGF- $\beta$  and  $\alpha v\beta 6$  integrin act in a common pathway to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Res*, 72(18), 4840-4845. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-0634>
- Hinz, B. (2013). It has to be the  $\alpha v$ : myofibroblast integrins activate latent TGF- $\beta 1$ . *Nat Med*, 19(12), 1567-1568. <https://doi.org/10.1038/nm.3421>
- Höbel, S., Koburger, I., John, M., Czubyko, F., Hadwiger, P., Vornlocher, H. P., & Aigner, A. (2010). Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab. *J Gene Med*, 12(3), 287-300. <https://doi.org/10.1002/jgm.1431>
- Höbel, S., Prinz, R., Malek, A., Urban-Klein, B., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Czubyko, F., & Aigner, A. (2008). Polyethylenimine PEI F25-LMW allows the long-term storage of frozen complexes as fully active reagents in siRNA-mediated gene targeting and DNA delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 70(1), 29-41. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.03.014>
- Hosein, A. N., Brekken, R. A., & Maitra, A. (2020). Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 17(8), 487-505. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0300-1>
- Huanwen, W., Zhiyong, L., Xiaohua, S., Xinyu, R., Kai, W., & Tonghua, L. (2009). Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol Cancer*, 8, 125. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-125>
- Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119(Pt 19), 3901-3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>

- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F., & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*, 92(11), 2076-2083. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602619>
- Hylar, A. R., Baudoin, N. C., Brown, M. S., Stremmer, M. A., Cimini, D., Davalos, R. V., & Schmelz, E. M. (2018). Fluid shear stress impacts ovarian cancer cell viability, subcellular organization, and promotes genomic instability. *PLoS One*, 13(3), e0194170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194170>
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673-687. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6)
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Olsen, M., Lowe, A. W., van Heek, N. T., Rosty, C., Walter, K., Sato, N., Parker, A., Ashfaq, R., Jaffee, E., Ryu, B., Jones, J., Eshleman, J. R., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., Hruban, R. H., Brown, P. O., & Goggins, M. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol*, 162(4), 1151-1162. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63911-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63911-9)
- Idichi, T., Seki, N., Kurahara, H., Fukuhisa, H., Toda, H., Shimonosono, M., Yamada, Y., Arai, T., Kita, Y., Kijima, Y., Mataka, Y., Maemura, K., & Natsugoe, S. (2018). Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p. *Oncotarget*, 9(48), 28849-28865. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25599>
- Jakubowski, A., Rosa, M. D., Bixler, S., Lobb, R., & Burkly, L. C. (1995). Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-Ig fusion protein defines distinct affinity states of the very late antigen-4 (VLA-4) receptor. *Cell Adhes Commun*, 3(2), 131-142. <https://doi.org/10.3109/15419069509081282>
- Jayne, D. (2007). Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*, 134, 21-33. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-48993-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-48993-3_2)
- Jiao, Y., Li, Y., Liu, S., Chen, Q., & Liu, Y. (2019). ITGA3 serves as a diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic cancer. *Onco Targets Ther*, 12, 4141-4152. <https://doi.org/10.2147/ott.S201675>
- Kalinina, T., Gungör, C., Thielges, S., Möller-Krull, M., Penas, E. M., Wicklein, D., Streichert, T., Schumacher, U., Kalinin, V., Simon, R., Otto, B., Dierlamm, J., Schwarzenbach, H., Effenberger, K. E., Bockhorn, M., Izbicki, J. R., & Yekebas, E. F. (2010). Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*, 10, 295. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-295>
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., & Kimura, N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*, 95(5), 377-384. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03219.x>
- Ke, F. Y., Chen, W. Y., Lin, M. C., Hwang, Y. C., Kuo, K. T., & Wu, H. C. (2020). Novel monoclonal antibody against integrin  $\alpha 3$  shows therapeutic potential for ovarian cancer. *Cancer Sci*, 111(10), 3478-3492. <https://doi.org/10.1111/cas.14566>
- Kechagia, J. Z., Ivaska, J., & Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(8), 457-473. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>

- Khan, Z., & Marshall, J. F. (2016). The role of integrins in TGF $\beta$  activation in the tumour stroma. *Cell Tissue Res*, 365(3), 657-673. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2474-y>
- Kirkegård, J., Cronin-Fenton, D., Heide-Jørgensen, U., & Mortensen, F. V. (2018). Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. *Gastroenterology*, 154(6), 1729-1736. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.02.011>
- Klapholz, B., & Brown, N. H. (2017). Talin - the master of integrin adhesions. *J Cell Sci*, 130(15), 2435-2446. <https://doi.org/10.1242/jcs.190991>
- Klein, A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(7), 493-502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- Klein, C. A. (2020). Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nat Rev Cancer*, 20(11), 681-694. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00300-6>
- Köhler, S., Ullrich, S., Richter, U., & Schumacher, U. (2010). E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*, 102(3), 602-609. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605492>
- Koivisto, L., Bi, J., Häkkinen, L., & Larjava, H. (2018). Integrin  $\alpha\beta6$ : Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 99, 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.04.013>
- Kreidberg, J. A., Donovan, M. J., Goldstein, S. L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R. C., & Jaenisch, R. (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*, 122(11), 3537-3547. <https://doi.org/10.1242/dev.122.11.3537>
- Krishn, S. R., Garcia, V., Naranjo, N. M., Quaglia, F., Shields, C. D., Harris, M. A., Kossenkov, A. V., Liu, Q., Corey, E., Altieri, D. C., & Languino, L. R. (2022). Small extracellular vesicle-mediated ITGB6 siRNA delivery downregulates the  $\alpha\beta6$  integrin and inhibits adhesion and migration of recipient prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 23(1), 173-185. <https://doi.org/10.1080/15384047.2022.2030622>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lane, D., Robert, V., Grondin, R., Rancourt, C., & Piché, A. (2007). Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer*, 121(6), 1227-1237. <https://doi.org/10.1002/ijc.22840>
- Läubli, H., & Borsig, L. (2010). Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, 20(3), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.04.005>
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*, 834, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
- Lepsenyi, M., Algethami, N., Al-Haidari, A. A., Algaber, A., Syk, I., Rahman, M., & Thorlacius, H. (2021). CXCL2-CXCR2 axis mediates  $\alpha V$  integrin-dependent peritoneal metastasis of colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 38(4), 401-410. <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10103-0>

- Li, M., Wang, Y., Li, M., Wu, X., Setrerrahmane, S., & Xu, H. (2021). Integrins as attractive targets for cancer therapeutics. *Acta Pharm Sin B*, 11(9), 2726-2737. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.004>
- Li, Y., Li, F., Bai, X., Li, Y., Ni, C., Zhao, X., & Zhang, D. (2021). ITGA3 Is Associated With Immune Cell Infiltration and Serves as a Favorable Prognostic Biomarker for Breast Cancer. *Front Oncol*, 11, 658547. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.658547>
- Lian, P. L., Liu, Z., Yang, G. Y., Zhao, R., Zhang, Z. Y., Chen, Y. G., Zhuang, Z. N., & Xu, K. S. (2016). Integrin  $\alpha\beta6$  and matrix metalloproteinase 9 correlate with survival in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 22(14), 3852-3859. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i14.3852>
- Ligorio, M., Sil, S., Malagon-Lopez, J., Nieman, L. T., Misale, S., Di Pilato, M., Ebright, R. Y., Karabacak, M. N., Kulkarni, A. S., Liu, A., Vincent Jordan, N., Franses, J. W., Philipp, J., Kreuzer, J., Desai, N., Arora, K. S., Rajurkar, M., Horwitz, E., Neyaz, A., . . . Ting, D. T. (2019). Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*, 178(1), 160-175.e127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.012>
- Liu, H., Wu, Y., Wang, F., & Liu, Z. (2014). Molecular imaging of integrin  $\alpha\beta6$  expression in living subjects. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 4(4), 333-345.
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
- Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Ji, B. T., Bosetti, C., Li, D., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., Bamlet, W. R., Holly, E. A., . . . Duell, E. J. (2012). Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*, 23(2), 374-382. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr120>
- Madamanchi, A., Zijlstra, A., & Zutter, M. M. (2014). Flipping the switch: integrin switching provides metastatic competence. *Sci Signal*, 7(318), pe9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005236>
- Mahadevan, D., & Von Hoff, D. D. (2007). Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1186-1197. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-06-0686>
- Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*, 3, 157-188. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305>
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., & Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest*, 27(10), 1023-1037. <https://doi.org/10.3109/07357900902769749>
- Maltseva, D. V., & Rodin, S. A. (2018). [Laminins in Metastatic Cancer]. *Mol Biol (Mosk)*, 52(3), 411-434. <https://doi.org/10.7868/s0026898418030059>
- Mamuya, F. A., & Duncan, M. K. (2012).  $\alpha V$  integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: a circle of regulation. *J Cell Mol Med*, 16(3), 445-455. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01419.x>



- Miles, F. L., & Sikes, R. A. (2014). Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression. *Mol Cancer Res*, 12(3), 297-312. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-13-0535>
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *Lancet*, 395(10242), 2008-2020. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30974-0)
- Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., Gress, T., Bassi, C., Klöppel, G., Kalthoff, H., Ungefroren, H., Löhr, M., & Scarpa, A. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*, 439(6), 798-802. <https://doi.org/10.1007/s004280100474>
- Mutsaers, S. E. (2002). Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7(3), 171-191. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2002.00404.x>
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. A., Lolkema, M. P., Buchholz, M., Olive, K. P., Gress, T. M., & Tuveson, D. A. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60(6), 861-868. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.226092>
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M. J., Gallinger, S., Mariette, C., Wente, M. N., Izbicki, J. R., Friess, H., Lerch, M. M., Dervenis, C., Oláh, A., Butturini, G., Doi, R., Lind, P. A., . . . Büchler, M. W. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Jama*, 304(10), 1073-1081. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1275>
- Nicolaou, N., Margadant, C., Kevelam, S. H., Lilien, M. R., Oosterveld, M. J., Kreft, M., van Eerde, A. M., Pfundt, R., Terhal, P. A., van der Zwaag, B., Nikkels, P. G., Sachs, N., Goldschmeding, R., Knoers, N. V., Renkema, K. Y., & Sonnenberg, A. (2012). Gain of glycosylation in integrin  $\alpha 3$  causes lung disease and nephrotic syndrome. *J Clin Invest*, 122(12), 4375-4387. <https://doi.org/10.1172/jci64100>
- Nimmakayala, R. K., Leon, F., Rachagani, S., Rauth, S., Nallasamy, P., Marimuthu, S., Shailendra, G. K., Chhonker, Y. S., Chugh, S., Chirravuri, R., Gupta, R., Mallya, K., Prajapati, D. R., Lele, S. M., T, C. C., J, L. G., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Murry, D. J., . . . Ponnusamy, M. P. (2021). Metabolic programming of distinct cancer stem cells promotes metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 40(1), 215-231. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01518-2>
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Sinn, M., Hinke, A., & Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Jama*, 310(14), 1473-1481. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.279201>
- Owens, D. K., Davidson, K. W., Krist, A. H., Barry, M. J., Cabana, M., Caughey, A. B., Curry, S. J., Doubeni, C. A., Epling, J. W., Jr., Kubik, M., Landefeld, C. S., Mangione, C. M., Pbert, L., Silverstein, M., Simon, M. A., Tseng, C. W., & Wong, J. B. (2019). Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *Jama*, 322(5), 438-444. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.10232>
- Pang, X., He, X., Qiu, Z., Zhang, H., Xie, R., Liu, Z., Gu, Y., Zhao, N., Xiang, Q., & Cui, Y. (2023). Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01259-6>

- Park, H., Bang, J. H., Nam, A. R., Park, J. E., Jin, M. H., Bang, Y. J., & Oh, D. Y. (2020). The prognostic role of soluble TGF-beta and its dynamics in unresectable pancreatic cancer treated with chemotherapy. *Cancer Med*, 9(1), 43-51. <https://doi.org/10.1002/cam4.2677>
- Peng, C., Gao, H., Niu, Z., Wang, B., Tan, Z., Niu, W., Liu, E., Wang, J., Sun, J., Shahbaz, M., Agrez, M., & Niu, J. (2014). Integrin  $\alpha\beta 6$  and transcriptional factor Ets-1 act as prognostic indicators in colorectal cancer. *Cell Biosci*, 4(1), 53. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-53>
- Preziosi, G., Oben, J. A., & Fusai, G. (2014). Obesity and pancreatic cancer. *Surg Oncol*, 23(2), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2014.02.003>
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418-429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>
- Provenzano, P. P., & Hingorani, S. R. (2013). Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *Br J Cancer*, 108(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.569>
- Qin, Y., Rodin, S., Simonson, O. E., & Hollande, F. (2017). Laminins and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin Cancer Biol*, 45, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.07.004>
- Ramovs, V., Secades, P., Song, J. Y., Thijssen, B., Kreft, M., & Sonnenberg, A. (2019). Absence of integrin  $\alpha 3\beta 1$  promotes the progression of HER2-driven breast cancer in vivo. *Breast Cancer Res*, 21(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1146-8>
- Ramovs, V., Te Molder, L., & Sonnenberg, A. (2017). The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biol*, 57-58, 213-243. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.007>
- Rau, B., Piso, P., & Königsrainer, A. (2018). *Peritoneale Tumoren und Metastasen : operative, intraperitoneale und systemische Therapie*. Springer, Berlin. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-54500-3>
- Reader, C. S., Vallath, S., Steele, C. W., Haider, S., Brentnall, A., Desai, A., Moore, K. M., Jamieson, N. B., Chang, D., Bailey, P., Scarpa, A., Lawlor, R., Chelala, C., Keyse, S. M., Biankin, A., Morton, J. P., Evans, T. J., Barry, S. T., Sansom, O. J., . . . Marshall, J. F. (2019). The integrin  $\alpha\beta 6$  drives pancreatic cancer through diverse mechanisms and represents an effective target for therapy. *J Pathol*, 249(3), 332-342. <https://doi.org/10.1002/path.5320>
- Richter, U., Schröder, C., Wicklein, D., Lange, T., Geleff, S., Dippel, V., Schumacher, U., & Klutmann, S. (2011). Adhesion of small cell lung cancer cells to E- and P-selectin under physiological flow conditions: implications for metastasis formation. *Histochem Cell Biol*, 135(5), 499-512. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0804-4>
- Rodt, A. P., Svarrer, R. O., & Iversen, L. H. (2013). Clinical course for patients with peritoneal carcinomatosis excluded from cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World J Surg Oncol*, 11, 232. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-232>

- Rosen, M. N., Goodwin, R. A., & Vickers, M. M. (2021). BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming. *World J Gastroenterol*, 27(17), 1943-1958. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i17.1943>
- Sa, K. D., Zhang, X., Li, X. F., Gu, Z. P., Yang, A. G., Zhang, R., Li, J. P., & Sun, J. Y. (2018). A miR-124/ITGA3 axis contributes to colorectal cancer metastasis by regulating anoikis susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun*, 501(3), 758-764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.062>
- Saba, H., & Goggins, M. (2022). Familial Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 51(3), 561-575. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2022.06.006>
- Sada, M., Ohuchida, K., Horioka, K., Okumura, T., Moriyama, T., Miyasaka, Y., Ohtsuka, T., Mizumoto, K., Oda, Y., & Nakamura, M. (2016). Hypoxic stellate cells of pancreatic cancer stroma regulate extracellular matrix fiber organization and cancer cell motility. *Cancer Lett*, 372(2), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.016>
- Samaržija, I., Dekanić, A., Humphries, J. D., Paradžik, M., Stojanović, N., Humphries, M. J., & Ambriović-Ristov, A. (2020). Integrin Crosstalk Contributes to the Complexity of Signalling and Unpredictable Cancer Cell Fates. *Cancers (Basel)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cancers12071910>
- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., & Kong, D. (2009). Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir*, 64(5), 489-500.
- Sato, N., Sakai, N., Furukawa, K., Takayashiki, T., Kuboki, S., Takano, S., Ohira, G., Matsubara, H., & Ohtsuka, M. (2022). Yin Yang 1 regulates ITGAV and ITGB1, contributing to improved prognosis of colorectal cancer. *Oncol Rep*, 47(5). <https://doi.org/10.3892/or.2022.8298>
- Schmidt-Hansen, M., Berendse, S., & Hamilton, W. (2016). Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care: A Systematic Review. *Pancreas*, 45(6), 814-818. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000527>
- Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., & Thompson, J. (2000). Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, 156(2), 595-605. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64764-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64764-5)
- Schwankhaus, N., Gathmann, C., Wicklein, D., Riecken, K., Schumacher, U., & Valentiner, U. (2014). Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clin Exp Metastasis*, 31(4), 483-496. <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9643-8>
- Shirakihara, T., Kawasaki, T., Fukagawa, A., Semba, K., Sakai, R., Miyazono, K., Miyazawa, K., & Saitoh, M. (2013). Identification of integrin  $\alpha 3$  as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci*, 104(9), 1189-1197. <https://doi.org/10.1111/cas.12220>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Simon-Assmann, P., Orend, G., Mammadova-Bach, E., Spenlé, C., & Lefebvre, O. (2011). Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 55(4-5), 455-465. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103223ps>



- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., & Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch*, 442(5), 444-452. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0784-4>
- Smith, C. E. P., & Prasad, V. (2021). Targeted Cancer Therapies. *Am Fam Physician*, 103(3), 155-163.
- Sökeland, G., & Schumacher, U. (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer*, 18(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0937-3>
- Song, J., Zhang, X., Buscher, K., Wang, Y., Wang, H., Di Russo, J., Li, L., Lütke-Enking, S., Zarbock, A., Stadtmann, A., Striewski, P., Wirth, B., Kuzmanov, I., Wiendl, H., Schulte, D., Vestweber, D., & Sorokin, L. (2017). Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Contributes to Endothelial Junctional Tightness and Thereby Inhibits Leukocyte Transmigration. *Cell Rep*, 18(5), 1256-1269. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.092>
- St Hill, C. A. (2011). Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16(9), 3233-3251. <https://doi.org/10.2741/3909>
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*, 12(8), 895-904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- Stipp, C. S. (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med*, 12, e3. <https://doi.org/10.1017/s1462399409001355>
- Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol*, 8(5), 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>
- Takatsuki, H., Komatsu, S., Sano, R., Takada, Y., & Tsuji, T. (2004). Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cancer Res*, 64(17), 6065-6070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-0321>
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W556-w560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>; <http://gepia2.cancer-pku.cn>
- Tonini, V., & Zanni, M. (2021). Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. *World J Gastroenterol*, 27(35), 5851-5889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i35.5851>
- Tucker, G. C. (2006). Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep*, 8(2), 96-103. <https://doi.org/10.1007/s11912-006-0043-3>
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnström, H., . . . Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*, 357(6352). <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>; <https://v21.proteinatlas.org>
- Ura, H., Denno, R., Hirata, K., Yamaguchi, K., & Yasoshima, T. (1998). Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma. *Surg Today*, 28(10), 1001-1006. <https://doi.org/10.1007/bf02483952>

- Van Aarsen, L. A., Leone, D. R., Ho, S., Dolinski, B. M., McCoon, P. E., LePage, D. J., Kelly, R., Heaney, G., Rayhorn, P., Reid, C., Simon, K. J., Horan, G. S., Tao, N., Gardner, H. A., Skelly, M. M., Gown, A. M., Thomas, G. J., Weinreb, P. H., Fawell, S. E., & Violette, S. M. (2008). Antibody-mediated blockade of integrin alpha v beta 6 inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism. *Cancer Res*, 68(2), 561-570. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-2307>
- van der Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305(3), 285-298. <https://doi.org/10.1007/s004410100417>
- Vicente-Manzanares, M., & Sánchez-Madrid, F. (2018). Targeting the integrin interactome in human disease. *Curr Opin Cell Biol*, 55, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.05.010>
- Vincent, T., Neve, E. P., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P. L., Crystal, R. G., de Herreros, A. G., Moustakas, A., Pettersson, R. F., & Fuxe, J. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 11(8), 943-950. <https://doi.org/10.1038/ncb1905>
- Walter, F. M., Mills, K., Mendonça, S. C., Abel, G. A., Basu, B., Carroll, N., Ballard, S., Lancaster, J., Hamilton, W., Rubin, G. P., & Emery, J. D. (2016). Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 1(4), 298-306. [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(16\)30079-6](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(16)30079-6)
- Wang, H., Chen, H., Jiang, Z., Lin, Y., Wang, X., Xiang, J., & Peng, J. (2019). Integrin subunit alpha V promotes growth, migration, and invasion of gastric cancer cells. *Pathol Res Pract*, 215(9), 152531. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152531>
- Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J., & Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 179(6), 1311-1323. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19(2), 156-172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, M., Zhang, T., Xia, R., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Targeting the tumor stroma for cancer therapy. *Mol Cancer*, 21(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01670-1>
- Yachida, S., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2009). The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 133(3), 413-422. <https://doi.org/10.5858/133.3.413>
- Yalcin, E. G., He, Y., Orhan, D., Pazzagli, C., Emiralioglu, N., & Has, C. (2015). Crucial role of posttranslational modifications of integrin  $\alpha$ 3 in interstitial lung disease and nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet*, 24(13), 3679-3688. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv111>
- Yamada, T., Sato, K., Komachi, M., Malchinkhuu, E., Tobo, M., Kimura, T., Kuwabara, A., Yanagita, Y., Ikeya, T., Tanahashi, Y., Ogawa, T., Ohwada, S., Morishita, Y., Ohta, H., Im, D. S., Tamoto, K., Tomura, H., & Okajima, F. (2004). Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. *J Biol Chem*, 279(8), 6595-6605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308133200>

- Yao, J., & Wang, L. (2023). Integrin  $\alpha 3$  Mediates Stemness and Invasion of Glioblastoma by Regulating POU3F2. *Curr Protein Pept Sci*, 24(3), 247-256. <https://doi.org/10.2174/1389203724666230224115459>
- Yue, H., Hu, Z., Hu, R., Guo, Z., Zheng, Y., Wang, Y., & Zhou, Y. (2022). ALDH1A1 in Cancers: Bidirectional Function, Drug Resistance, and Regulatory Mechanism. *Front Oncol*, 12, 918778. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.918778>
- Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., Krakhmal, N. V., & Perelmuter, V. M. (2019). Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry (Mosc)*, 84(7), 762-772. <https://doi.org/10.1134/s0006297919070071>
- Zhang, G., Li, B., & Lin, Y. (2021). Evaluation of ITGA3 as a Biomarker of Progression and Recurrence in Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Oncol*, 11, 614955. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.614955>
- Zhang, H., Cui, X., Cao, A., Li, X., & Li, L. (2020). ITGA3 interacts with VASP to regulate stemness and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Gene*, 734, 144396. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144396>
- Zhao, M., Mishra, L., & Deng, C. X. (2018). The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci*, 14(2), 111-123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23230>
- Zheng, X., Du, Y., Liu, M., & Wang, C. (2023). ITGA3 acts as a purity-independent biomarker of both immunotherapy and chemotherapy resistance in pancreatic cancer: bioinformatics and experimental analysis. *Funct Integr Genomics*, 23(2), 196. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01122-z>

## 5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
ALDH	Aldehyddehydrogenase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer genes 1/2</i>
BTA	biologisch technische/r Assistent/in
ca.	circa
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule</i>
cm	Zentimeter
Col	Collagen
CSC	<i>cancer stem cell</i>
CTC	<i>circulating tumor cell</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DEG	<i>differentially expressed gene</i>
DTC	<i>disseminated tumor cell</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
Fig.	<i>figure</i>
FN	Fibronektin
g	Gramm
GEPIA2	<i>gene expression profiling interactive analysis version 2</i>
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
h	Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
IgCAM	<i>immunoglobulin cell adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
ITGA1	Integrin alpha-1
ITGA2	Integrin alpha-2
ITGA3	Integrin alpha-3
ITGA5	Integrin alpha-5
ITGA6	Integrin alpha-6
ITGAV	Integrin alpha-V
ITGB1	Integrin beta-1
ITGB3	Integrin beta-3
ITGB4	Integrin beta-4

ITGB5	Integrin beta-5
ITGB6	Integrin beta-6
ITGB8	Integrin beta-8
JAK	Janus-Kinase
kd	<i>knockdown</i>
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma virus</i>
LAP	<i>latency associated peptide</i>
LN	Laminin
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>
LP10Y	<i>tyrosine-modified linear 10 kDa PEI</i>
Luc	Luciferase
m	Meter
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MUC	Mucin
n	Anzahl
PanIN	pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PCI	<i>peritoneal carcinomatosis index</i>
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PEI	Polyethylenimin
p-SMAD	phospho-SMAD
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin, Asparaginsäure
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
S.	Seite
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung
Sel	Selektin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMAD	<i>mother against decapentaplegic homolog</i>
SRC	Tyrosin-Protein Kinase
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TCGA	<i>the cancer genome atlas</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
vs.	versus

wt	Wildtyp
ZEB	<i>zinc finger E-box binding</i> (ZEB1 wird auch als $\delta$ EF-1 bezeichnet)

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Intraperitoneale metastatische Kaskade des humanen Pankreaskarzinoms.....	5
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Integrin-Heterodimere und deren Subgruppen.....	8
Abbildung 3	Gründe für einen therapeutischen Misserfolg.....	93
Abbildung 4	Einfluss von ITGA3 und ITGAV auf die Entwicklung von Peritonealkarzinose und Stichkanaltumoren im PDAC-Xenograftmodell (Endpunktversuch).....	116
Abbildung 5	Detektion von Fernmetastasen nach intraperitonealem Wachstum humaner PDAC-Zellen im Endpunktversuch.....	117
Abbildung 6	Transfektion mittels siRNA/LP10Y-Komplexen.....	118
Abbildung 7	Versuchsdesign zur therapeutischen Hemmung der Peritonealkarzinose mittels siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen.....	118
Abbildung 8	Therapeutisches Xenograftmodell mittels siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen.....	119
Abbildung 9	Durchflusszytometrische Messung der Integrin-Expression in resuspendierten Stichkanal-Xenografttumoren.....	120
Abbildung 10	Gegenregulation der Integrin-Untereinheiten nach ITGAV- <i>knockdown</i> .....	120
Abbildung 11	Adhäsions-Assay.....	121

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Expressionslevel verschiedener Integrin-Untereinheiten auf PDAC-Zelllinien.....	116
Tabelle 2	Differentielle Genexpression in Peritonealkarzinose-Proben von Xenograftmodellen.....	121

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde, ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin einverstanden, dass die Dissertation veröffentlicht wird.

Hamburg,

*Alina Schiecke*

.....  
(Alina Schiecke)



## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei allen, die mich während der gesamten Zeit meiner Promotionsarbeit unterstützten und mir sowohl durch ihren fachlichen Rat als auch durch praktische Hilfe jederzeit zur Seite standen, um diese Arbeit zu konzipieren, durchzuführen und schließlich auch zu beenden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Daniel Wicklein, der es mir ermöglichte, an diesem Projekt zu arbeiten. Insbesondere gilt dies für die große Unterstützung, den gedanklichen Austausch und die persönliche Betreuung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Tobias Lange für die hilfreiche Unterstützung besonders in der Schlussphase dieser Dissertation bedanken und für die Möglichkeit, unter seiner Leitung und mit seinem Input an diesem Institut weiterhin tätig zu sein.

Ich danke Prof. Dr. Udo Schumacher für die herzliche Aufnahme am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie und dafür, dass er stets für eine positive und aufmunternde Arbeitsatmosphäre sorgte und immer motivierende Worte fand.

Im Besonderen möchte ich Prof. Dr. Christian Lohr, der sich bereit erklärte, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen, danken für die freundliche Betreuung außerhalb des Instituts.

Ich danke Prof. Dr. Achim Aigner und Dr. Alexander Ewe für die Kooperation und die Entwicklung beziehungsweise für die Bereitstellung der Polymere für die Nanopartikeltherapie und den regelmäßigen Austausch über den Verlauf des Projekts.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Marius Kemper für die gute Zusammenarbeit am Integrin  $\alpha$ V-Projekt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Vera Freytag, Dr. Sandra Genduso, Dr. Ursula Valentiner, Dr. Marie-Therese Haider, Hanna Maar, Lisa Staffeldt, Sarah Starzonek und Bettina Breitenborn für den hilfreichen Austausch, die vielen konstruktiven Anregungen und Denkanstöße und für die gegenseitige Aufmunterung.

Ohne die tatkräftige Unterstützung bei allen Laborarbeiten, den mentalen Beistand während der Doktorandenzeit und ihr persönliches Engagement wäre meine Arbeit am Institut und diese Dissertation so nicht möglich gewesen, herzlichen Dank an Christine Knies, Jennifer Schröder-Schwarz, Maike Märker, Anna Kerbs, Tobias Gosau, Mia Beine, Julia Kemmling, Espen Matschl und an Ursula Makowski.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, und meinen Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung.

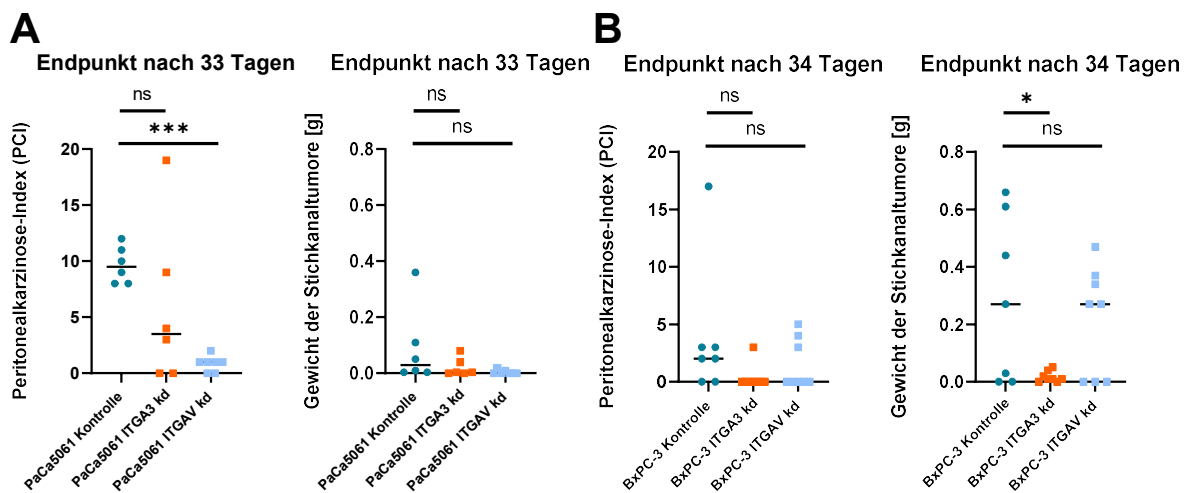
Ganz besonders danke ich meinem Freund Chris für den geduldigen und liebevollen Rückhalt vor allem beim Anfertigen der Dissertationsschrift.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem verstorbenen Großvater, der mein medizinisches und wissenschaftliches Interesse bereits in meiner Kindheit weckte, bedanken.

## 10 Anhang

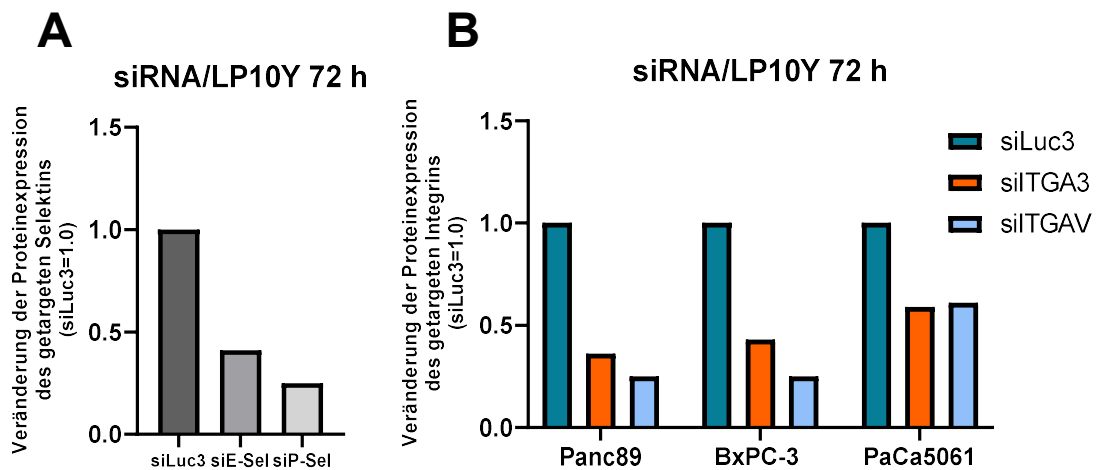
**Tabelle 1: Expressionslevel verschiedener Integrin-Untereinheiten auf PDAC-Zelllinien.** Es wurde die Expression unterschiedlicher Integrin-Untereinheiten auf der Oberfläche von kultivierten humanen Pankreaskarzinomzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. -: keine Expression; (+): schwache Expression; +: mittlere Expression; ++: starke Expression; +++: sehr starke Expression. Die Untereinheiten, die nicht exprimiert wurden, sind rot dargestellt und die Untereinheiten, die exprimiert wurden, grün.

	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha V$	$\beta 1$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 8$
Colo357	++	+	-	(+)	+++	++	+++	-	++	(+)	(+)	-
Hs766t	+	+	-	(+)	+++	+	++	+	++	(+)	(+)	-
Panc89	++	++	-	-	+++	+	+++	-	++	-	+	-
AsPC1	+	+	-	-	+	+	++	-	++	-	(+)	-
8988t	+	++	+	+	++	+	++	(+)	-	(+)	(+)	-
IMIMPC1	++	++	-	(+)	++	+	++	-	++	(+)	(+)	-
CaPan1	-	+	-	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	(+)	-
PaCa 5061	+++	+++	-	+	+++	++	++	-	++	-	+	-
BxPC3	++	+++	-	+	++	+	++	(+)	+	-	+	-



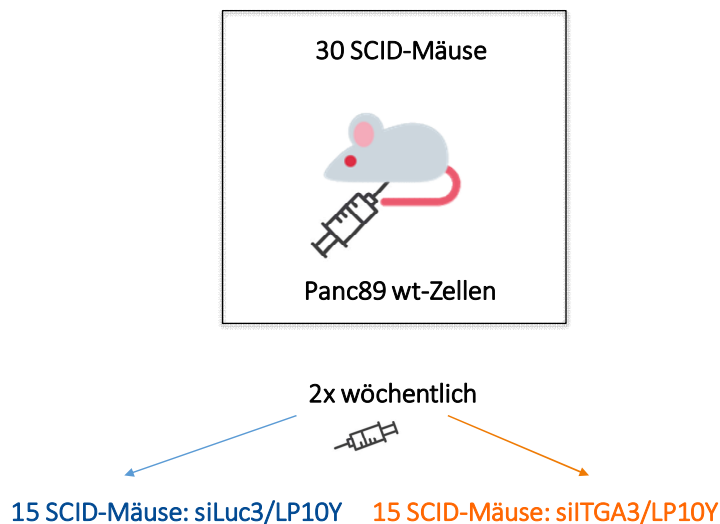
**Abbildung 4: Einfluss von ITGA3 und ITGAV auf die Entwicklung von Peritonealkarzinose und Stichkanaltumoren im PDAC-Xenograftmodell (Endpunktversuch).** Nach intraperitonealer Injektion der Tumorzellen in SCID-Mäuse wurde der Versuch bei der Zelllinie PaCa5061 (**A**) nach 33 Tagen beendet und bei BxPC-3 (**B**) nach 34 Tagen. Die Linien zeigen den Median; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = nicht signifikant.



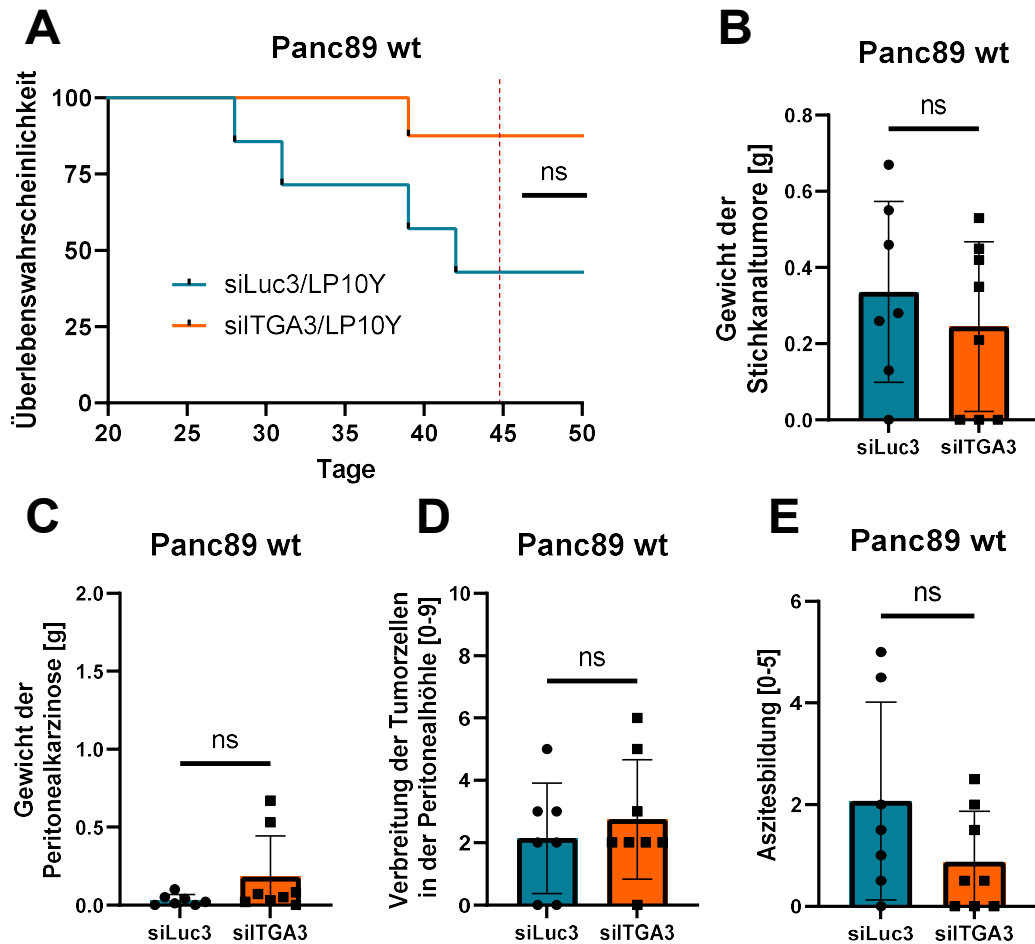


**Abbildung 6: Transfektion mittels siRNA/LP10Y-Komplexen.** Veränderung des Expressionslevels infolge einer transienten siRNA-vermittelten Transfektion. In der durchflusszytometrischen Messung wurde die E- und P-Selektin-Expression auf der Zelloberfläche muriner Endothelzellen (bEND3) nach Transfektion des jeweiligen siRNA/LP10Y-Komplexes (72 h) sowie vierstündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  (20 ng/ml) gemessen (A). Auf der Zelloberfläche der PDAC-Zelllinien Panc89, BxPC-3 und PaCa5061 wurde die ITGA3- beziehungsweise ITGAV-Expression nach Transfektion entsprechender siRNA/LP10Y-Komplexe (72 h) untersucht (B). Das Expressionsniveau von Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt (siLuc3) transfiziert wurden, wurde auf 1.0 gesetzt.

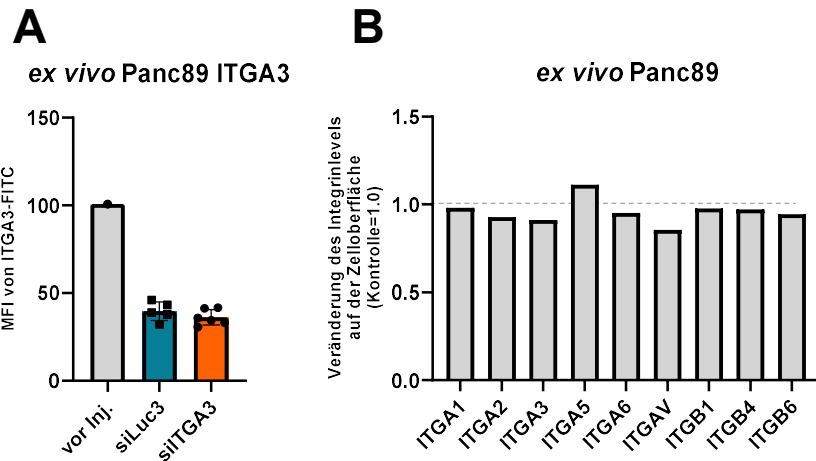
#### Therapeutische Behandlung mit siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen



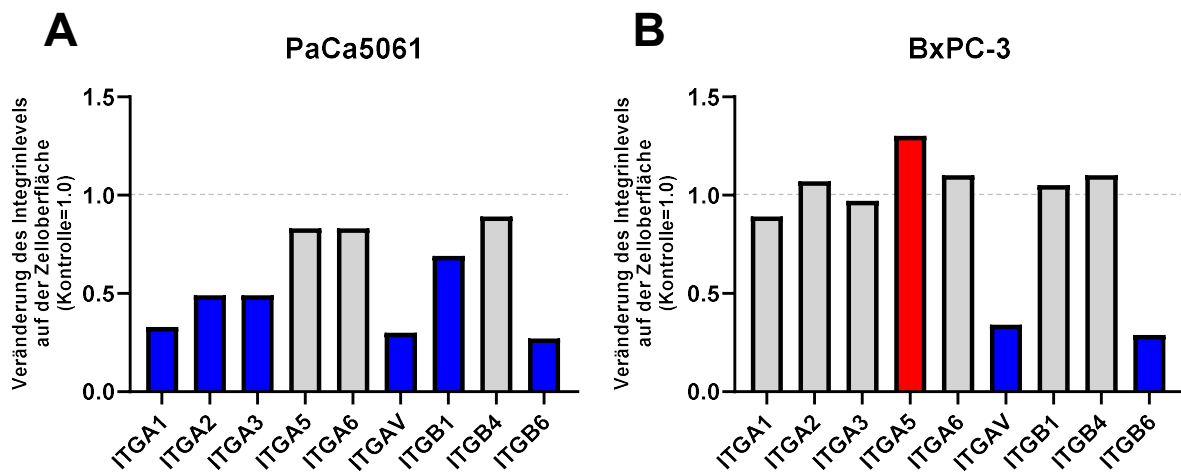
**Abbildung 7: Versuchsdesign zur therapeutischen Hemmung der Peritonealkarzinose mittels siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen.** Parentale (wt) Panc89-Zellen wurden intraperitoneal in SCID-Mäuse injiziert. Die erste Behandlung mit entweder siLuc3/LP10Y- oder siITGA3/LP10Y-Lipopolyplexen erfolgte 72 h nach Tumorzellinjektion und wurde zweimal wöchentlich wiederholt bis zum Erreichen eines Abbruchkriteriums (Größe der Stichkanaltumore oder Ulzeration der Haut) oder bis der Versuch nach 45 Tagen (12 therapeutischen Injektionen) beendet war.



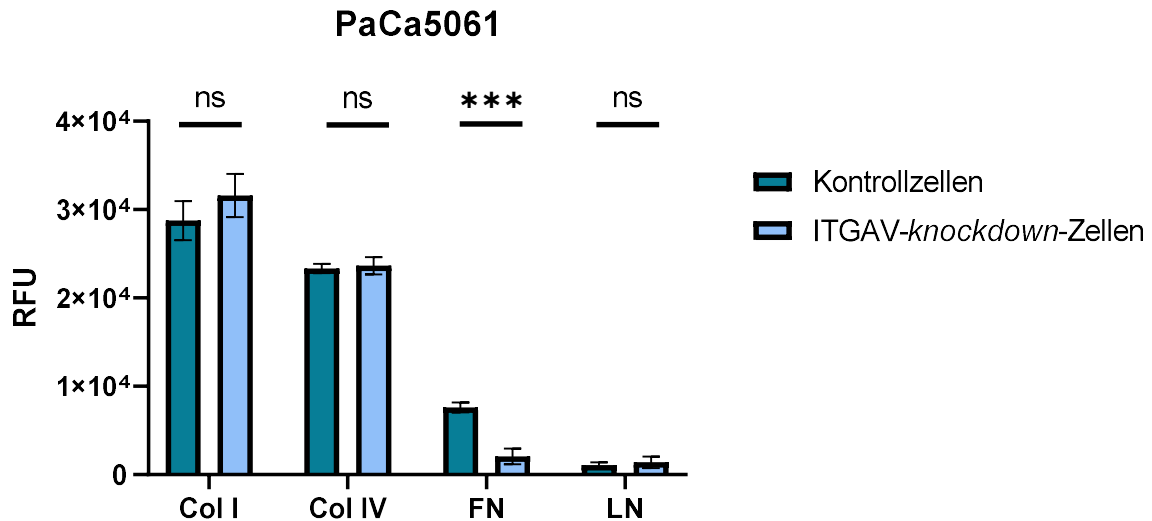
**Abbildung 8: Therapeutisches Xenograftmodell mittels siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen.** Auswirkungen der therapeutischen Behandlung auf Überleben (**A**), Gewicht der Stichkanaltumore (**B**), Gewicht der Peritonealkarzinose (**C**), Verbreitung der Tumorzellen in der Peritonealhöhle (**D**) und Aszitesbildung (**E**), jeweils bei Autopsie nach intraperitonealer Transplantation von parentalen (wt) Panc89-Zellen in SCID-Mäuse (Endpunkt nach 45 Tagen). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD. ns=nicht signifikant.



**Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messung der Integrin-Expression in resuspendierten Stichkanal-Xenografftumoren.** Es wurde überprüft, ob das ITGA3-Expressionslevel sich durch das targeting mittels siRNA/LP10Y-Lipopolyplexen *in vivo* verändert hatte (**A**) und ob es zur Gegenregulation anderer Integrin-Untereinheiten infolge der siITGA3-Behandlung *in vivo* gekommen war (**B**). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD (in **A**). Das Expressionslevel der Kontrollzellen für die jeweiligen Untereinheiten wurde auf 1.0 gesetzt, sodass die Veränderung aufgrund des potentiellen siITGA3-*knockdowns* dargestellt ist (in **B**). MFI=*mean fluorescence intensity*; ns=nicht signifikant.



**Abbildung 10: Gegenregulation der Integrin-Untereinheiten nach ITGAV-knockdown.** Messung verschiedener Integrin-Untereinheiten nach ITGAV-*knockdown* in den PDAC-Zelllinien PaCa5061 (**A**) und BxPC-3 (**B**) *in vitro*. Das Expressionslevel der Kontrollzellen für die jeweiligen Untereinheiten wurde auf 1.0 gesetzt, sodass die Veränderung aufgrund des ITGAV-*knockdowns* dargestellt ist. Herunterregulation von >30 % blau, Hochregulation von >30 % rot und  $\leq$ 30 % grau.



**Abbildung 11: Adhäsions-Assay.** Untersuchung der statischen Zell-EZM-Anhaftung nach 15 min Inkubation von PaCa5061-Kontroll- vs. ITGAV-knockdown-Zellen auf unterschiedlichen Substraten: Collagen I (Col I), Collagen IV (Col IV), Fibronektin (FN), Laminin (LN). Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD von n=3. RFU=*relative fluorescence units*; \*\*\* p<0,001, ns=nicht signifikant.

**Tabelle 2: Differentielle Genexpression in Peritonealkarzinose-Proben von Xenograftmodellen.** Differentiell exprimierte Gene (DEGs) in der ITGA3-knockdown-Gruppe vs. Kontrollgruppe sowohl des Panc89- als auch des BxPC-3-Modells (konkordante Regulation, nur Protein-kodierende Transkripte, FDR<0,01). Die in Abschnitt 3.2 genauer erläuterten herunterregulierten Gene sind fett und unterstrichen.

DOWN		UP	
ABCB11	<u>MUC4</u>	ADAMTS7	LOXL4
ADRA2A	MYRF	ADARB1	LRP3
<u>ALDH1A1</u>	NXF3	AHNAK2	LRRC75B
APOD	PIP5K1B	ARHGAP31	MAGEE1
BCAT1	REEP6	ARHGEF25	MEIS3
CCDC60	RNASE1	B4GALNT3	NOTUM
CCRL2	SELL	BLACAT1	NT5E
CD300LF	SLC44A4	C2CD4C	ODF3B
CDH5	SMPD3	CALB2	PANX2
<u>CEACAM6</u>	SRPX2	CHST2	PID1
CHST4	SUCNR1	COL6A1	POPDC3
COLCA2	SUMF2	CPQ	PPP2R2C
FOXA3	TCN1	DIO2	RAB3IL1
GALNT18	TSPAN8	DYSF	RBP1
GPX2	VSTM5	EN1	SHISAL1
HRNR		EPPK1	SLC35F3
		FAM20C	SLC4A3
		FBLN2	SLC6A16
		FBXO17	SPEG
		FES	SYNE3
		GFPT2	TLR2
		GPSM1	TNF
		HCN2	TNFRSF11B
		IFI6	TRPV3
		IGFL2	ULK2
		IL11	WHRN
		IL6R	WIPF1
		KANK4	