

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. Udo Schumacher

## **Untersuchung zur funktionellen Rolle und Expression von CD44 und seinen Isoformen im humanen Pankreaskarzinom**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades PhD  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hanna Maar  
aus Hamburg

Hamburg 2024

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.09.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Tobias Lange**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer**

Inhalt	
1	Einleitung..... 1
1.1	Das Pankreaskarzinom ..... 2
1.2	Metastasierung..... 3
1.3	CD44..... 4
1.4	CD44 und die extrazelluläre Matrix..... 6
1.5	Klinische Relevanz und Forschungsfragen..... 6
2	Material und Methoden ..... 9
2.1	Kultivierung von Zellen und lentivirale Transduktion ..... 9
2.2	Xenograft-Mausmodell ..... 10
2.3	DNA-Isolation aus Geweben ..... 11
2.4	Human-spezifische quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ..... 11
2.5	Histologische Bestimmung der Anzahl an Lungenmetastasen ..... 12
2.6	RNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Tumorzellen und Xenografttumoren ..... 12
2.7	<i>Paired-end</i> RNA-Sequenzierung ..... 12
2.8	CD44 Isoform-spezifische qRT-PCR ..... 13
2.9	RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array ..... 13
2.10	Durchflusszytometrische Analysen von CD44-Exonvarianten ..... 13
2.11	Apoptose-Assay von 3D-kultivierten Tumorzelllinien ..... 14
2.12	Immunhistochemische (IHC) und histologische Färbungen ..... 14
2.13	Proteinisolation und BCA Protein Assay aus Tumorzellen und Xenografttumoren.. 17
2.14	Western Blot Analysen ..... 17
2.15	Statischer Adhäsionsassay an extrazellulären Matrix-Proteinen..... 17
2.16	Proliferation in 2D und 3D ..... 18
2.17	3D-Viabilitätsassays ..... 18
2.18	<i>In silico</i> Datenbankanalyse..... 19
2.19	Auswertung des PDAC Patient:innen TMAs ..... 19
2.20	Statistische Auswertungen und Datenanalysen ..... 19
3	Ergebnisse..... 20
3.1	Untersuchung von CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom ..... 20
3.2	Etablierung stabiler CD44-KDs in Tumorzellen mittels shRNA ..... 22
3.3	Identifizierung von CD44-Isoformen mittels RNA-Sequenzierung..... 25
3.4	CD44-KD kann zu verringertem Tumorwachstum im Xenograft-Mausmodell führen . ..... 27
3.5	CD44-KD bleibt <i>in vivo</i> nur teilweise stabil ..... 29
3.6	Nachweis der Metastasierung im Xenograftmodell ..... 34
3.7	CD44-KD führt bei PaCa5061 s.c. Xenografttumoren zu einer Anreicherung von extrazellulären Matrixkomponenten..... 36

3.8	Einfluss von CD44 auf die Bindung von Tumorzellen an EZM-Komponenten <i>in vitro</i> .....	42
3.9	Zelllinien-spezifische Effekte der CD44-KDs auf die Tumorzell-Proliferation .....	43
3.10	Viabilität von 3D-kultivierten Tumor-Sphäroiden.....	46
3.11	Zelllinien-spezifische Effekte der CD44-KDs auf die Tumorzell-Apoptose nach 3D-Zellkultur .....	47
3.12	Effekt des CD44-KDs auf die Anzahl der Gefäße in Xenografttumoren .....	50
3.13	CD44-Isoformen in PDAC Patient:innen (TCGA).....	51
3.14	CD44-Isoformen 1-3 sind prognostisch relevant in PDAC Patient:innen.....	52
3.15	CD44-Isoform 4 korreliert stark mit Stroma- und Immunzellen in PDAC Patient:innen (TCGA).....	53
3.16	Diskordante Regulation von Genen durch CD44 Isoform 1-4 (TCGA) .....	55
3.17	CD44v3 und CD44v6 korrelieren eng miteinander in PDAC Patient:innen (TMA-Analysen) .....	55
3.18	Assoziation der CD44 Färberesultate mit den Tumorphänotypen (TMA) .....	59
4	Diskussion .....	61
5	Zusammenfassung .....	71
5	Abstract.....	72
6	Abkürzungsverzeichnis .....	73
7	Literaturverzeichnis .....	75
8	Danksagung .....	82
9	Eidesstattliche Versicherung .....	83

## 1 Einleitung

Die Metastasierung von Tumoren ist nach wie vor die Hauptursache tumorbedingter Todesfälle (Gupta and Massagué, 2006; Steeg, 2006). Das Pankreaskarzinom stellt dabei eine besonders aggressive Tumorart dar, die aufgrund der schnellen Tumorprogression und Metastasierung sowie des relativ späten Auftretens von Symptomen meist nur eine kurze Überlebensdauer für die Patient:innen verspricht (Jin and Bai, 2020; Mizrahi et al., 2020; Siegel et al., 2022). Bei der hämatogenen Metastasierung, also der Ausbreitung von Tumorzellen über die Blutbahn, müssen die Tumorzellen zunächst aus dem Primärtumorverband heraus in umliegende Gefäße gelangen, ehe sie mit dem Blutstrom an andere Orte des Körpers transportiert werden. Damit ihnen das erneute Einwandern ins Gewebe gelingt, müssen sie außerdem in der Lage sein, an die Wände der Blutgefäße zu adhären (Fidler, 2003). Dabei findet eine Interaktion zwischen Oberflächenmolekülen auf den Tumorzellen einerseits und deren Liganden auf den Gefäßendothelzellen andererseits statt (Bendas and Borsig, 2012; Janiszewska et al., 2020; Schwankhaus et al., 2014). Eine besondere Form der Metastasierung beim Pankreaskarzinom ist außerdem das Abschilfern einzelner Tumorzellen vom Primärtumor direkt in die Bauchhöhle, die sogenannte Intraperitonealkarzinose (IP-Karzinose). Hierbei müssen die Tumorzellen an das dem Gefäßendothel ähnelnde Mesothel des Peritoneums adhären können (Avula et al., 2020). Ein viel erforschtes, aber immer noch nicht vollständig verstandenes Oberflächenmolekül, das in Zusammenhang mit Metastasierung gebracht wird, ist CD44 (*Hematopoietic Cell E- And L-Selectin Ligand*, HCELL; *Homing Cell Adhesion Molecule*, H-CAM) (Chen et al., 2018; Gao et al., 2022; Klingbeil et al., 2009; Lange et al., 2022; Senbanjo and Chellaiah, 2017). CD44 ist besonders multifunktional, was auf alternatives Spleißen der mRNA-Transkripte zurückzuführen ist (Senbanjo and Chellaiah, 2017). Seine vielen Isoformen machen es zu einem schwer zu erfassenden Ziel, könnten aber auch bei genauer Isoform-Identifizierung eine Möglichkeit bieten, selbst schwer behandelbare Tumoren wie das Pankreaskarzinom für Therapien zugänglich zu machen. Es gibt wenige Studien zu therapeutischen Ansätzen im Pankreaskarzinom, die auf bestimmte Isoformen oder auch CD44 im Allgemeinen abzielen (Matzke-Ogi et al., 2016; Molejon et al., 2015). Darüber hinaus ist uns nicht bekannt, dass es Publikationen zu Untersuchungen im Pankreaskarzinom-Xenograftmodell gibt, mögliche Effekte einer CD44-Depletion zu analysieren. Einschränkend muss man allerdings erwähnen, dass aus unserer Arbeitsgruppe hervorgehend bereits eine medizinische Doktorarbeit zu CD44 im Pankreaskarzinom entstanden ist (Veröffentlichungsversion\_Fritz\_Benjamin\_20201023.pdf, 2020). Bedauerlicherweise stellte sich im Nachhinein jedoch heraus, dass es beim CD44-Knockdown (CD44-KD) der Zelllinie PaCa5061 eine Kontamination oder Verwechslung mit der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 gegeben haben muss. Wir haben in der vorliegenden Arbeit

daher neue CD44-KDs von authentifizierten bzw. neu erworbenen Zelllinien erstellt und sowohl die Versuchsdurchführung als auch die Fragestellung erweitert. Letztlich bestand für uns weiterhin die Frage nach der Rolle der einzelnen CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom hinsichtlich Tumorwachstum und seiner verschiedenen Metastasierungswege (hämatogen und intraperitoneal).

## **1.1 Das Pankreaskarzinom**

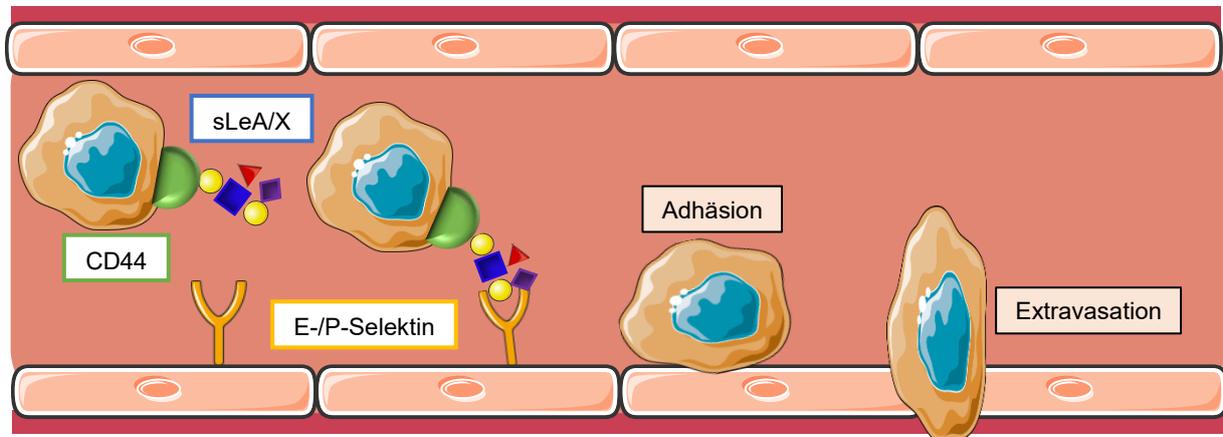
Das Pankreaskarzinom ist ein bösartiger Tumor der Bauchspeicheldrüse. Die häufigste Form mit etwa 90 % ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (Hidalgo et al., 2015), das aus den Epithelzellen der Pankreasgänge hervorgeht. Aufgrund der schnellen Tumorprogression und des späten Auftretens von meist nur diffusen Symptomen, erfolgt eine Diagnose oft erst in weit fortgeschrittenem Stadium, in dem die Tumoren bereits in Leber, Lunge, Lymphknoten oder Knochen metastasieren oder eine IP-Karzinose ausbilden konnten. Als siebthäufigste Todesursache aller Tumorerkrankungen weltweit mit steigender Inzidenz, hat es zudem die niedrigste 5-Jahres-Überlebensrate von gerade einmal 9 % (Bray et al., 2018; Rawla et al., 2019; Siegel et al., 2022; Tonini and Zanni, 2021). Ein weiteres großes Problem beim Pankreaskarzinom stellt die rasche Resistenzentwicklung gegen Chemotherapie, Bestrahlung und Immuntherapie dar, sodass eine kurative Behandlung in den allermeisten Fällen nicht mehr möglich ist (Chen et al., 2022; Hsu et al., 2022; Leonhardt and Hebrok, 2024; Oberstein and Olive, 2013; Quiñero et al., 2019; Zhang, n.d.). Es gilt mittlerweile als anerkannt, dass diese Resistenzen unter anderem auf einzelne Tumorzellen zurückzuführen sind, die Stammzeleigenschaften besitzen und herkömmlichen Therapien entkommen. Diese Tumorstammzellen (CSC = cancer stem cells) sind hochgradig tumorigen und invasiv, was häufig zu frühen Rezidiven und dem vermehrten Auftreten von Metastasen führt (Bisht et al., 2022; Shiozawa et al., 2013; Skoda et al., 2016). Beim weit fortgeschrittenen Pankreaskarzinom kommt es außerdem häufig zu malignen Flüssigkeitsansammlungen im Intraoperitonealraum, dem sogenannten Aszites, welcher zu Symptomen wie Schmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit oder Atembeschwerden bei den Patient:innen führen (Sangisetty and Miner, 2012) und sogar zum Ausbilden von IP-Karzinosen beitragen kann (Jinno et al., 2021; Sangisetty and Miner, 2012; Yamada et al., 2004).

Trotz des Fortschritts bei der Behandlung von Tumorerkrankungen im Allgemeinen und der intensiven Forschung zum Pankreaskarzinom, gibt es bislang noch keine vielversprechende Therapiemethode, um das Überleben von PDAC Patient:innen signifikant zu verbessern. Es bleibt also weiterhin von großem Interesse, die Mechanismen des Pankreaskarzinoms bei der Tumorentwicklung und Metastasierung weiter zu entschlüsseln, um neue Therapieoptionen zu schaffen.

## 1.2 Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung ist ein komplexer Vorgang, bei dem sich einzelne Tumorzellen vom Primärtumor lösen müssen, um in vielen Einzelschritten über den Blutstrom (hämatogene Metastasierung), das Lymphsystem (lymphogene Metastasierung), oder auch durch Absiedelung innerhalb der Bauchhöhle (IP-Karzinose) in anderen Organen Metastasen ausbilden zu können (Steeg, 2006; Valastyan and Weinberg, 2011). Vor allem für die epithelialen Karzinome nimmt man an, dass einzelne Tumorzellen dazu initial eine zellbiologische Umprogrammierung durchlaufen, bei der sie ihre epitheliale Zellpolarität verlieren und mesenchymale Eigenschaften annehmen (epithelial-mesenchymale Transition = EMT). Infolgedessen verringern sich Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, sodass sich die Tumorzellen voneinander und von der Basalmembran ablösen (Dongre and Weinberg, 2019). Der mesenchymalere Charakter mit länglicher Morphologie und veränderten Oberflächenmolekülen verleiht den Tumorzellen außerdem die Fähigkeit zu verbesserter Migration, Invasion und Motilität und damit ein erhöhtes metastatisches Potential. Bei der hämatogenen Metastasierung durchwandern die Tumorzellen zunächst das umliegende Gewebe des Primärtumors bei gleichzeitiger Degradation der extrazellulären Matrix (EZM), um anschließend in angrenzende Blutgefäße einzutreten. Es ist aber auch möglich, dass der Primärtumor durch invasives Wachstum die Wand eines Blutgefäßes durchbricht und die Tumorzellen durch Abschilfern direkt in den Blutkreislauf gelangen (López et al., 2024). Überleben sie die widrigen Bedingungen innerhalb des Blutstroms (Scherstress, Anoikis, Immunzellangriff), müssen sie in der Lage sein, an das Gefäßendothel zu adhären und durch dieses zu transmigrieren (Extravasation) (Abb. 1). Anschließend müssen sie sich am neuen Ort als Metastase etablieren, um sich klinisch zu manifestieren (Valastyan and Weinberg, 2011). Auch bei der IP-Karzinose befinden sich die Tumorzellen, abgelöst aus dem Primärtumorverband, zunächst ohne Verankerung in der Peritonealflüssigkeit. Auch hier müssen es die Tumorzellen aufgrund ihrer begrenzten verankerungslosen Lebensfähigkeit schaffen, an Organe oder die Bauchwand zu adhären, die mit dem Peritoneum überzogen sind. Das Peritoneum ist eine die Bauchhöhle auskleidende Zellschicht aus Mesothelzellen, die den Endothelzellen der Blutgefäße strukturell und funktionell sehr ähnlich sind und somit vergleichbare Voraussetzungen zur Tumorzelladhäsion bieten (Chung-Welch et al., 1989), jedoch ermöglichen hier interzelluläre Spalten zusätzlich eine direkte Bindung an das submesotheliale Bindegewebe (Cotran and Karnovsky, 1968). Die Tumorzelladhäsion ist ein entscheidender Schlüsselschritt der Metastasierung: so fördert eine Interaktion zwischen den Oberflächenmolekülen der Tumorzellen, wie z.B. den pro-adhäsiven Kohlenhydratstrukturen sialyl-Lewis A (sLeA) oder sialyl-Lewis X (sLeX) und deren Bindungspartnern auf den Endothelzellen bzw. Mesothelzellen (E- und P-Selektin) die Metastasierung maßgeblich (Gebauer et al., 2013; Köhler et al., 2010). Ein bereits bekanntes potenzielles Trägerprotein

solcher Kohlenhydratstrukturen, welches bereits mit Tumorprogression und Metastasierung in Zusammenhang gebracht wurde, ist CD44 (Chen et al., 2018; Gao et al., 2022; Klingbeil et al., 2009; Lange et al., 2022; Senbanjo and Chellaiah, 2017).

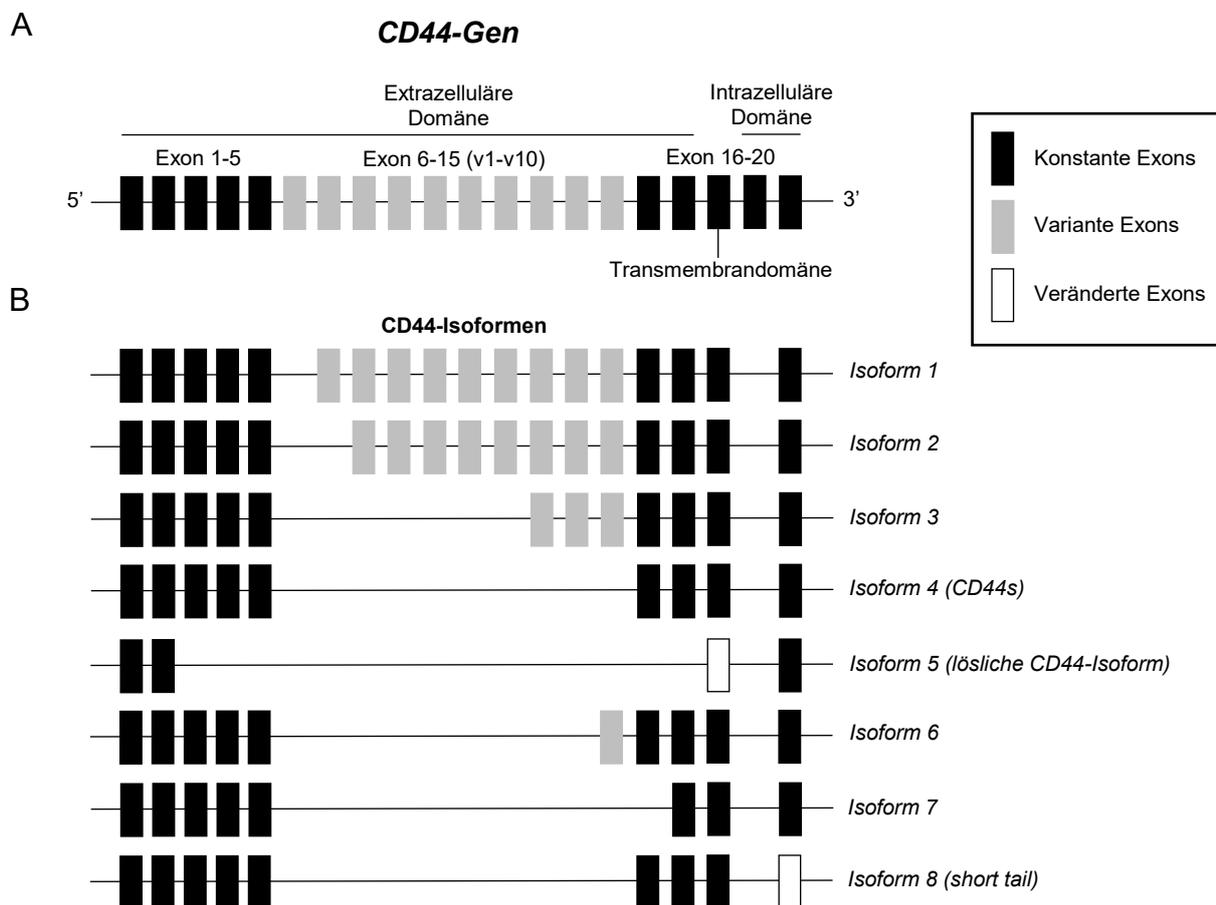


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adhäsion von Tumorzellen während der hämatogenen Metastasierung.** Moleküle der Tumorzell-Oberfläche können mit E- und/oder P-Selektin (gelb) auf der Endothelzell-Oberfläche interagieren, um so in distante Gewebe auswandern zu können (Extravasation). Dies bildet die Voraussetzung für die anschließende Kolonisation zur Bildung einer Metastase. Als Vermittler der Adhäsion auf Seiten der Tumorzelle ist hier beispielhaft das Glykoprotein CD44 (grün) gezeigt, welches u.a. die Zuckermoleküle sLeA oder sLeX (bunt) als Liganden des E-/P-Selektin tragen kann.

### 1.3 CD44

CD44 ist ein multifunktionales Transmembranprotein, welches ubiquitär exprimiert wird und als Tumorstammzellmarker gilt (Durko et al., 2017; Ishiwata, n.d.; Lee et al., 2008). In seiner Funktion als Adhäsionsrezeptor bildet CD44 sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Interaktionen aus und ist damit Teil vieler zellulärer Prozesse (Senbanjo and Chellaiah, 2017). Es hat sich gezeigt, dass CD44 in Tumoren eine Rolle bei der Migration, Invasion und auch der Metastasierung von Tumorzellen spielt (Chen et al., 2018; Naor et al., 2009; Senbanjo and Chellaiah, 2017). Besonders im Fokus stehen dabei die varianten Isoformen von CD44, die vor allem in metastatischen Tumoren exprimiert werden (Giraud et al., 2023; Li et al., 2014). Wie in Abbildung 2A dargestellt, besteht das *CD44*-Gen im menschlichen Genom aus 20 Exons, die in konstante und variante Exons eingeteilt werden können. Die CD44-Standardisoform (Isoform 4, CD44s) entsteht, indem die konstanten Exons (Exon 1-5 und 16-20) zusammengespleißt werden. Exon 19, welches Teile der zytoplasmatischen Domäne kodiert, wird bei den meisten CD44-Isoformen herausgespleißt. Die varianten Exons (Exon 6-15, auch v1-v10 genannt) können durch komplexes alternatives Spleißen zwischen die konstanten Exons eingefügt werden, um verschiedene variante Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (85-250 kDa) zu bilden (Naor et al., 1997; Senbanjo and Chellaiah, 2017). Exon 6 (v1) beinhaltet im menschlichen Genom ein Stopcodon und wird

deshalb nicht exprimiert (Oran-Rousseau, 2015). Die abundantesten CD44-Isoformen im Menschen sind in Abbildung 2B zusammengefasst. Diese Transkriptvarianten stammen aus der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und zeigen die Isoformen, deren Strukturen bereits aufgeklärt sind. Weitere Transkripte sind noch nicht vollends entschlüsselt und deshalb hier nicht mit abgebildet. Insgesamt beläuft es sich aber laut NCBI-Datenbank auf mindestens 62 Isoformen ("Genes for Homo sapiens (human)," n.d.). Auch die Nomenklatur für die Isoformen wurde von NCBI übernommen; andere Datenbanken wie UniProt haben eine ungleiche Zuordnung der Isoformen (Azevedo et al., 2018). Die meisten CD44-Spleißvarianten betreffen die extrazelluläre Domäne und haben somit direkte Auswirkung auf die Interaktion der Zelle mit der Umgebung. Es gibt allerdings auch Ausnahmen wie Isoform 5 (lösliche CD44-Variante) und Isoform 8 (verkürzter zytoplasmatischer Teil), die zwar die Transmembran- und/oder zytoplasmatische Domäne betreffen, aber denen zusätzlich auch alle varianten Exons fehlen (Abb. 2B).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der (A) im CD44-Gen vorkommenden Exons und (B) der bereits beschriebenen CD44-Isoformen (Isoform 1-8).** Durch alternatives Spleißen entstehen distinkte CD44-Isoformen. Alle konstanten Exons (schwarz) bilden zusammen die CD44-Standardisoform (CD44s). Zusammen mit den varianten Exons (grau) ergeben sich verschiedene variante CD44-Isoformen. Es gibt auch Isoformen ohne variante Exons, bei denen konstante Exons herausgespleißt und/oder verändert (weiß) sind (Isoform 5, 7 und 8). Zwei weitere Exons kommen im Menschen nicht/kaum vor: Exon 19 ist in den meisten Isoformen ausgespleißt und Exon 6 kodiert im Menschen ein Stopcodon und wird nicht exprimiert.

#### **1.4 CD44 und die extrazelluläre Matrix**

Der Hauptligand von CD44 ist Hyaluronsäure, ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (Kim and Owen, 2020). Als Glykosaminoglykan trägt Hyaluronsäure zur Struktur, Elastizität und Festigkeit des Gewebes bei und seine Interaktionen mit Zellrezeptoren oder extrazellulären Bindungspartnern sind wichtig für Organentwicklung, Zellmigration und Signalübertragung (Garantziotis and Savani, 2019). Neben Hyaluronsäure kann CD44 aber auch viele weitere EZM-Komponenten binden wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin (Chen et al., 2018; Govindaraju et al., 2019; Hibino et al., 2005). Es ist bereits bekannt, dass der Umbau der extrazellulären Matrix Einfluss auf Proliferation, Apoptose oder auch die Angiogenese während der Tumorprogression nehmen kann (Edderkaoui et al., 2007; Ghura et al., 2021; Nissen et al., 2021; Siddhartha and Garg, 2023; Vaquero et al., 2003; Wang et al., 2021).

Interessanterweise ist die Desmoplasie, also die vermehrte Bildung von faserreichem Bindegewebe innerhalb von Tumoren, sehr charakteristisch für das Pankreaskarzinom. Tumorstammzellen scheinen hierbei eine besondere Rolle für die Stroma-Zusammensetzung zu spielen (Askan et al., 2021). Desmoplastische Reaktionen können verantwortlich sein für eine gesteigerte Tumorzellproliferation, Invasion oder auch Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika (Cannon et al., 2018; Hosein et al., 2020; Toole and Slomiany, 2008). So konnten Provenzano et al. zeigen, dass eine abnormale Anreicherung von Hyaluronsäure im Pankreaskarzinom zu einem gesteigerten Tumordruck und in der Konsequenz zu einer geringeren Eindringtiefe von Chemotherapeutika in das Tumorgewebe führte (Provenzano et al., 2012). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen umgebende Fibroblasten zu vermehrter Proliferation und Bildung von Kollagen I anregten, im Gegenzug aber ebenfalls durch das Kollagen I stärker proliferierten und zudem einen Überlebensvorteil zeigten (Armstrong et al., 2004). Auch zwischen der desmoplastischen Reaktion im Zuge der Tumorprogression und der Bindung von CD44 an seinen Hauptliganden Hyaluronsäure konnte bereits ein Zusammenhang hergestellt werden (Merika et al., 2012). Vor allem die varianten CD44-Isoformen könnten hierbei beteiligt sein, da sie zusätzliche Bindungsmotive besitzen, über die die Tumorzellen in besonderem Maße mit der Umgebung in Kontakt treten können, wie in Chen et al., 2018 postuliert wurde.

#### **1.5 Klinische Relevanz und Forschungsfragen**

Die teilweise gegensätzliche prognostische Relevanz von CD44 bei verschiedenen Tumorarten erschwert eine generelle Aussage zur Funktion bei Tumoren (Chen et al., 2023; Hou et al., 2022; HSU et al., 2018; "Increased CD44s and decreased CD44v6 RNA expression

are associated with better survival in myxofibrosarcoma patients,” n.d.; Kim et al., 2011; Li et al., 2015; Peiper et al., 2004; Rodríguez-Rodríguez et al., 2003). Seine Komplexität ist möglicherweise auf die vielen CD44-Isoformen zurückzuführen - die Identifizierung der Isoformen könnte aber gleichzeitig auch die Chance für spezifische Therapien von Tumoren und deren Metastasen bieten. Es gibt bereits Studien, die Therapieansätze gezielt auf CD44 und/oder CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom untersucht haben. So haben Matzke-Ogi et al. in syngenen Maus- und Rattenmodellen (orthotope oder subkutane Injektion der Tumorzellen) und im orthotopen humanen Xenograftmodell eine inhibitorische Wirkung von CD44-Exon v6-spezifischen Peptiden auf Tumorgröße und Anzahl an Metastasen von Pankreaskarzinomen beobachten können (Matzke-Ogi et al., 2016). Zudem wurde in einer Arbeit von Molejon et al. herausgefunden, dass Pankreastumore während einer Chemotherapie CD44 hochregulieren, was die Primärtumore mit Antikörpern gegen CD44 therapierbar machte. Folglich zeigte sich im Xenograftmodell eine Abnahme der Tumorgröße nach Gabe der Antikörper gegen CD44 (Molejon et al., 2015). Es gab auch bereits Studien mit dem Ziel, die typische desmoplastische Reaktion in PDAC bei der Tumorthherapie zu nutzen, leider jedoch noch ohne Erfolg. So zeigte eine Inhibition des Hedgehog-Signalwegs, welcher für die Initiation der Desmoplasie verantwortlich sein soll, im Xenograftmodell überraschend sogar eine Vermehrung von Desmoplasie (Bailey et al., 2008). Eine direkte Modulation der EZM durch Gabe einer Hyaluronidase hatte in mehreren Studien entweder keine oder sogar fatale Folgen für die Patient:innen im Hinblick auf das Überleben und das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen. So verringerte sich das Überleben im Schnitt von 14,4 Monaten bei Patient:innen mit Chemotherapie auf 7,7 Monate bei Patient:innen mit Chemotherapie in Kombination mit der Hyaluronidase, so dass die Studie frühzeitig beendet wurde. Hinsichtlich Nebenwirkungen wurde ein vermehrtes Auftreten von Thromboembolien, Ermüdung, Muskelspasmen oder Hyponaträmien berichtet (Catenacci et al., 2015; Ramanathan et al., 2019; Van Cutsem et al., 2020). Auch die bereits bei vielen Tumorerkrankungen angewandten Immuntherapien scheinen beim Pankreaskarzinom aufgrund einer sehr niedrigen Immunogenität keine Erfolge zu erzielen (Dong et al., 2002; O’Reilly et al., 2019; Peng et al., 2014; Sahin et al., 2017).

Nach unserem Wissensstand gibt es jedoch noch keine Studien zu den direkten funktionellen Auswirkungen eines CD44-KDs im humanen Pankreaskarzinom-Xenograftmodell auf das subkutane oder intraperitoneale Tumorwachstum und die korrespondierende Metastasierung. Insbesondere sind uns keine Untersuchungen bekannt, in denen die einzelnen CD44-Isoformen nach Tumorwachstum genau identifiziert und in Zusammenhang mit möglichen funktionellen Effekten des CD44-KDs gebracht wurden. Die dringlichsten Fragen waren für uns daher, welche CD44-Isoformen im PDAC prognostisch relevant sind, welche für Xenograftmodelle geeigneten Pankreaskarzinomzellen welche CD44-Isoformen exprimieren,

ob sich ein Isoform-spezifischer KD von CD44 in humanen Pankreaskarzinomzellen realisieren lässt, welche Effekte eine CD44-Depletion auf Tumorwachstum und hämatogene bzw. intraperitoneale Metastasierung im Xenograftmodell hat, und schließlich, welche Rolle CD44 für die Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Kultivierung von Zellen und lentivirale Transduktion

In diesem Projekt wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaCa5061 (freundlicherweise von der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt (Kalinina et al., 2010)), BxPC3 (gekauft bei ATCC; CRL-1687), Panc-89 (freundlicherweise vom Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt) und L3.6pl (Sublinie von COLO-357, (Morgan et al., 1980)) verwendet.

Zur Kultivierung der Tumorzelllinien wurden diese zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:4 passagiert und in Standardmedium (PaCa5061 in RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, #72400-021) + 10 % FBS (fetales Kälberserum, Gibco #10438-026) + 1 % Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin, Gibco, #15070-063) + 0,01 µg/ml bovines Insulin (Sigma-Aldrich, #15500) + 50 nmol/ml humanes Transferrin (Sigma-Aldrich, #T8158) + 0,01 µg/ml rekombinantes humanes EGF (*epidermal growth factor*, PeproTech, #AF100-15) + 0,01 µg/ml humanes FGF (*fibroblast growth factor*, R&D Systems, #233-FB); BxPC3, Panc-89 und L3.6pl in RPMI 1640 (Gibco, #21875-034) + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Das Passagieren der Zellen, sowie das Ablösen für Tierversuche und RNA-Gewinnung erfolgte mit 0,05 % Trypsin-EDTA (Gibco, #25300-054). Das Ablösen der Zellen für den Nachweis von CD44 und seinen Variantenexons und funktionelle Experimente erfolgte mit enzymfreiem Zell-Dissoziationspuffer (*Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-based*, Gibco, #13151-014), da Trypsin das CD44 proteolytisch spalten kann (Biddle et al., 2013).

Um stabile CD44-KDs zu generieren, wurden die Tumorzelllinien PaCa5061 und BxPC3 lentiviral mit shRNA gegen panCD44 ('shCD44', CD44-KD, Nukleotidsequenz: 5'-GGCGCAGATCGATTTGAAT-3'), CD44-Isoform 1 ('shCD44iso1', Nukleotidsequenz: 5'-GAATCCCTGCTACCACTTTG-3'), CD44-Isoform 2 ('shCD44iso2', Nukleotidsequenz: 5'-GCTACCAGTACGTCTTCAAA-3'), CD44-Isoform 3 ('shCD44iso3', Nukleotidsequenz: 5'-AGAATCCCTGCTACCAATATG-3'), CD44-Isoform 4 ('shCD44iso4', Nukleotidsequenz: 5'-ACCAGAGACCAAGACACAT-3'), oder gegen CD44v9 ('shCD44v9', CD44v9-KD, Nukleotidsequenz: 5'-TGAAGGCTTGGAAGAAGATAA-3') oder mit einer Nonsense-Transduktionskontrolle ('shControl', Nukleotidsequenz: 5'-GCCTAAGGTTAAGTCGCCCT-3') transduziert, und für eine Woche mit 1 µg/ml Puromycin (Sigma Aldrich, *Streptomyces Alboniger*, #P8833) in Standardmedium selektioniert. Die Ableitung der shRNA-Sequenzen erfolgte durch Prof. Dr. Daniel Wicklein (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg); die lentivirale Transduktion erfolgte durch PD Dr. Kristoffer Riecken (Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie, Universität Hamburg-Eppendorf).

## 2.2 Xenograft-Mausmodell

Die Tumorzellinjektion in 11-30 Wochen alte männliche und weibliche immundefiziente SCID-Mäuse (CB17/lcr-Prkdc<sup>scid</sup>/lcrIcoCrI)) erfolgte entweder subkutan (s.c.) oberhalb des Schulterblatts oder intraperitoneal (i.p.). Dafür wurden  $1 \times 10^6$  PaCa5061 shControl und shCD44 bzw. BxPC3 shControl und shCD44 Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ L zusatzfreiem Medium injiziert (Gruppengröße  $n \sim 15$ ). Für Versuche mit der Zelllinie PaCa5061 wurden die Tiere in der Forschungstierhaltung des UKE gezüchtet, für Versuche mit der Zelllinie BxPC3 wurden sie bei einem kommerziellen Erzeuger gekauft (Charles River, Erkrath, Deutschland). Die Mäuse wurden in IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*) unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts gleichmäßig auf die Versuchsgruppen verteilt. Endpunkt im s.c.-Modell war das Erreichen eines Tumolvolumens von  $1 \text{ cm}^3$ , im i.p.-Modell das Ausbilden von i.p.-Karzinose. Als Abbruchkriterien galten ein Gewichtsverlust von  $>20 \%$ , eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder Ulkusbildung. Weitere Abbruchkriterien im i.p.-Modell waren ein Stichkanaltumor mit einem Volumen von  $>0,5 \text{ cm}^3$  oder Aszitesbildung. Erreichten die Mäuse eines der genannten Kriterien, wurden sie euthanasiert und anschließend Organe und Tumorgewebe entnommen. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden zuvor von der zuständigen Behörde genehmigt (Behörde für Justiz und Verbraucherschutz der Hansestadt Hamburg, Genehmigungs-Nr. N058/2022).

Für die Blutgewinnung erfolgte eine terminale Herzpunktion in tiefer Ketamin/ Xylazin-Narkose (nach erloschenem Zwischenzehenreflex) mit einem Zielvolumen von 1 ml EDTA-Blut. Anschließend erfolgte die zervikale Dislokation zur sicheren Tötung der Maus. Es folgte die Entnahme des rechten Hinterlaufs im Hüftgelenk, Präparation der Knochen, die anschl. knapp ober- bzw. unterhalb des Hüft- bzw. Kniegelenks sowie im distalen Drittel der Tibia quer eröffnet wurden. Anschließend wurde das Knochenmark mit 200  $\mu$ l NaCl-Lösung (0,9 %) in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen herausgespült.

Unabhängig vom Applikationsweg (i.p. oder s.c.) erfolgte nach Blut- und Knochenmark-Gewinnung eine Eröffnung des Brustkorbs zur Entnahme des rechten Lungenflügels und Fixation für mind. 24 h in 4 %iger Formalinlösung für die spätere Histologie. Der linke Lungenflügel wurde ebenfalls entnommen und für die spätere DNA-Extraktion ohne Zusätze in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Beim s.c.-Versuch folgte dann abschließend die Entnahme des s.c. Primärtumors (getrennt für Histologie bzw. RNA-/ Proteingewinnung). Bei den i.p.-Versuchen folgte nach der Lungenentnahme die Eröffnung der Bauchhöhle und makroskopische Exploration zur Gewinnung intraperitonealer Tumormassen. Hierbei wurden je nach Befund abgrenzbare Tumorknötchen oder von Tumor befallene Darmschlingen, Magen, Milz, Leber, Peritoneum sowie der Stichkanaltumor entnommen. Auch diese Proben wurden sowohl für die spätere histologische bzw. RNA-/ Proteinanalysen asserviert. Für die

durchflusszytometrischen Analysen der s.c. Primärtumoren bzw. der IP-Karzinosen wurden ca. 0,02 g der Tumoren in MACS® Tissue Storage Solution (Miltenyi Biotec, #130-100-008) für bis zu drei Tage bei 4°C bis zur Aufbereitung und Messung (siehe 2.10) gelagert.

### 2.3 DNA-Isolation aus Geweben

Die DNA-Isolation aus 200 µl Blut und der gesamten Knochenmarksspülung aus dem rechten Hinterlauf der Mäuse erfolgte mit dem peqGOLD Blood & Tissue DNA mini Kit der Firma VWR (#13-3396-02) nach Herstellerprotokoll. Zur Isolation der DNA aus den Geweben des linken Lungenflügels und einem Stückchen des größten Leberlappens wurden die Proben in einem vorausgehenden Schritt mit dem TissueLyser II (Qiagen) in Lysis Puffer des o.g. Kits homogenisiert.

### 2.4 Human-spezifische quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die humane Tumorzelllast in einzelnen Geweben und Organen der Mäuse untersuchen zu können (zirkulierende Tumorzellen im Blut, disseminierte Tumorzellen in Knochenmark, Lunge und Leber), wurde eine qRT-PCR mit KAPA SYBR® Fast (Roche, #KK4611) und Primern gegen humane *Alu*-Sequenzen (Forward Primer-Sequenz: 5'-TGGCTCACGCCTGTAATCCCA-3'; Reverse Primer-Sequenz: 5'-GCCACTACGCCCGGCTAATTT-3') (Nehmann et al., 2010) durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Konzentrationen am NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt und je 60 ng DNA pro PCR-Ansatz eingesetzt. Ein PCR-Ansatz bestand aus 2 µl DNA, 0,2 µl *forward* Primer, 0,2 µl *reverse* Primer, 2,6 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl KAPA SYBR® Fast. Die CP-Werte der Messungen konnten anhand einer DNA-Standardreihe einer bestimmten Zellzahl der humanen Tumorzelllinien zugeordnet werden. Die Messungen erfolgten in Triplikaten am Roche LightCycler® 480 mit folgendem Programm.

**Tabelle 1: qRT-PCR Programm für den Nachweis humaner DNA mit Primern gegen *Alu*-Sequenzen.**

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	10 s	} x40 Zyklen
Hybridisierung	67°C	10 s	
Elongation	72°C	10 s	

## 2.5 Histologische Bestimmung der Anzahl an Lungenmetastasen

Zusätzlich zur molekularbiologischen Quantifizierung humaner Zellen in den Lungen der Mäuse (*Alu*-PCR, siehe 2.4) wurden die in Paraffin eingebetteten Lungenhälften für histologische Quantifizierungen der Metastasen genutzt. Hierfür wurden von fünf Mäusen pro Versuchsgruppen die Lungen bis zur Hälfte des Paraffinblocks in 5 µm dicke serielle Schnitte geschnitten und hiervon fünf Schnitte im Abstand von 50 µm zueinander am Ende der Schnittserie mit Hematoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Bestimmung der Anzahl an Lungenmetastasen und eine Berechnung des Mittelwerts pro Maus.

## 2.6 RNA-Isolation und cDNA-Synthese aus Tumorzellen und Xenografttumoren

Die Isolation von RNA aus 2D-kultivierten Tumorzellen erfolgte bei ca. 80 % Subkonfluenz mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, #74104) entsprechend des Herstellerprotokoll. Die Isolation erfolgte aus Xenografttumoren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde das Tumorgewebe in QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, #79306) mit dem IKA T25 ULTRA-TURRAX Dispergiergerät aufgeschlossen und nach Hinzugabe von Chloroform die RNA aus der wässrigen oberen Phase in mehreren Wasch- und Fällungsschritten extrahiert. Um die Genexpression näher in der Real-Time PCR untersuchen zu können, wurden 500-1000 ng RNA mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, #330404) nach Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben.

## 2.7 Paired-end RNA-Sequenzierung

Zur Identifizierung der prädominant exprimierten CD44-Isoformen sowie zur Analyse der Effekte der CD44-Depletion auf das Transkriptom beider Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo*, wurde eine *Paired-end* RNA-Sequenzierung (Novogene UK, Human mRNA Sequencing (WOBI), Illumina Sequencing PE150) durchgeführt (n=3 bei Zelllinien, n=4 bei Xenografttumoren). Hierbei wurde darauf geachtet, gezielt diejenigen Tumore zu analysieren, die, sofern überhaupt ein Unterschied zwischen Kontrolle und KD bestand, im Hinblick auf Tumorwachstum/ -metastasierung am stärksten unterschiedlich waren (nur vorhanden bei PaCa5061 s.c. im Hinblick auf Tumorwachstum). Die bioinformatische Auswertung zur Analyse differentiell regulierter Gene und das Clustering von Genen spezieller Pathways erfolgte in der Bioinformatik Core Facility am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (M. Sc. Michael Spohn).

## 2.8 CD44 Isoform-spezifische qRT-PCR

Das Primer-Design für CD44 Isoform-spezifische, Exon-Exon überspannende Primer erfolgte über NCBI (National Center for Biotechnology Information) Primer-BLAST (Tab.2).

**Tabelle 2: Sequenzen CD44 Isoform-spezifischer Primer.**

	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
CD44 Isoform 1	ACAGAATCCCTGCTACCACTTT	ACCATGAAAACCAATCCCAGGT
CD44 Isoform 2	CCCTGCTACCAGTACGTCTTC	GGTGTGGTTGAAATGGTGCT
CD44 Isoform 3	AGCACAGACAGAATCCCTGC	GAGGTCCTGTCTGTCCAAA
CD44 Isoform 4	ATCCCTGCTACCAGAGACCA	GAGGTTGTGTTTGCTCCACC
CD44 Isoform 5	CGGATTTGAGACCTGCAGTTTG	CTGAGACTTGCTGGCCTCTC
CD44 Isoform 6	GAATCCCTGCTACCAATAGGAAT	AGGTCCTGCTTTCCCTTCGTG
CD44 Isoform 7	CCATCCCAGACGAAGACAGT	TCCCATGTGAGTGTCTGGTAGC
CD44 Isoform 8	ACCCCAAATTCCAGAATGGCT	AGACGATGAAACAGTGCTCTTCT
β-Aktin	GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT	GAAGTGGGGCTTTTAGGAT

Für den Nachweis der CD44-Isoformen wurden die spezifischen Primer mit je 90 ng cDNA und KAPA SYBR® Fast (Roche, #KK4611) am Roche LightCycler® 480 gemessen (Tab. 3). Die CP-Werte der Proben wurden auf das Housekeeping-Gen β-Aktin normalisiert.

**Tabelle 3: qRT-PCR Programm für die Bestimmung von CD44-Isoformen mit Exon-Exon überspannenden Primern.**

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	10 s	} x45 Zyklen
Hybridisierung	60°C	30 s	
Elongation	72°C	20 s	

## 2.9 RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array

Für den RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR-Array (Qiagen, Human Cell Death Pathway Finder™ #PAHS-212ZF) wurden 500 ng RNA der Xenografttumoren (n=3) in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 3.6) und die PCR nach Herstellerprotokoll durchgeführt und ausgewertet.

## 2.10 Durchflusszytometrische Analysen von CD44-Exonvarianten

Um CD44-Exonvarianten nachzuweisen, wurden 1x10<sup>6</sup> kultivierte Tumorzellen oder vereinzelte Zellen aus ca. 0,02 g der Xenografttumoren mittels Antikörper gegen panCD44-

FITC (Diacclone, #852.601.010, Klon B-F24) oder exon-spezifisch gegen CD44v3-APC (Invitrogen, #FAB5088A, Klon 3G5), CD44v6-FITC (Invitrogen, #BMS116FI, Klon VFF-7) oder CD44v9-PE (BioLegend, #394404, Klon RV3) nach Herstellerangaben gefärbt. Zur Vereinzelung der Tumorzellen wurden die Xenografttumoren durch Zellsiebe gestrichen und murine Zellen mit dem Mouse Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec, #130-104-694) aus der Zellsuspension entfernt. Eine Lebend-Tod-Färbung wurde mit Propidiumiodid in einer Konzentration von 1 µg/ml (Sigma-Aldrich, #P4170) durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec) mit anschließender Datenanalyse mithilfe der FlowLogic™ Software (Inivai Technologies Pty. Ltd., Version 8.3).

### **2.11 Apoptose-Assay von 3D-kultivierten Tumorzelllinien**

Um den Anteil apoptotischer Zellen nach verankerungslosem Wachstum in Abhängigkeit vom CD44-Status der Zellen bestimmen zu können, wurden zunächst T25-Flaschen mit 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA, Sigma-Aldrich, # P3932, [12 mg/ml, gelöst in 95 % Ethanol]) beschichtet. Zur Polymerisation der Beschichtung wurden die Flaschen für 3-5 Tage bei 37°C im Trockenschrank aufbewahrt. Anschließend wurden 3x10<sup>5</sup> Kontroll- bzw. CD44-KD-Zellen über vier Tage auf poly-HEMA kultiviert, dann geerntet und nach Herstellerangaben für Annexin V gefärbt (Miltenyi Biotec, #130-092-052). Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (siehe Abschnitt 3.10). Um nekrotische und spät-apoptotische Zellen von früh-apoptotischen Zellen unterscheiden zu können, wurde vor der Messung Propidiumiodid zu den Proben hinzugegeben.

### **2.12 Immunhistochemische (IHC) und histologische Färbungen**

Zum Nachweis unterschiedlicher Expressionsmuster von CD44-Isoformen anhand spezifischer Antikörper für variante Exons wurden Paraffinschnitte von Xenografttumoren oder Tumorstanzen von 93 Pankreaskarzinom-Patient:innen (TMA = *tissue microarray*; Proben gesammelt zwischen 2009 und 2017 und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, sowie in Kooperation mit Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Tumorbiologie, beide Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) mit Antikörpern gegen panCD44 (R&D Systems, #BBA10, Klon 2C5), CD44v3 (R&D Systems, #BBA11, Klon 3G5), CD44v6 (Invitrogen, #MA1-82392, Klon VFF-7), und CD44v9 (Biolegend, #394402, Klon RV3) gefärbt. Bei den Patient:innen-Proben handelte es sich überwiegend um OP-Material aus Whipple-OPs.

Um der Frage des unterschiedlichen Tumorwachstums in den s.c. injizierten Mäusen mit PaCa5061 shControl bzw. shCD44 nachzugehen, wurden die vier Xenografttumoren pro Gruppe, die auch in der Transkriptomanalyse eingesetzt wurden, zusätzlich nach Markern der Proliferation (Ki67, Dako, #M7240, Klon MIB-1), der Seneszenz (Beta-Galaktosidase, LSBio #LS-B10217, Klon 5H2), der Apoptose (cleaved Caspase-3, Cell Signaling, #9579, Klon D3E9), sowie der Gefäßbildung (murines CD31, Dianova, #DIA-310, Klon SZ31) untersucht. Auch die potenzielle gegenseitige Beeinflussung von Tumorwachstum und Tumorumgebung (EZM) wurde mithilfe immunhistochemischer Färbungen gegen einzelne Bestandteile der EZM (Kollagen I (SouthernBiotech, #1310-01), Laminin V (abcam, #ab78286, Klon P3H9-2), Fibronectin (Sigma, #F3648) und Hyaluronsäure (mithilfe von *Hyaluronic Acid Binding Protein*, HABP, gewonnen aus bovinem Nasenknorpel, biotinyliert; Calbiochem, #385911-50)) sichtbar gemacht. Um den Stromaanteil innerhalb der Tumoren insgesamt beurteilen zu können, wurden histologische Färbungen nach Masson Goldner vorgenommen.

**Tabelle 4: Kurzprotokolle der immunhistochemischen/ histologischen Färbungen.**

Antigen	Vorbehandlung	Arbeitskonz. Primärantikörper	Isotyp- kontrolle	Sekundär- antikörper	Detektion
Pan-CD44	Citratpuffer pH 6,0 Wasserbad 85°C, 10 min	10 µg/ml	Mouse IgG2a	Goat anti- mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
CD44v3	Citratpuffer pH 6,0 Wasserbad 85°C, 10 min	1 µg/ml	Mouse IgG2b	Goat anti- mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
CD44v6	Citratpuffer pH 6,0 Dampfkochtopf 85°C, 10 min	10 µg/ml	Mouse IgG1	Goat anti- mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
CD44v9	Citratpuffer pH 6,0 Wasserbad 95°C, 40 min	10 µg/ml	Rat IgG2a	Rabbit anti- rat Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
Ki67	Target retrieval solution pH 6,0 (Dako) Wasserbad 85°C, ü.N.	1,1 µg/ml	Mouse IgG1	Goat anti- mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
β- Galaktosidase	Target retrieval solution pH 6,0 (Dako) Dampfkochtopf 100°C, 20 min	10 µg/ml	Mouse IgG1	Goat anti- mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red

Cleaved Caspase 3	Target retrieval solution pH 6,0 (Dako) Dampfkochtopf 121°C, 10 min	0,73 µg/ml	Rabbit monoklonal	Goat anti-rabbit Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
mCD31	Citratpuffer pH 6,0 Dampfkochtopf 100°C, 20 min	10 µg/ml	Rat IgG2a	Rabbit anti-rat Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
Kollagen I	Citratpuffer pH 6,0 Dampfkochtopf 100°C, 20 min	1,33 µg/ml	Goat IgG1	Rabbit anti-goat Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
Laminin V	Proteinase K (Dako) Wärmeschrank 37°C, 15 min	10 µg/ml	Mouse IgG1	Goat anti-mouse Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
Fibronectin	Target retrieval solution pH 6,0 (Dako) Dampfkochtopf 121°C, 10 min	3,5 µg/ml	Rabbit IgG	Goat anti-rabbit Biotin	Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red
<b>Bindung</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Arbeitskonz.</b>			<b>Detektion</b>
HABP-biotin (Nachweis von Hyaluronsäure)	Target retrieval solution pH 6,0 (Dako) Wasserbad 60°C, ü.N.	6,67 µg/ml			Vectastain® APC-AP Kit + Permanent Red

Zur Standardisierung der IHC-basierten Quantifizierung wurden pro Färbung alle Schnitte parallel gefärbt und unter identischen Bedingungen digitalisiert (Zeiss Axio Scan Z.1). Anschließend wurden bei einer für jede Färbung angepassten, geeigneten Vergrößerung je nach Größe des Gewebestücks 3 bis 33 Blickfelder fotografiert (NetScope Viewer) und der Anteil der gefärbten Fläche (prozentual zur Gesamtfläche des Fotos) halb-automatisiert mit der open source Software „Color Segmentation Toolbox“ (<https://github.com/RBartho/ColorSegmentationToolbox>, Ralf Bartho, Institut für Anatomie I, Universitätsklinikum Jena) quantifiziert. Pro Färbung wurde hierfür zuvor ein individueller Farb-Threshold festgelegt, so dass nur eindeutig gefärbte Gewebsteile erfasst wurden. Die Auswertung der murinen CD31 Färbung erfolgte durch manuelle Bestimmung der mittleren Gefäßanzahl pro Blickfeld.

### **2.13 Proteinisolation und BCA Protein Assay aus Tumorzellen und Xenografttumoren**

Um Proteinlysate herzustellen, wurden alle Zellen einer T75-Flasche bei ca. 80 %iger Subkonfluenz mittels Zellschaber abgelöst und in 200 µl RIPA-Puffer pH 7,4 (65 mM Tris (Sigma, #T1503) + 154 mM NaCl + 1 % Nonidet P40 (Roche, #11754599001) + 0,1 % SDS + 1 mM EDTA) + 1:100 Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem, #539131) + 1 mM Natriumorthovanadat (Sigma-Aldrich, #S6508) resuspendiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation bei 18.620 g für 30 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde der Überstand gewonnen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinlysate wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, #23225) nach Herstellerprotokoll verwendet.

### **2.14 Western Blot Analysen**

Zur Detektion der CD44 Proteinbandenmuster wurden 30 µg Proteinlysate von *in vitro*-kultivierten Tumorzellen in NuPAGE™ 4 bis 12 % Bis-Tris Mini-Protein-Gelen (Invitrogen, #NP0335BOX) aufgetrennt und mithilfe des iBlot™ 2 Gel-Transfergeräts (Invitrogen, #IB21001) auf iBlot™ 2 PVDF-Transferstapel (Invitrogen, #IB24002) übertragen. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde die PVDF-Membran anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit StartingBlock™ (PBS) Blocking Buffer (Invitrogen, #37538) inkubiert und für eine weitere Stunde mit einem pan-spezifischen Antikörper gegen CD44 (R&D, #BBA10, Klon 2C5) in einer Konzentration von 1 µg/ml versetzt. Zur Detektion des CD44-Signals wurde ein Anti-Maus Sekundärantikörper mit HRP-Markierung (*horseradish peroxidase*) (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulin/ HRP, Dako, #P0447) verwendet, und mit dem SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz Substrat (Invitrogen, #34580) im Chemilumineszenz Imaging-System FUSION Solo S (Vilber) sichtbar gemacht.

### **2.15 Statischer Adhäsionsassay an extrazellulären Matrix-Proteinen**

Die Interaktion der Tumorzellen mit bzw. ohne CD44-KD mit Proteinen der extrazellulären Matrix wurde mithilfe eines statischen Adhäsionsassays untersucht. Hierbei wurden 24-Well Platten (Falcon, #353047) mit 1 mg/ml Hyaluronsäure (Sigma-Aldrich, #H5388-250MG), einem Kollagenmix mit 1 µg/ml des jeweiligen Kollagens (Merck Millipore, Kollagen I #CC050, Kollagen III #CC054 und Kollagen IV #CC076), einem Lamininmix mit je 1 µg/ml Laminin (Biolamina, Laminin V #LN332-0502, Laminin X #LN511-0501 und Laminin XI #LN521-05), 1 µg/ml Fibronectin (Sigma-Aldrich, #F0895-1MG) oder mit 2 % BSA (Bovines Serum-Albumin, Sigma-Aldrich, #A7906-500G) als Negativkontrolle für 24 Stunden bei 4°C beschichtet. Dann

wurden pro untersuchter Zelllinie  $3 \times 10^5$  Tumorzellen - entnommen bei gleicher Subkonfluenz - bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 Minuten in  $400 \mu\text{l}$  serumfreiem Medium hinzugegeben und nach dreimaligem Waschen mit PBS für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  mit Calcein-AM (BD Pharmingen, #564061) in einer Konzentration von  $4 \mu\text{g/ml}$  in  $500 \mu\text{l}$  HBSS (Gibco, #14025-050) gefärbt. Die Fluoreszenzmessung (als Maß für die Anzahl an EZM-Komponenten adhärierter Zellen) erfolgte am TECAN GENios bei einer Wellenlänge von  $485/535 \text{ nm}$ .

## 2.16 Proliferation in 2D und 3D

Die Bestimmung der Proliferation der Tumorzellen in 2D erfolgte über die Aussaat von  $5 \times 10^4$  Zellen in eine T25-Flasche ( $n=3$ ) mit anschließender Zellzählung nach vier Tagen mittels automatischem Zellzähler (Invitrogen™, Countess™ 3). Die Fähigkeit von Tumorzellen in 3D zu proliferieren, wurde in einem 3D-Assay mit verankerungsloser Umgebung getestet. Hierfür wurden  $1 \times 10^3$  Tumorzellen in mit 2-Hydroxyethylmethacrylat (Sigma-Aldrich, #P3932, [12 mg/ml, gelöst in 95 % Ethanol]) beschichtete Rundboden-96-Well-Platten gegeben und das Wachstum der Tumorzell-Sphäroide über 10 Tage mittels Fotos dokumentiert. Die Flächen der Sphäroide wurden mit Fiji ImageJ ausgemessen.

## 2.17 3D-Viabilitätsassays

Die Überlebensfähigkeit der Tumorzelllinien unter 3D-Bedingungen wurde in zwei verschiedenen Assays getestet. Um die Situation der subkutanen Tumore zu simulieren, wurden zunächst die Wells mit  $30 \mu\text{l}$  1 % Softagar beschichtet und dann die *in vitro* kultivierten Tumorzellen mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^3$  Zellen/ 96-Well (Thermo Scientific™ Nunc MicroWell 96-Well-Platten, #165306) in  $50 \mu\text{l}$  0,5 % Softagar (Sigma-Aldrich, #A4018) in Medium auf die vorbeschichteten Wells gegeben. Der Softagar mit den Zellen musste sich dann über 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  verfestigen. Danach wurde alles mit  $100 \mu\text{l}$  Medium pro Well bedeckt. Für die Simulation der IP-Karzinose wurden  $2 \times 10^3$  Zellen in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  Medium in Elplasia® 96-Well-Mikrotiterplatten mit extrem niedriger Bindung (*ultra-low attachment*, Corning™, #4442) pipettiert. Hierbei befinden sich die Tumorzellen, anders als im Softagar, nicht in einer semi-soliden Umgebung, sondern in Flüssigkeit. In beiden Versuchsansätzen wurden die Zellen über vier Tage kultiviert und anschließend mit  $100 \mu\text{l}$  Well CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, #G9682) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Die Lumineszenzintensitäten wurden am TECAN GENios gemessen.

## **2.18 *In silico* Datenbankanalyse**

Uni- und multivariate Analysen zur Prognoserelevanz der CD44-Isoformen für PDAC Patient:innen und auch zur Verteilung der CD44-Isoformen und deren Korrelation untereinander sowie mit Stroma- und Immunzellen wurde mithilfe von The Cancer Genome Atlas (TCGA) Datenbankanalysen durchgeführt (Dr. Stepan Nersisyan, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia).

## **2.19 Auswertung des PDAC Patient:innen TMAs**

Zur Auswertung der panCD44-, CD44v3-, CD44v6- bzw. CD44v9-gefärbten PDAC TMAs wurde ein Score für die Intensität der Färbungen der Tumorzellen, der Stromazellen/ des Stromas bzw. der tumor-assoziierten Leukozyten erhoben. Anhand dieses Scores wurde eine Korrelationsanalyse für die Signalintensität von panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9 in den Tumorzellen durchgeführt.

## **2.20 Statistische Auswertungen und Datenanalysen**

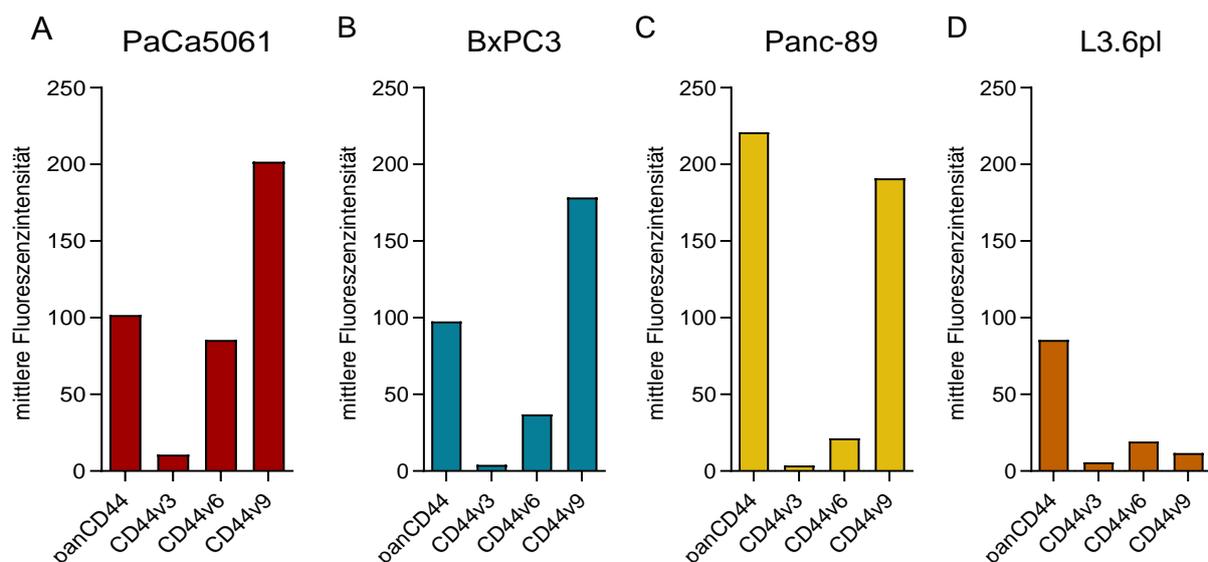
Alle grafischen Abbildungen wurden mit GraphPad Prism (Version 9.3.0) erstellt. Die statistischen Analysen der Kaplan-Meier Kurven aus dem Tierversuch erfolgten mittels Gehan-Breslow-Wilcoxon-Tests, die Korrelationsanalysen zwischen CD44-Färberesultaten nach der Spearman-Korrelation. Für die Analyse potenzieller Unterschiede in den Zell-basierten und Xenograft-Experimenten sowie den Assoziations-Analysen des TMAs wurde der Student's T-test verwendet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung von CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom

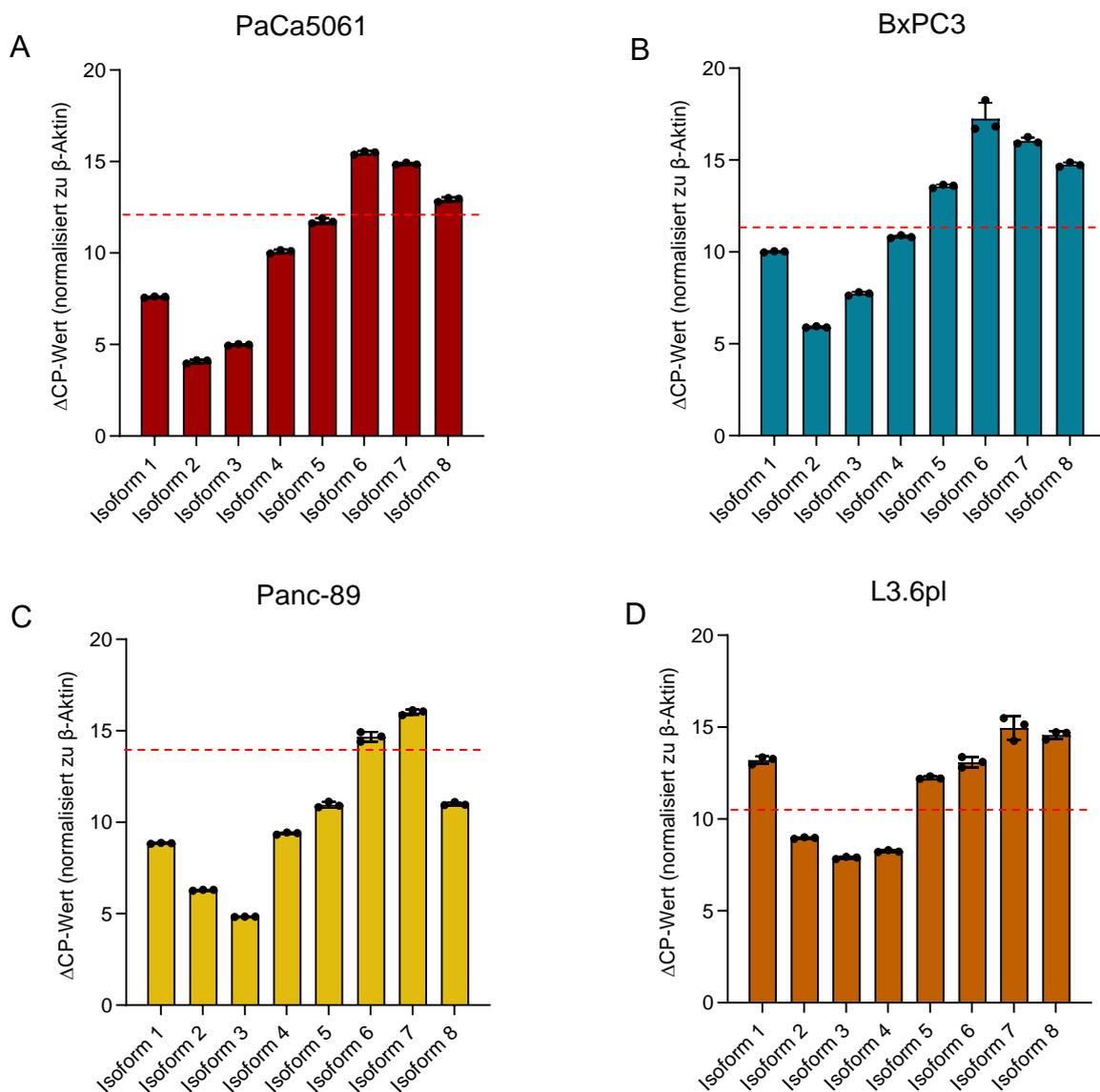
Um die Rolle der CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom untersuchen zu können, haben wir die humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaCa5061, BxPC3, Panc-89 und L3.6pl auf die Expression von CD44-Isoformen überprüft (Abb. 3A-D). Das Gesamtlevel an CD44 und die Level derjenigen Isoformen, die variante Exons beinhalten, wurden mittels Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen Gesamt-CD44 (panCD44) oder einzelne CD44-Variantenexons (CD44v3, CD44v6, CD44v9) bestimmt. Hierbei konnten wir beobachten, dass PaCa5061 und BxPC3 vergleichbare Fluoreszenzsignale sowohl für panCD44, als auch für die CD44-Variantenexons zeigten. Dabei wiesen beide Zelllinien moderate Signale an CD44v3, etwas stärkere Signale an CD44v6 und noch stärkere Signale für panCD44 und CD44v9 auf (Abb. 3A+B). Hierbei muss beachtet werden, dass die Antikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert waren und sich dadurch keine absolute quantitative Aussage treffen lässt (CD44v9 zeigte hier ein stärkeres Signal als panCD44).

Die beiden anderen Pankreaskarzinomzelllinien zeigten ein etwas anderes Muster in der Durchflusszytometrie; während Panc-89 vor allem sehr starke Fluoreszenzsignale mit den Antikörpern gegen panCD44 und CD44v9 aufwies (Abb. 3C), waren die Signale der CD44-Isoformen mit Variantenexons bei L3.6pl weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu panCD44 (Abb. 3D).



**Abbildung 3: CD44-Expressionsmuster der vier Pankreaskarzinomzelllinien (A) PaCa5061, (B) BxPC3, (C) Panc-89 und (D) L3.6pl.** Der Fluoreszenznachweis erfolgte mit Antikörpern gegen panCD44 und CD44-Variantenexons (v3, v6, v9) am Durchflusszytometer. Zum Screening wurden diese Messungen als Einfachbestimmung durchgeführt.

Da die durchflusszytometrischen Signale der Variantenexons nicht eindeutig einzelnen CD44-Isoformen zugeordnet werden können, da sie in mehreren Isoformen vorkommen können, haben wir zusätzlich Isoform-spezifische qRT-PCRs etabliert und durchgeführt. Auch hier zeigten PaCa5061 und BxPC3 wieder sehr vergleichbare Messergebnisse. Die abundanteste CD44-Isoform ist bei beiden Zelllinien Isoform 2, gefolgt von Isoform 3, 1 und 4 (Abb. 4A+B). Dagegen ist bei Panc-89 die Isoform 3 dominierend, gefolgt von Isoform 2, 1 und 4 (Abb. 4C). Bei L3.6pl ist, wie auch bei Panc-89, Isoform 3 am stärksten exprimiert, allerdings ist am zweit-abundantesten Isoform 4, und erst dann kommt Isoform 2 (Abb. 4D). Das Signal von Isoform 1 ist bei L3.6pl sogar geringer als bei Isoform 5 (lösliche CD44-Isoform), die bei den anderen Zelllinien in einem unter-schweligen Expressionsbereich liegt.



**Abbildung 4: Quantitative Bestimmung der CD44-Isoform Expression mittels qRT-PCR.** Die cDNA von (A) PaCa5061, (B) BxPC3, (C) Panc-89 und (D) L3.6pl wurde mit Isoform-spezifischen Primern in der qRT-PCR getestet. Die CP-Werte wurden im Anschluss auf  $\beta$ -Aktin normalisiert ( $\Delta$ CP = CP-Wert CD44-Isoform abzüglich CP-Wert  $\beta$ -Aktin). Die rote Linie zeigt einen CP-Wert von 30 abzgl. des CP-Werts von  $\beta$ -Aktin zur Darstellung der Nachweisgrenze. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD.

Aufgrund der ähnlichen bzw. relativ hohen Fluoreszenzsignale von PaCa5061 und BxPC3 hinsichtlich der CD44-Variantenexons in der Durchflusszytometrie (v6, v9), aber auch der gleichen Verteilung der CD44-Isoformen in der qRT-PCR (Isoformen 1-4), haben wir nachfolgende Analysen nur noch mit diesen beiden Zelllinien durchgeführt.

### **3.2 Etablierung stabiler CD44-KDs in Tumorzellen mittels shRNA**

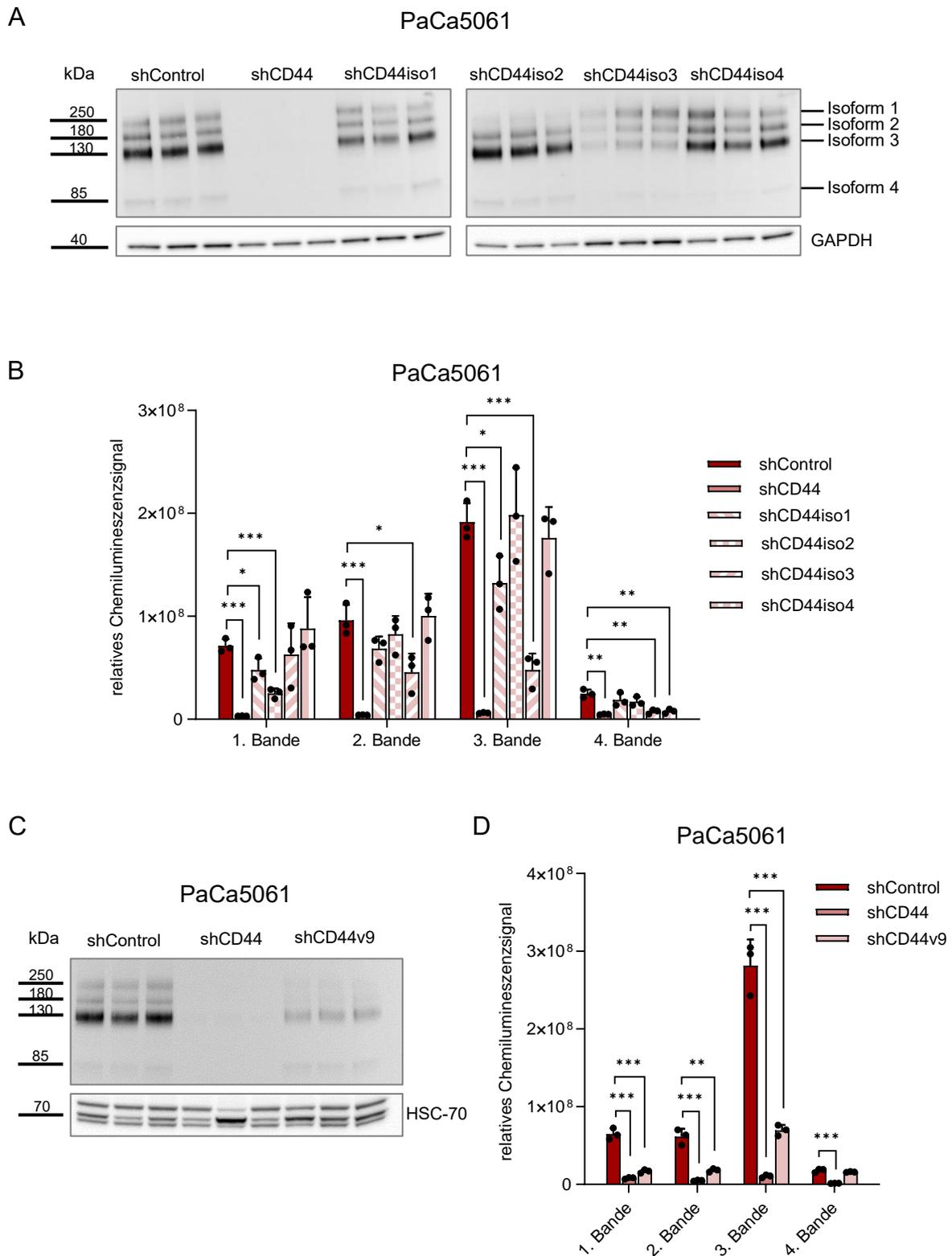
Um funktionelle Analysen zur Bedeutung einzelner CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom zu ermöglichen, haben wir versucht, CD44-KDs sowohl aller (panCD44), als auch der abundantesten CD44-Isoformen (Isoformen 1-4) zu generieren. Die Transduktion der beiden Pankreaskarzinomzelllinien PaCa5061 und BxPC3 erfolgte lentiviral, um stabile KD-Derivate gegen panCD44, Isoform 1, 2, 3 und 4 und gegen alle Isoformen mit dem Variantenexon CD44v9 (Isoform 1, 2 und 3) zu erhalten. Zur Bestimmung der Isoform-KDs und deren Spezifität haben wir Western Blot-Analysen gegen panCD44 zur Darstellung einzelner sichtbarer CD44 Banden durchgeführt (Abb. 5). Die Zuordnung der Banden zu bestimmten CD44-Isoformen erfolgte im Abgleich mit dem in der Literatur beschriebenen Molekulargewicht der CD44-Isoformen (Azevedo et al., 2018).

Bei der Auswertung der einzelnen Proteinbanden konnten wir bei PaCa5061 klar zwischen den Isoformen 1, 2, 3 und 4 diskriminieren und die Signale getrennt voneinander quantifizieren. Daraus ergab sich, dass nur bei shCD44 (alle Banden), shCD44iso4 (unterste Bande; 85 kDa) und shCD44v9 (obere drei Banden; 130, 180 und 250 kDa) die Ziel-Banden spezifisch herabreguliert waren. Bei den anderen KD-Derivaten von PaCa5061 (shCD44iso1, shCD44iso2 und shCD44iso3) waren zusätzlich andere als die erwarteten Banden signifikant co-herabreguliert und zeigten somit keinen Isoform-spezifischen KDs (Abb. 5A-D).

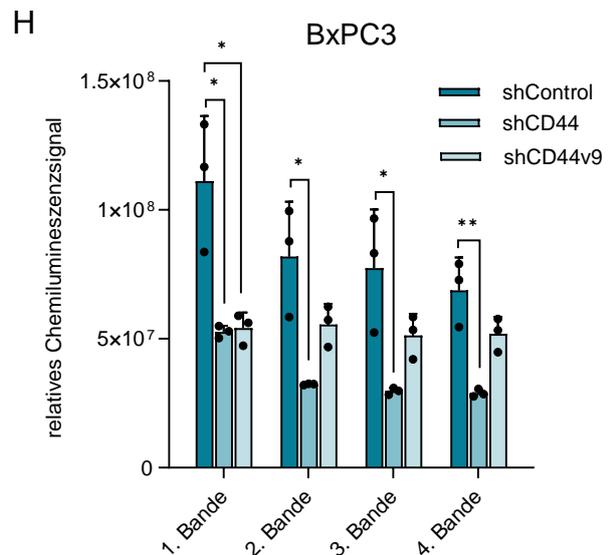
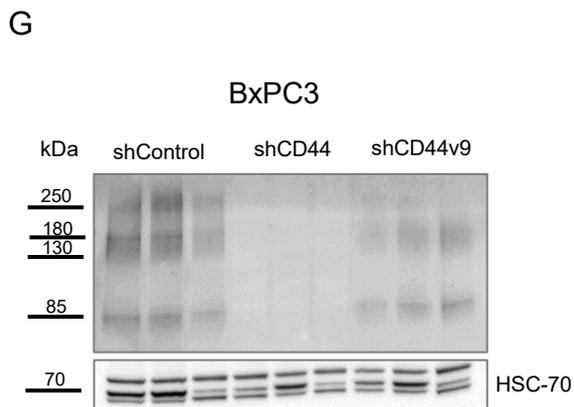
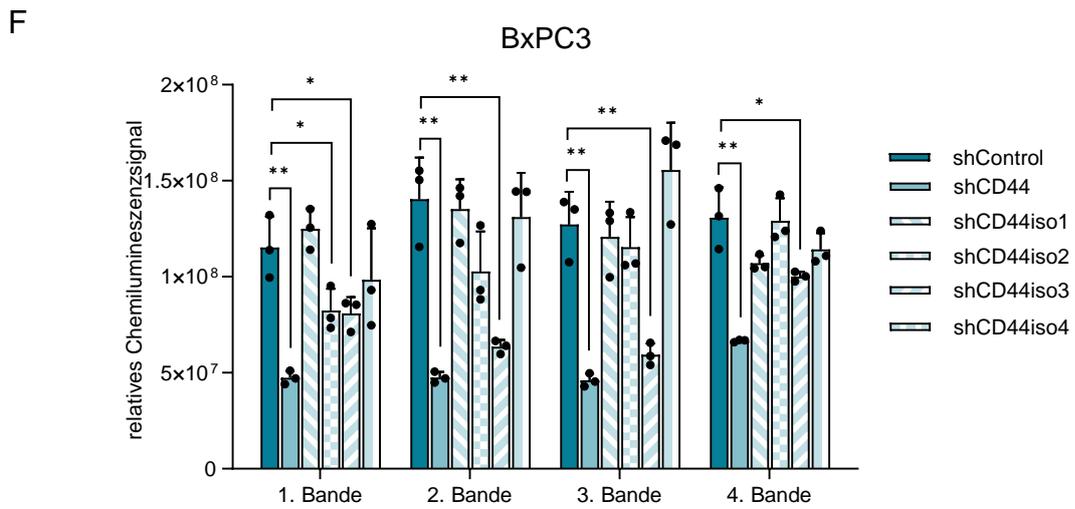
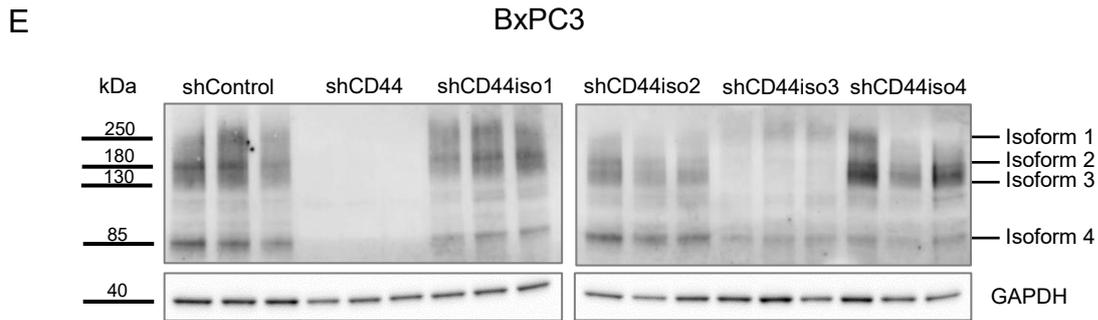
Bei BxPC3 waren die Proteinbanden nicht immer klar voneinander abzugrenzen (evtl. durch starke Glykosylierung von CD44), dennoch haben wir die Auswertung analog zu PaCa5061 durchgeführt. Bei der Quantifizierung zeigte sich, dass auch hier der shCD44-KD ein signifikant reduziertes Signal aller CD44-Banden aufwies. Für alle anderen BxPC3 KD-Derivate konnten wir hingegen kein Isoform-spezifisches Muster der Banden nachweisen (Abb. 5E-H): ähnlich wie bei PaCa5061 waren teilweise andere als die erwarteten Banden signifikant verändert oder sogar die „Zielbande“ überhaupt nicht herabreguliert.

In Anbetracht der Schwierigkeiten in der Darstellung/ Quantifizierung der CD44-Isoformen bei BxPC3 im Western Blot und den daraus resultierenden Ergebnissen bzgl. Signifikanz der Isoform-spezifischen KDs war fraglich, ob überhaupt weiter mit diesen Derivaten gearbeitet werden sollte. Beim CD44v9-KD hingegen waren trotz fehlender Signifikanz in der Auswertung (BxPC3) rein optisch die Banden der Isoformen 1-3 vielversprechend reduziert,

während die Isoform 4-Bande eher unverändert erschien. Daher entschieden wir uns dazu, von beiden Zelllinien zusätzlich zum shCD44-KD auch den shCD44v9-KD für weitere *in vitro*-Analysen zu verwenden. Alle anderen KD-Derivate beider Zelllinien haben wir verworfen.

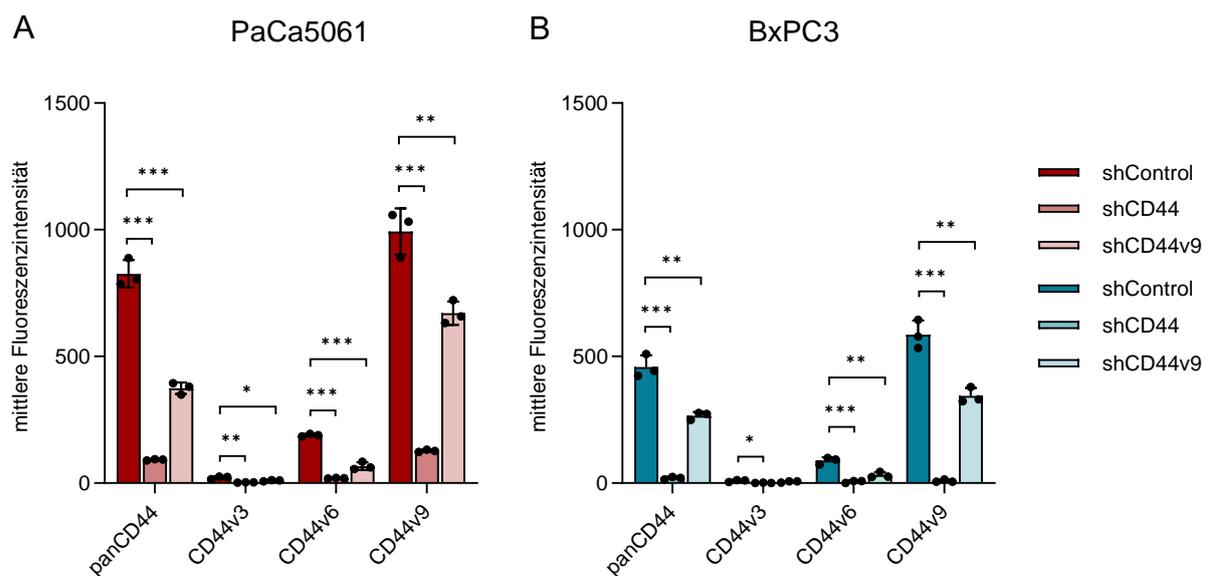


Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.



**Abbildung 5: Etablierung von CD44-Isoform-spezifischen KDs in (A-D) PaCa5061 und (E-H) BxPC3 im Western-Blot.** Um die Isoform-Spezifität nachzuweisen, wurden die Signale der Proteinbanden (Antikörper gegen panCD44) einzelnen CD44-Isoformen zugeordnet und getrennt voneinander quantifiziert.

Als weitere Methode zum Nachweis der KD-Effizienzen von shCD44 (alle CD44-Isoformen) bzw. shCD44v9 (Isoformen 1-3) in PaCa5061 und BxPC3 haben wir zusätzliche Analysen zur Detektion von panCD44 und der CD44-Variantenexons in der Durchflusszytometrie hinzugezogen. Bei PaCa5061 shCD44 ergaben sich signifikante Reduktionen der Fluoreszenzsignale mit Antikörpern gegen panCD44 um 89 %, CD44v3 um 86 %, CD44v6 um 90 % und CD44v9 um 87 %. Beim CD44v9-KD-Derivat von PaCa5061 waren die KD-Effizienzen jeweils etwas niedriger (panCD44: um 55 %, CD44v3: um 55 %, CD44v6: um 65 %, CD44v9: um 32 %) (Abb. 6A). Bei BxPC3 shCD44 waren die Fluoreszenzsignale um 96 % mit panCD44, um 92 % mit CD44v3, um 94 % mit CD44v6 und um 99 % mit CD44v9 reduziert. BxPC3 shCD44v9 zeigte KD-Effizienzen von 42 % bei panCD44 und CD44v9, 45 % bei CD44v3 und 65 % bei CD44v6. Allerdings zeigte der shCD44v9-KD von BxPC3 keine signifikante Herabregulation im Vergleich zur Kontrolle mit dem Antikörper gegen CD44v3 (Abb. 6B), wobei das Level insgesamt sehr niedrig war.



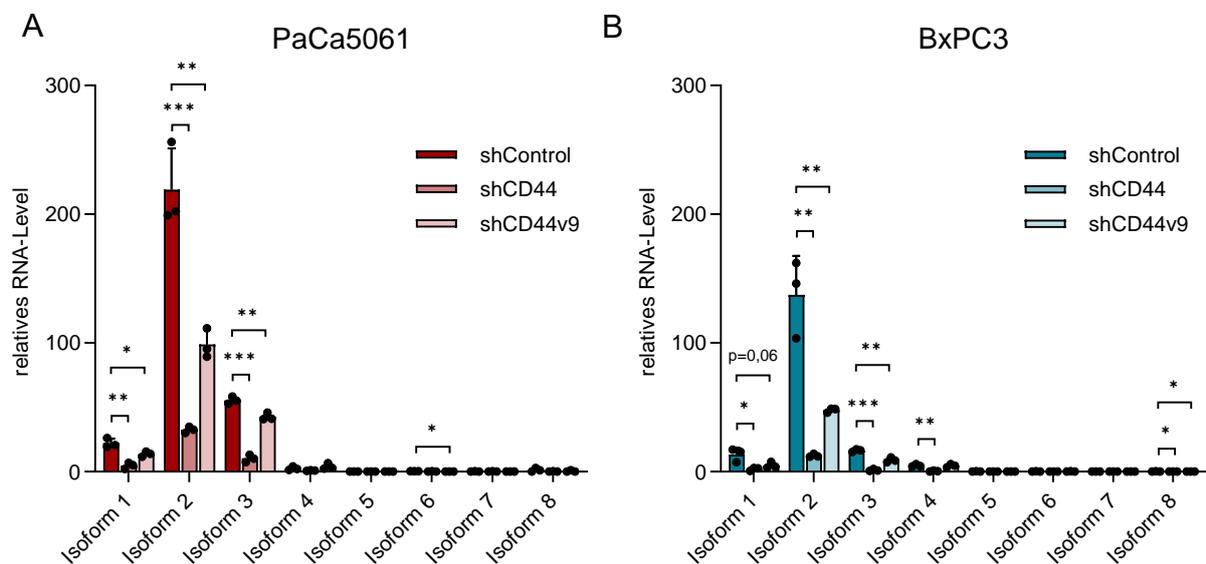
**Abbildung 6: Durchflusszytometrischer Nachweis von panCD44 und CD44-Exonvarianten (v3, v6, v9) in (A) PaCa5061 shCD44 und shCD44v9 und (B) BxPC3 shCD44 und shCD44v9. Die Messungen erfolgten in drei unabhängigen Replikaten.**

### 3.3 Identifizierung von CD44-Isoformen mittels RNA-Sequenzierung

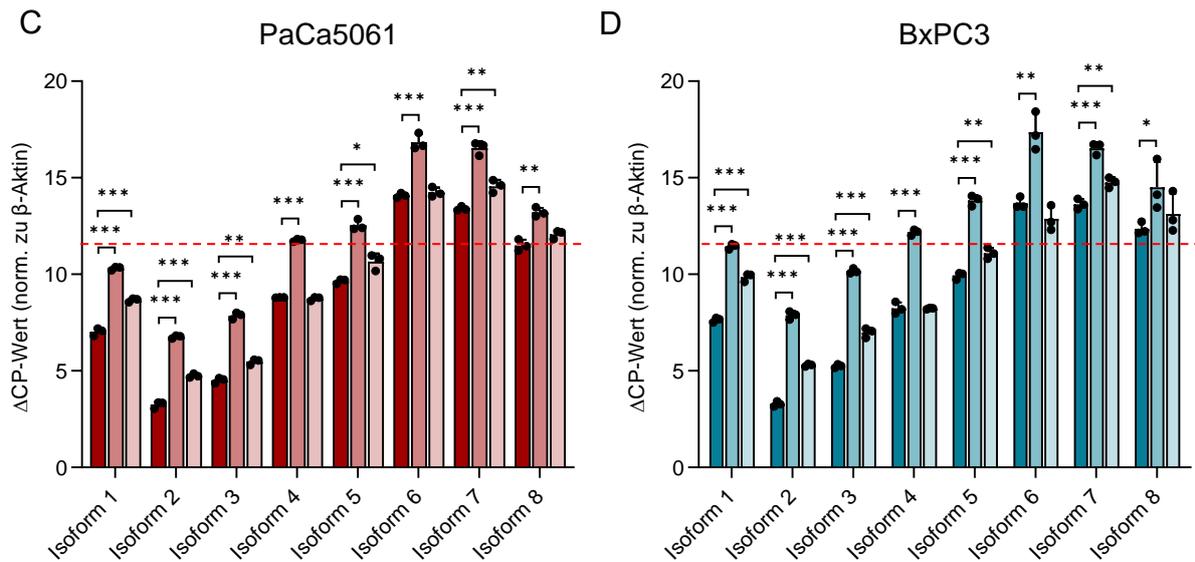
Zur Zuordnung der exprimierten CD44-Isoformen bei PaCa5061 und BxPC3 auf Transkriptomebene, ließen wir eine *Paired-end* RNA-Sequenzierung durchführen. Sie zeigte, dass bei PaCa5061 und BxPC3 die prädominante CD44-Isoform die Isoform 2 ist, gefolgt von Isoform 3, 1 und 4. Die Isoformen 5-8 konnten wir nur auf basalem Level identifizieren

(Abb. 7A+B). Ferner zeigte sich eine Reduktion der Isoformen 1-3 (PaCa5061) und 1-4 (BxPC3) durch das shCD44-Konstrukt, während das shCD44v9-Konstrukt bei beiden Zelllinien Isoformen 1-3, aber nicht Isoform 4 reduzierte. Statistisch signifikante Effekte auf die Expression von Isoform 6 durch das shCD44v9-Konstrukt (PaCa5061) und auf die Expression von Isoform 8 durch beide Konstrukte (BxPC3) wurden nahe der Nachweisgrenze dieser Isoformen festgestellt, so dass dem keine biologische Bedeutung beigemessen wurde.

Zur Validierung der Sequenzierung konnten wir die selbst etablierte Isoform-spezifische qRT-PCR durchführen (Abb. 7C+D). Die CP-Werte haben wir dabei auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin normalisiert. Je höher der CP-Wert, umso weniger Genexpression der einzelnen CD44-Isoform. Beide Zelllinien zeigten für alle Isoformen eine reduzierte Expression nach Transduktion mit dem shCD44-Konstrukt. Bei dem shCD44v9-Konstrukt hingegen gab es wie erwartet eine signifikante Reduktion der Isoformen 1-3 und keine Reduktion von Isoform 4 (beinhaltet kein v9). Die Isoformen 5-8 zeigen zwar unterschiedliche Ergebnisse für die KD-Effizienzen, allerdings befinden sich die CP-Werte in einem sehr niedrigen Expressionsbereich (nahe der Nachweisgrenze). Dennoch verhielten sich beide Zelllinien identisch: die Isoformen 5 und 7 wurden durch beide shRNA-Konstrukte verringert, während Isoformen 6 und 8 jeweils nur durch das shCD44-Konstrukt getargeted wurden. Dennoch haben wir zunächst die biologische Rolle dieser Effekte auf solche schwach exprimierten Targets in Frage gestellt.



Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

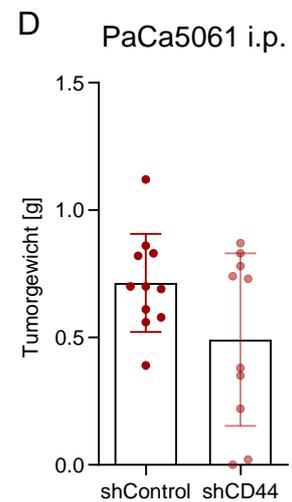
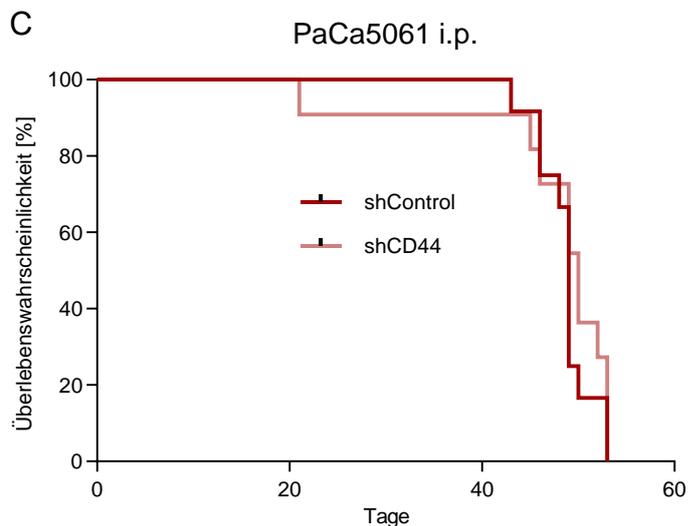
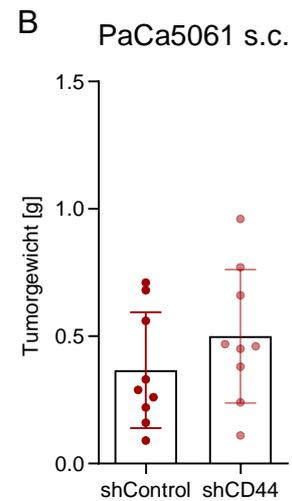
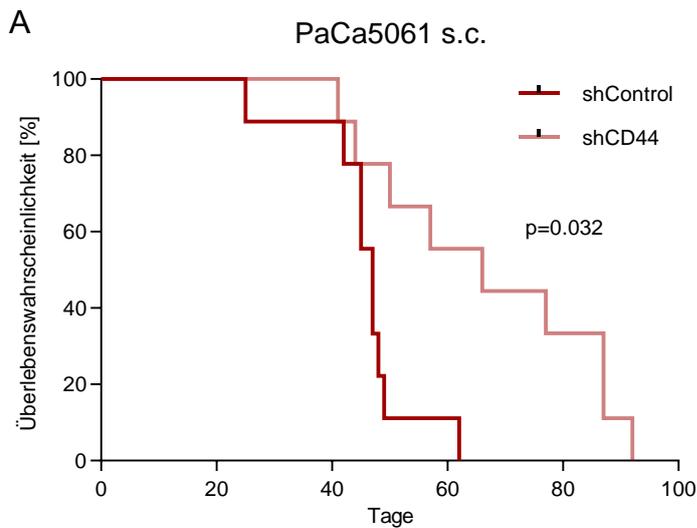


**Abbildung 7: Identifizierung der CD44-Isoformen mittels RNA-Sequenzierung (A+B) und Validierung über qRT-PCR (C+D).** (A) PaCa5061 und (B) BxPC3 shControl, shCD44 und shCD44v9 Zellen wurden hinsichtlich ihrer CD44-Isoformen-Expression über *Paired-end* RNA-Sequenzierung getestet. Die Ergebnisse wurden mit Isoform-spezifischen Primern in der qRT-PCR validiert (C+D). Die rote Linie zeigt einen CP-Wert von 30 abzgl. des CP-Werts von  $\beta$ -Aktin zur Darstellung der Nachweisgrenze. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD.

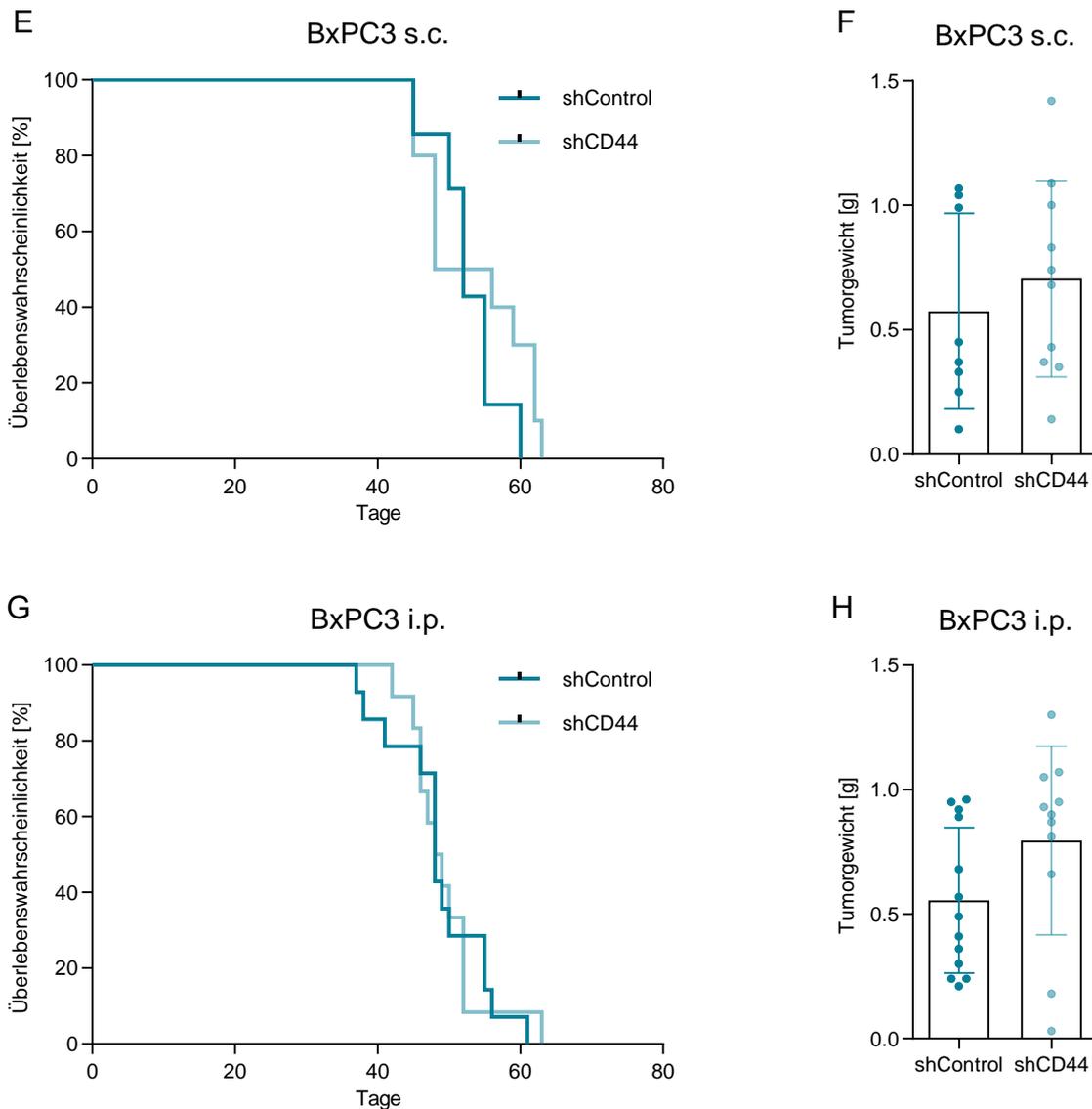
### 3.4 CD44-KD kann zu verringertem Tumorwachstum im Xenograft-Mausmodell führen

Die Bedeutung von CD44 für die Progression und Metastasierung vom Pankreaskarzinom im lebenden Organismus haben wir im Xenograft-Mausmodell näher untersucht. Um zunächst mögliche Effekte einer CD44-Depletion aller CD44-Isoformen auf das Tumorwachstum und verschiedene Wege der Metastasierung zu analysieren, haben wir shCD44-KD-Zellen bzw. deren Kontrollzellen (shControl) von PaCa5061 und BxPC3 sowohl subkutan als auch intraperitoneal in immundefiziente SCID-Mäuse injiziert (s.c.: n=9-10; i.p.: n=13-15). Die subkutan gewachsenen Tumorzellen konnten so den Weg der hämatogenen Metastasierung gehen, also über Anbindung an Blutgefäße an distante Orte gelangen, während intraperitoneal injizierte Tumorzellen sich entweder direkt oder ausgehend von an der Einstichstelle entstehenden Tumoren (Stichkanaltumoren) entlang des viszeralen oder parietalen Peritoneums ansiedeln und ausbreiten konnten (IP-Karzinose). Auf Tierversuche mit den Tumorzellderivaten mit CD44v9-spezifischem KD wurde zunächst nach dem 3R-Prinzip verzichtet. Zudem war der CD44v9-KD nicht so gravierend wie der panCD44-KD.

Auffällig war, dass die Mäuse in der PaCa5061 s.c. Gruppe mit shCD44-KD ein im Schnitt 21,2 Tage längeres Überleben zeigten als die Tiere der Kontrollgruppe ( $p=0,032$ ) (Abb.8A). In den anderen Gruppen zeigten sich keine Unterschiede im Überleben (Abb. 8C, 8E + 8G). Einzelne Mäuse mussten wir aufgrund von Lymphomen (tritt gelegentlich bei SCID-Mäusen auf) bei der Analyse ausschließen. Die Gewichte der s.c. Tumoren und auch der i.p.-gewachsenen Tumormassen waren bei der Autopsie bei beiden Zelllinien gleich zwischen shControl und shCD44 (Abb. 8B, 8D, 8F + 8H).



Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

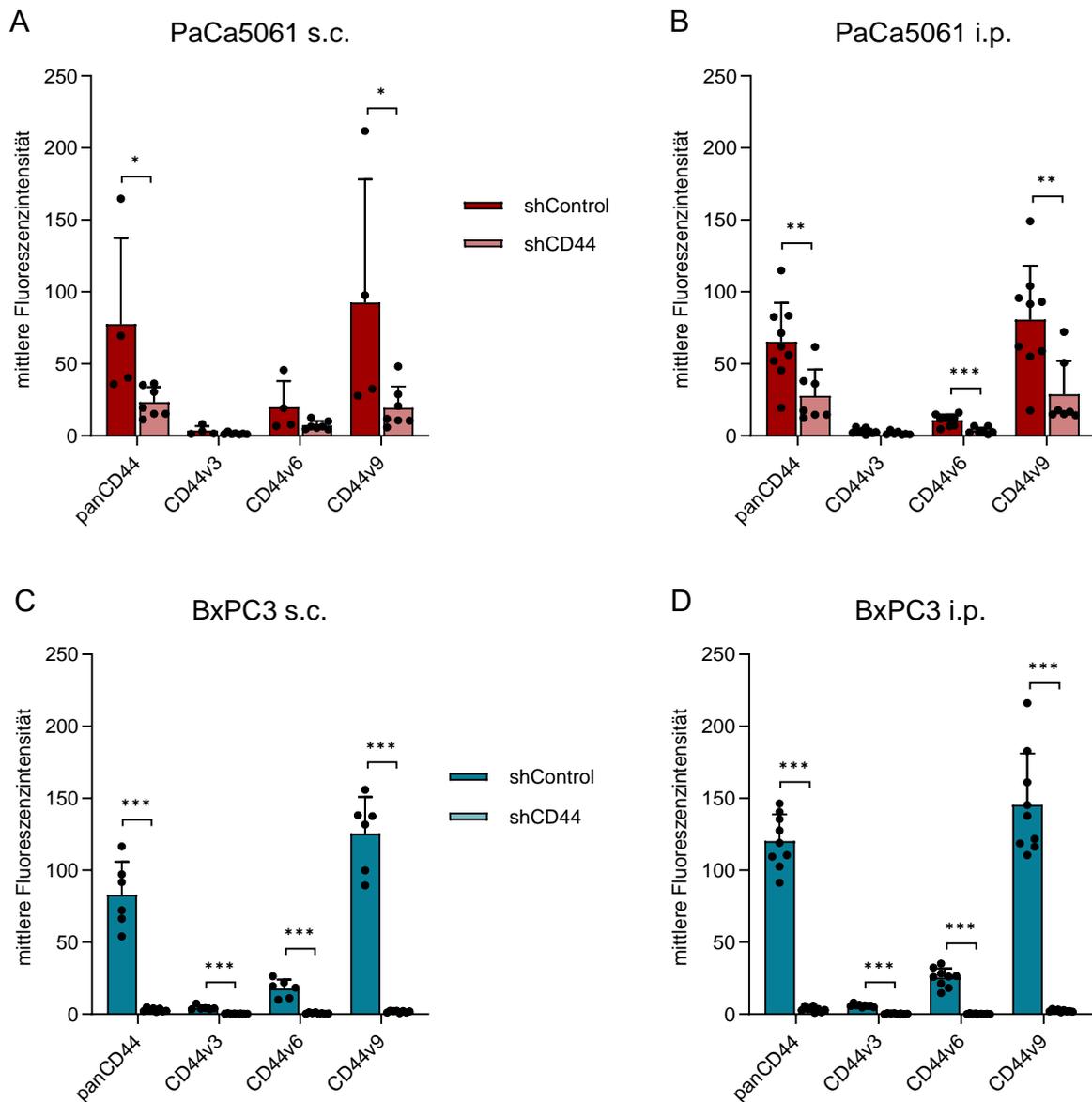


**Abbildung 8: Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Zeit nach Tumorzellinjektion sowie resultierende Tumorgewichte bei Autopsie (Xenograft-Mausmodell).** Kaplan-Meier-Kurven und Tumorgewichte nach (A+B) s.c. oder (C+D) i.p. Injektion von PaCa5061 shControl oder shCD44-KD Zellen in SCID-Mäuse. Identische Darstellung der Ergebnisse mit BxPC3 shControl oder shCD44-KD Zellen ((E+F) s.c.; (G+H) i.p.). Als Endpunkte galten das Erreichen eines Tumolvolumens von 1 cm<sup>3</sup> im s.c. Xenograftmodell und das Ausbilden von IP-Karzinose im i.p. Xenograftmodell. Abbruchkriterien waren Ulzera der Haut oberhalb der Tumorkläsionen, ein Gewichtsverlust von >20 % oder eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Weitere Abbruchkriterien im i.p. Xenograftmodell waren Stichkanaltumoren mit Volumina >0,5 cm<sup>3</sup> oder Aszitesbildung.

### 3.5 CD44-KD bleibt *in vivo* nur teilweise stabil

Nach dem Wachstum *in vivo* zeigten die Tumorzellen im Durchflusszytometer stabile CD44-KDs für panCD44 und CD44v9 bei PaCa5061 s.c., und zusätzlich für CD44v6 in der PaCa5061 i.p.-Gruppe (Abb. 9A+B). Demzufolge ist bei s.c. Wachstum von PaCa5061-Zellen der vor Injektion stabil nachweisbare KD von CD44v3 und CD44v6 verlorengegangen, während bei

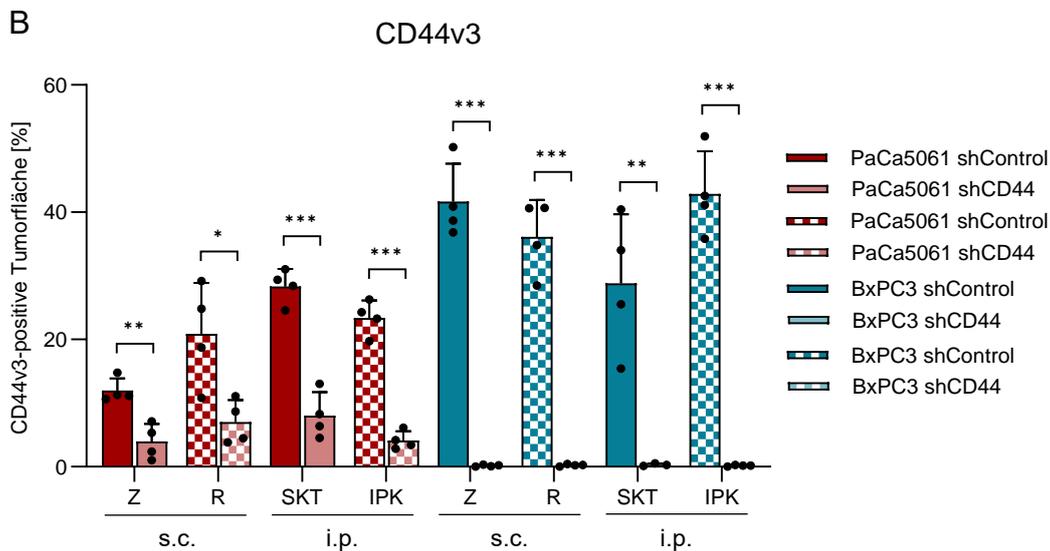
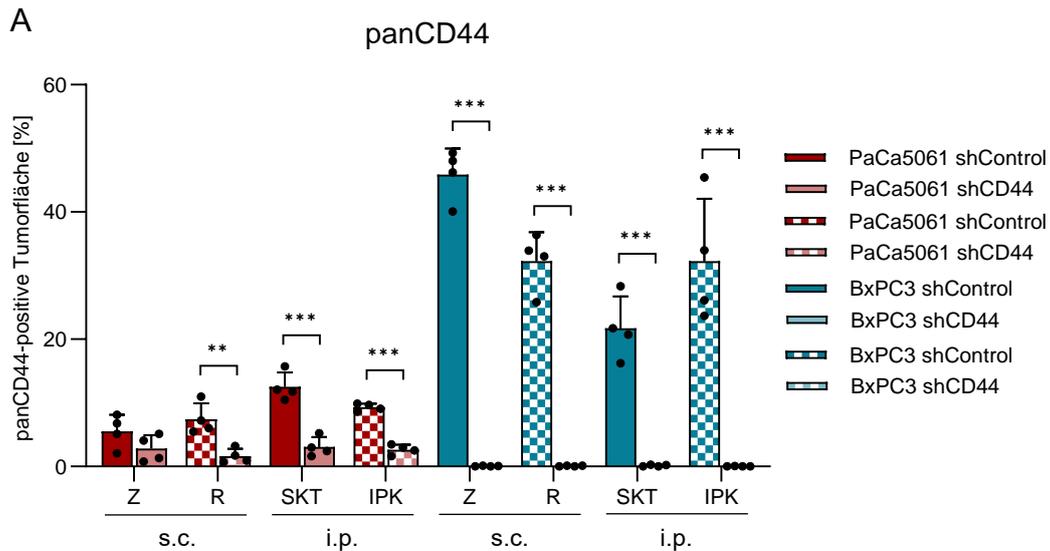
i.p. Wachstum nur der CD44v3 KD verlorengegangen ist. Für BxPC3 konnten wir in beiden Injektionsmodellen gegen panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9 durchflusszytometrisch einen stabilen CD44-KD nachweisen (Abb. 9C+D).



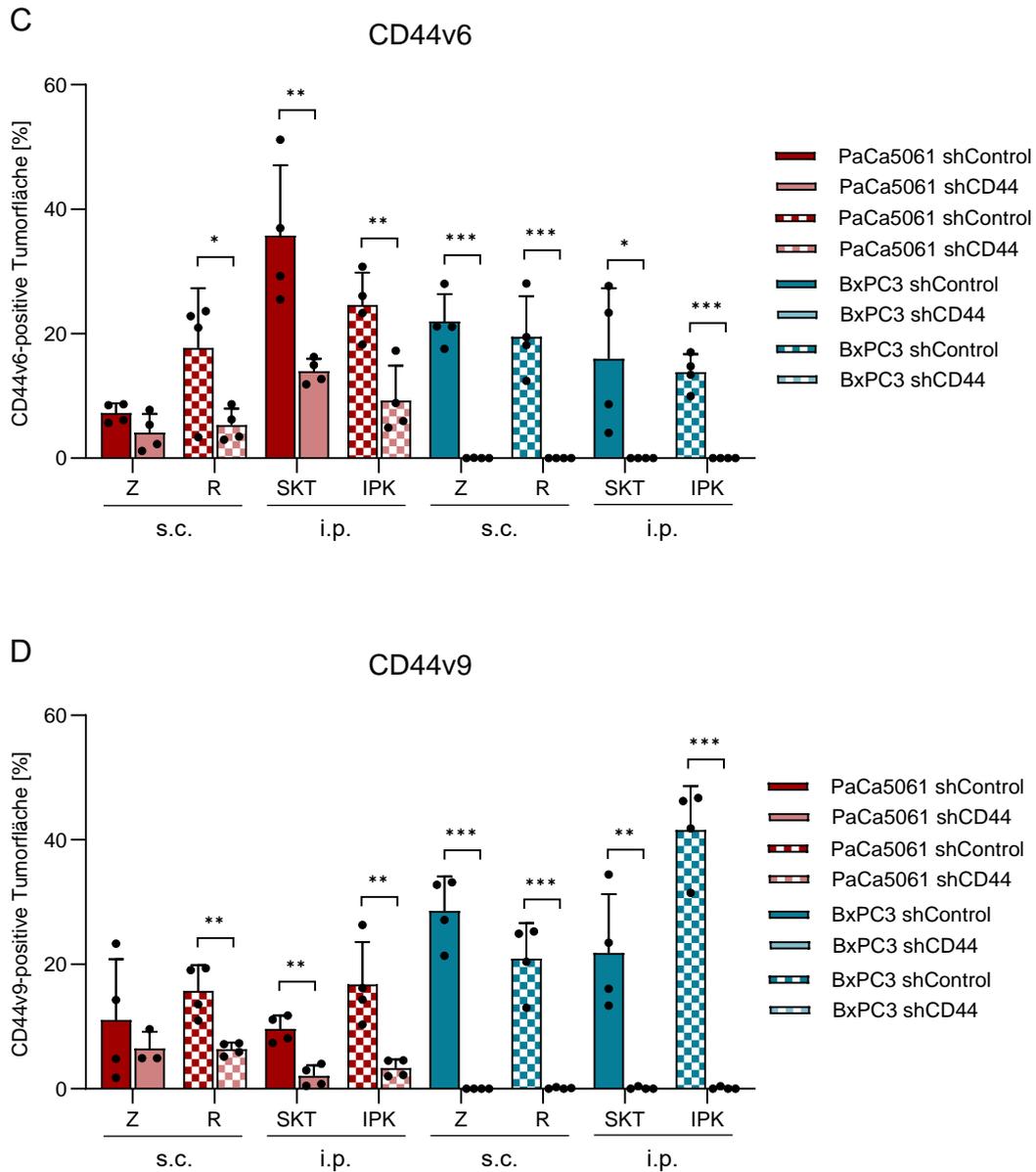
**Abbildung 9: Durchflusszytometrischer Nachweis des CD44-KDs der Xenografttumoren ex vivo.** (A+B) PaCa5061 shControl und shCD44 und (C+D) BxPC3 shControl und shCD44 Tumoren wurden nach s.c. bzw. i.p. Wachstum auf die Expression von panCD44 und CD44 Exonvarianten (v3, v6, v9) untersucht. Die Anzahl der getesteten Tumoren richtete sich nach der Anzahl der Tiere im Versuch und der TumorgroÙe.

Ein weiterer Nachweis des CD44-KDs bestand in der Auswertung immunhistochemischer Färbungen der Tumoren für panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9. Dazu haben wir die Tumorblickfelder aufgeteilt in Tumorzentrum (Z) und Tumorrand (R) bei den s.c. Tumoren bzw. in Stichkanaltumor (SKT) und IP-Karzinose (IPK) bei den i.p. Tumoren und diese getrennt

voneinander ausgewertet. Wir konnten beobachten, dass ausschließlich im Tumorzentrum der PaCa5061 s.c. Gruppe kein signifikanter CD44-KD mit Antikörpern gegen panCD44, CD44v6 und CD44v9 nachzuweisen war. Sowohl am Tumorrand s.c. gewachsener PaCa5061-Tumore als auch in SKT und IPK i.p.-gewachsener PaCa5061-Xenografts sowie in allen BxPC3-Xenografts konnten stabile KDs von panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9 nachgewiesen werden (Abb. 10A-D).

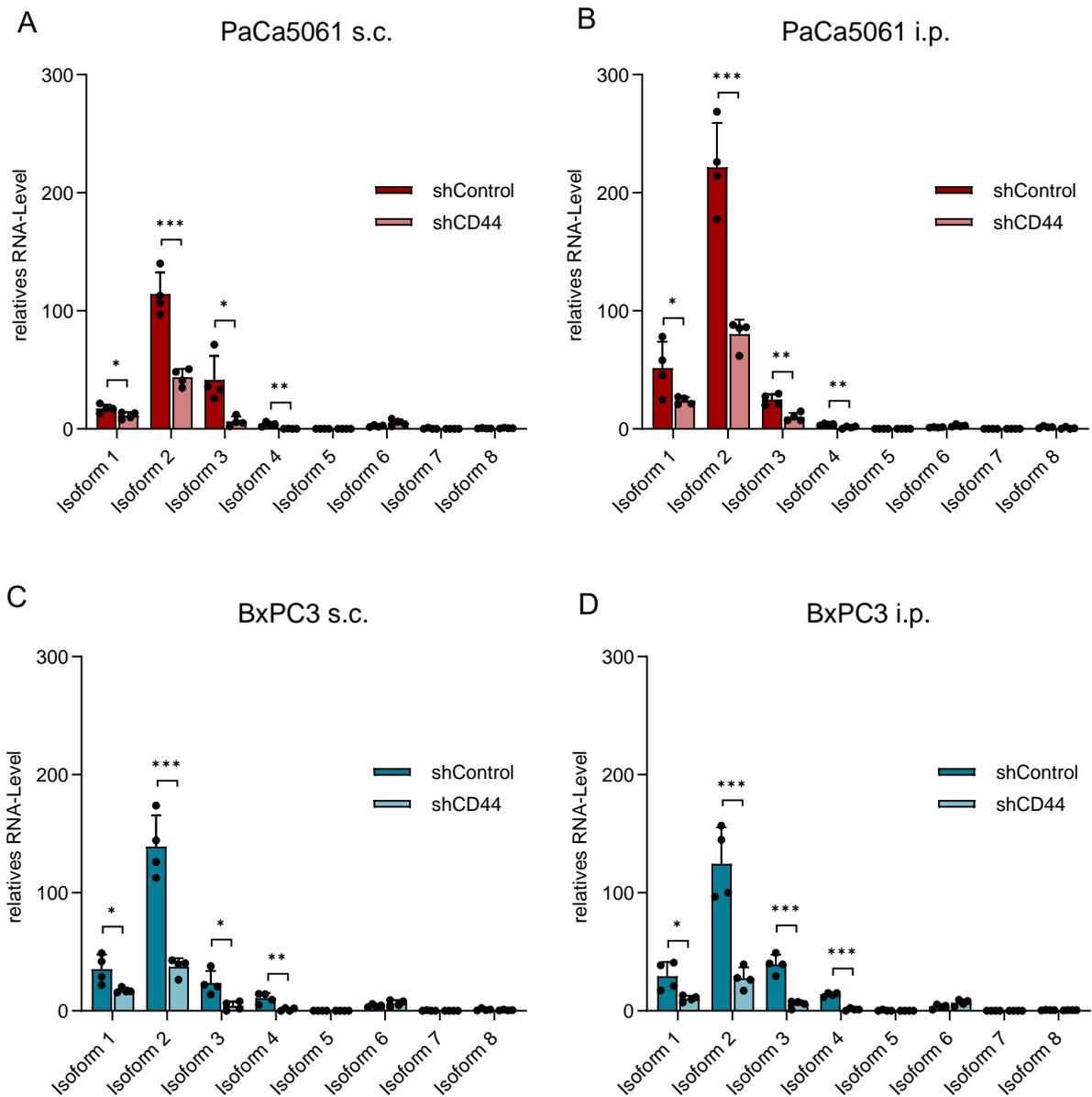


Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.



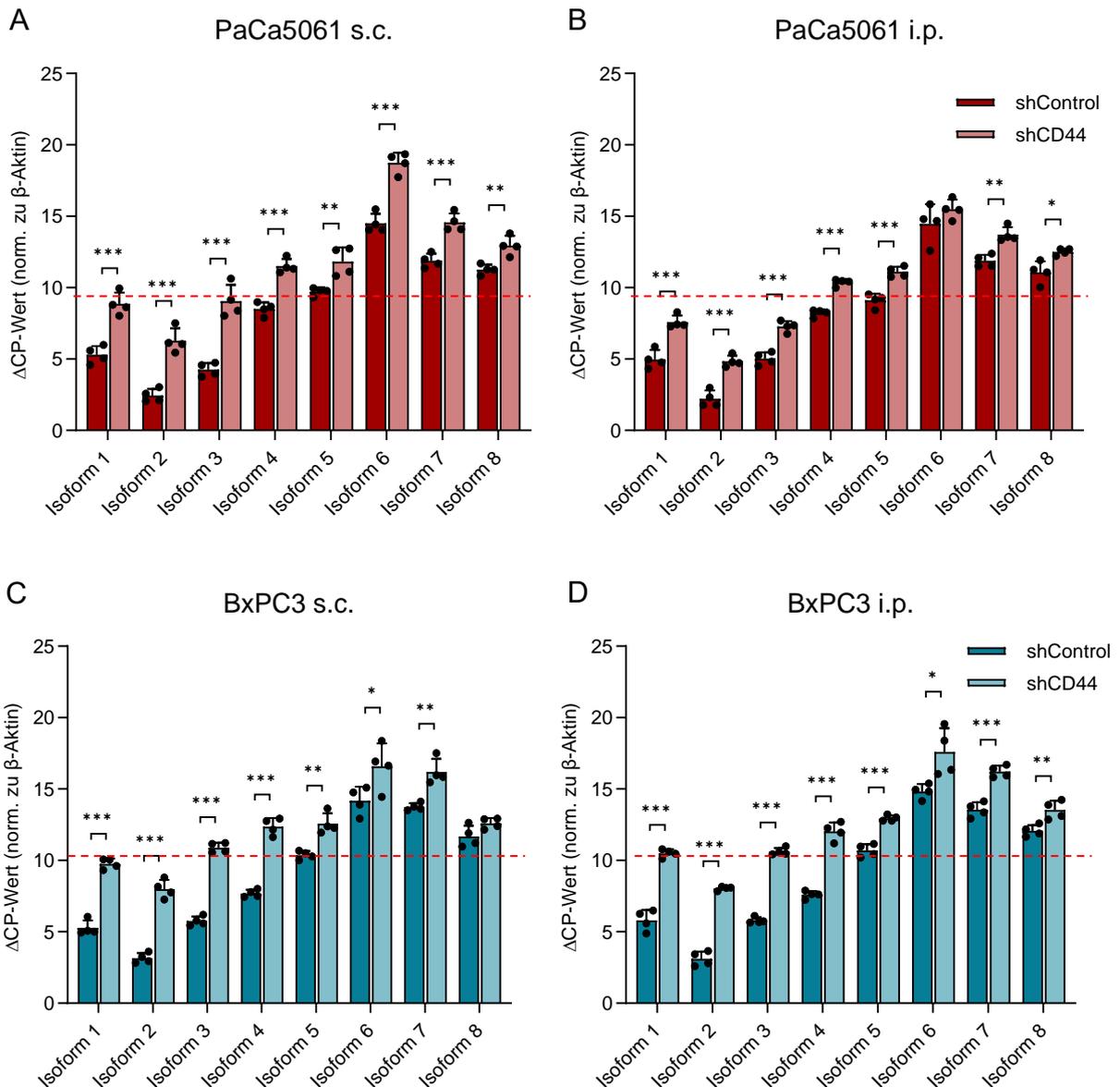
**Abbildung 10: Quantifizierung des CD44-KDs mittels immunhistochemischer Färbungen.** Xenografttumoren von PaCa5061 shControl und shCD44 sowie BxPC3 shControl und shCD44 aus dem s.c.-Modell und dem i.p.-Modell wurden mit Antikörpern gegen (A) panCD44, (B) CD44v3, (C) CD44v6 und (D) CD44v9 gefärbt und anschließend die mittlere gefärbte Tumorfläche pro Blickfeld quantifiziert. Beim s.c.-Modell wurde nach Bereichen aus dem Tumorzentrum (Z) und dem Tumorrand (R) unterschieden. Die Auswertung der Tumoren des i.p.-Modells erfolgte getrennt für Stichelkanaltumoren (SKT) und IP-Karzinosen (IPK).

Unsere *in vitro* Daten zur CD44-Isoform-Identifizierung hatten uns schon gezeigt, dass die Methoden auf RNA-Ebene die Methoden auf Proteinebene sinnvoll ergänzen können, da diese häufig durch die Sensitivität der Antikörper begrenzt sind. Deshalb haben wir auch RNA der Xenografttumoren sequenzieren lassen, und konnten so für alle vier Versuchsgruppen für die Isoformen 1-4 signifikant niedrigere RNA-Level in den CD44-KDs nachweisen (Abb. 11A-D).



**Abbildung 11: CD44-Isoform Identifizierung durch RNA-Sequenzierung der Xenografttumoren.** S.c. gewachsene shControl und shCD44 Tumoren und IP-Karzinosen von **(A+B)** PaCa5061 und **(C+D)** BxPC3 wurden auf die Expression der CD44-Isoformen hin analysiert.

Auch in der qRT-PCR mit CD44-Isoform-spezifischen Primern konnten wir *ex vivo* stabile CD44-KDs nachweisen. In beiden Injektionsmodellen und in beiden Zelllinien zeigten sich signifikante Reduktionen der CD44-Isoformen-Expression auf RNA-Ebene von *in vivo*-gewachsenen Primärtumoren bzw. IP-Karzinosen (Abb. 12A-D). Ausgenommen davon waren Isoform 6 bei PaCa5061 i.p. und Isoform 8 bei BxPC3 s.c., deren Expressionsniveau mit einem CP-Wert von jeweils >30 im Bereich der Nachweisgrenze lag.

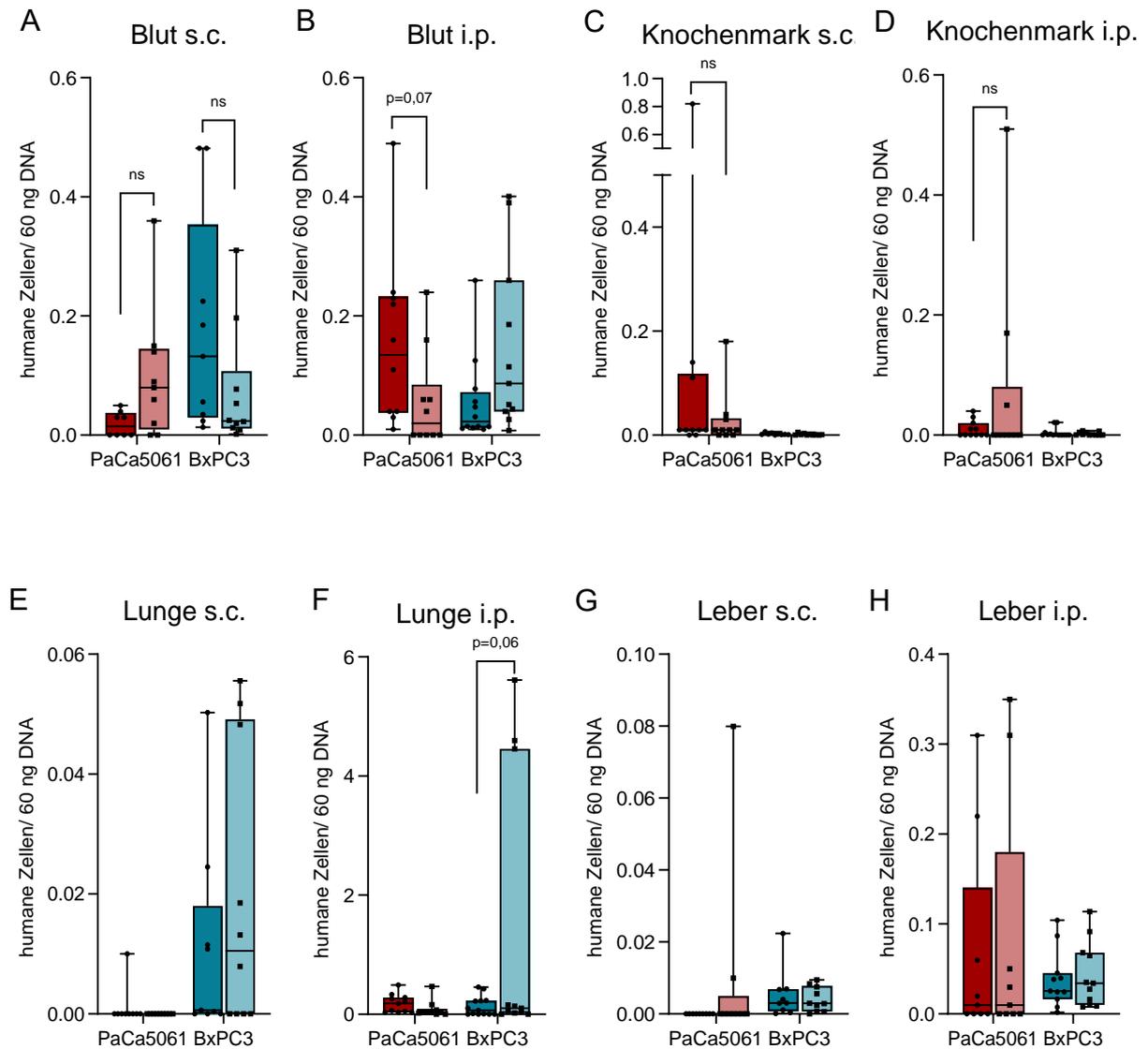


**Abbildung 12: Nachweis der CD44-Isoformen-Expression der Xenografttumoren in der qRT-PCR.** (A+B) PaCa5061 shControl und shCD44 und (C+D) BxPC3 shControl und shCD44 Tumoren wurden beim s.c. und i.p.-Modell auf die Expression der CD44-Isoformen *ex vivo* getestet. Die rote Linie zeigt einen CP-Wert von 30 abzgl. des CP-Werts von  $\beta$ -Aktin zur Darstellung der Nachweisgrenze. Die Balken zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD.

### 3.6 Nachweis der Metastasierung im Xenograftmodell

Mittels *Alu*-PCR konnten wir für beide Zelllinien und beide Injektionsmodelle keine Unterschiede zwischen Kontrolle und CD44-KD in der humanen (metastatischen) Zelllast in vom Injektionsort entfernt liegenden Organen und Geweben feststellen. Sowohl für zirkulierende Tumorzellen im Blut, als auch für disseminierte Tumorzellen in Knochenmark, Lunge und Leber konnten wir insgesamt nur sehr geringfügig humane Zellen nachweisen (Abb. 13A-H), was auf eine generell niedrige Metastasierungsfähigkeit beider Zelllinien

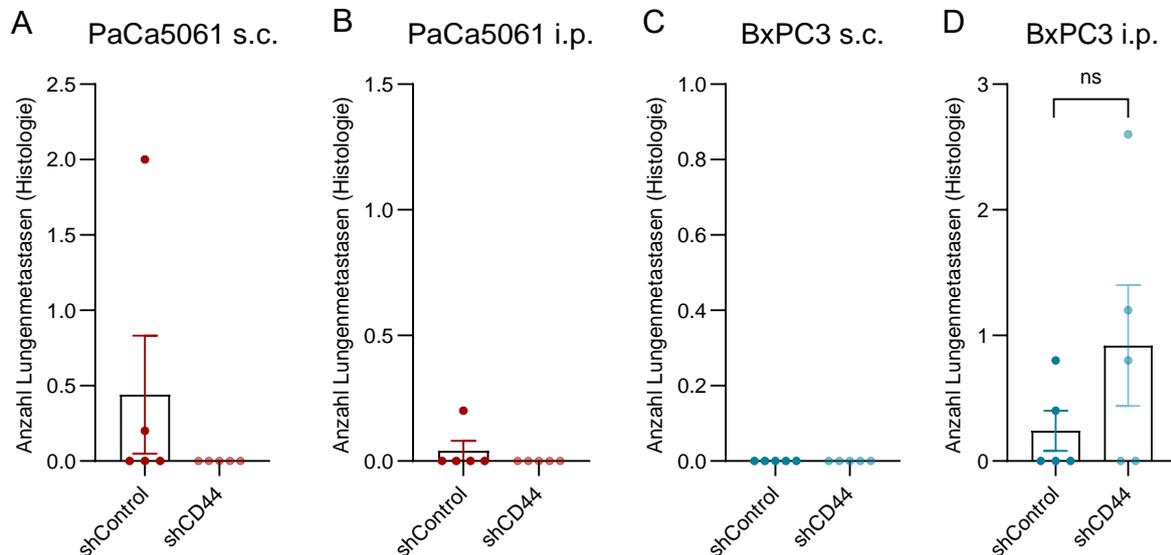
hindeuten könnte. Die vergleichsweise höchste Metastasenlast haben wir für die Lunge, und auch nur im shCD44-KD im i.p.-Modell von BxPC3 beobachtet (Abb. 13F).



**Abbildung 13: Detektion humaner DNA in (A+B) Blut, (C+D) Knochenmark, (E+F) Lunge und (G+H) Leber mittels *Alu*-PCR.** Die Proben jedes Versuchstiers wurden in technischen Triplikaten aufgetragen und anhand einer Standardreihe die Anzahl humaner Zellen pro 60 ng Gesamt-DNA errechnet.

Wir haben zusätzlich aus allen Tierversuchsgruppen jeweils fünf Lungen der Tiere mit den höchsten Werten in der *Alu*-PCR histologisch aufgearbeitet und anhand von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparaten mikroskopisch die Anzahl der Metastasen bestimmt. Hierbei wurden 5 Schnitte pro Versuchstier analysiert und anschließend die mittlere Metastasenzahl pro Schnitt berechnet. Bei PaCa5061 war kein Unterschied zwischen Kontrolle und CD44-KD sichtbar, weder nach s.c. noch nach i.p. Wachstum (Abb. 14A+B). Interessanterweise konnte

bei BxPC3, wie auch schon in der *Alu*-PCR, eine tendenzielle Zunahme an Lungenmetastasen im shCD44-KD beim i.p.-Modell festgestellt werden (Abb. 14D). Die s.c.-gewachsenen BxPC3 Zellen zeigte hier überhaupt keine Metastasierung in die Lunge (Abb.14C).

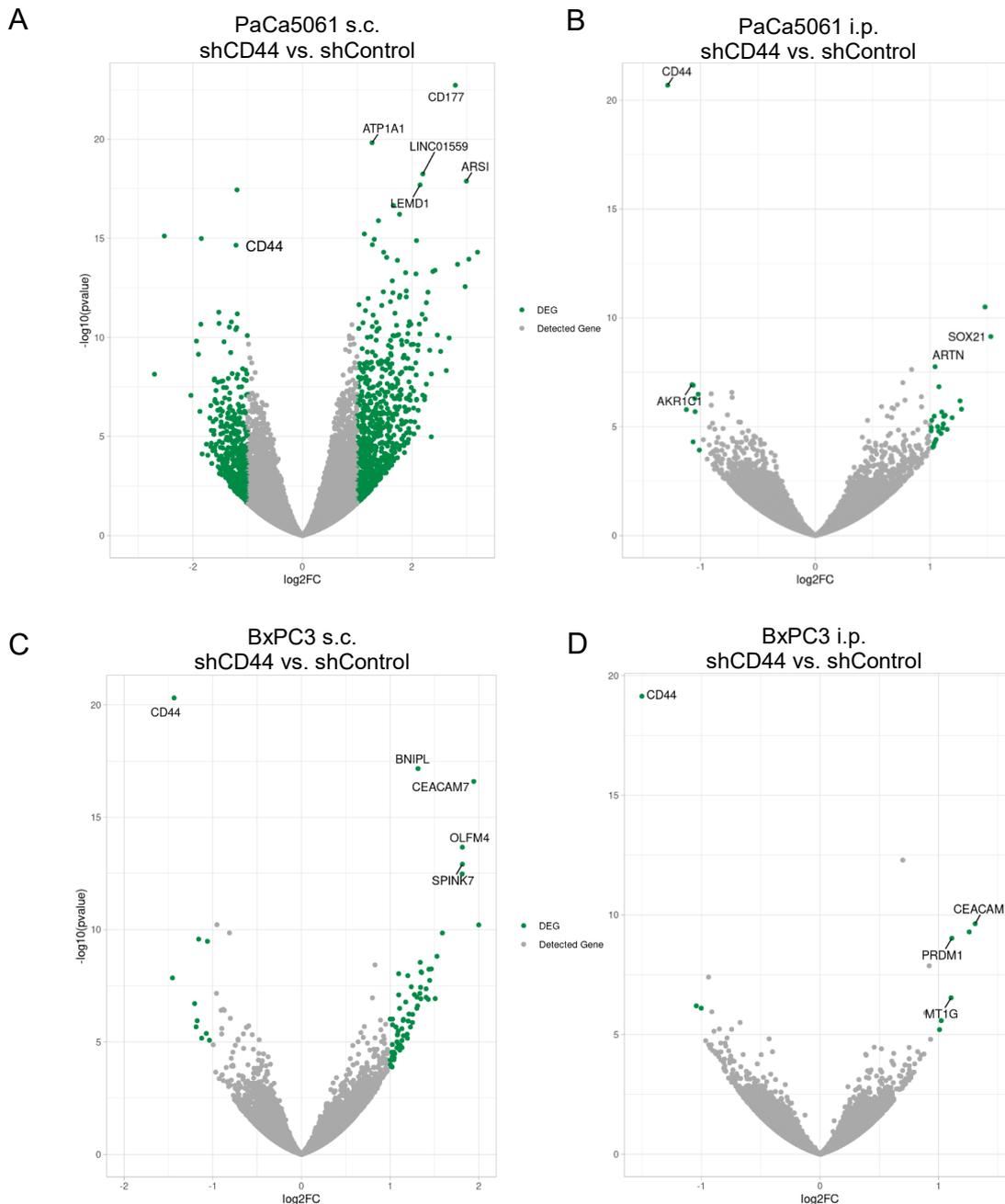


**Abbildung 14: Histologischer Nachweis von Lungenmetastasen in (A+B) PaCa5061 s.c. und i.p. und (C+D) BxPC3 s.c. und i.p..** Die Lungenschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch die Anzahl der Metastasen pro Lunge bestimmt.

### 3.7 CD44-KD führt bei PaCa5061 s.c. Xenografttumoren zu einer Anreicherung von extrazellulären Matrixkomponenten

In unseren Xenograftmodellen konnten wir beobachten, dass der CD44-KD ausschließlich bei PaCa5061 s.c. einen Überlebensvorteil brachte, da der Endpunkt einer Tumorgöße von 1 cm<sup>3</sup> oder eine Ulzeration der Haut über dem wachsenden Tumor später erreicht wurde. Um mögliche Erklärungsansätze für diese Beobachtung zu finden, haben wir uns die RNA-Sequenzierungsdaten der Xenografttumoren nicht nur für die einzelnen CD44-Isoformen, sondern für das gesamte Transkriptom angeschaut. Als Filter für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene (DEGs) wurden ein log<sub>2</sub>-fold change von  $\leq -1.0$  bzw.  $\geq +1.0$  sowie ein adjustierter p-Wert von  $\leq 0,05$  festgelegt. Unter diesen Bedingungen war nur bei PaCa5061 s.c. eine größere Anzahl von differentiell exprimierten Genen (DEGs) nachweisbar. Insgesamt waren es 1264 Gene, von denen 782 herauf-, und 482 herabreguliert waren im CD44-KD (Abb. 15A). Im Vergleich dazu waren es im PaCa5061 i.p.-Modell lediglich 35 DEGs (26 herauf-, 9 herabreguliert), bei BxPC3 s.c. 80 DEGs (70 herauf-, 10 herabreguliert) und bei BxPC3 i.p. nur noch 9 DEGs (6 herauf-, 3 herabreguliert) (Abb. 15B-D). Trotz der überwiegend geringen Anzahl and DEGs fiel in allen Modellen auf, dass CD44 signifikant im CD44-KD herabreguliert

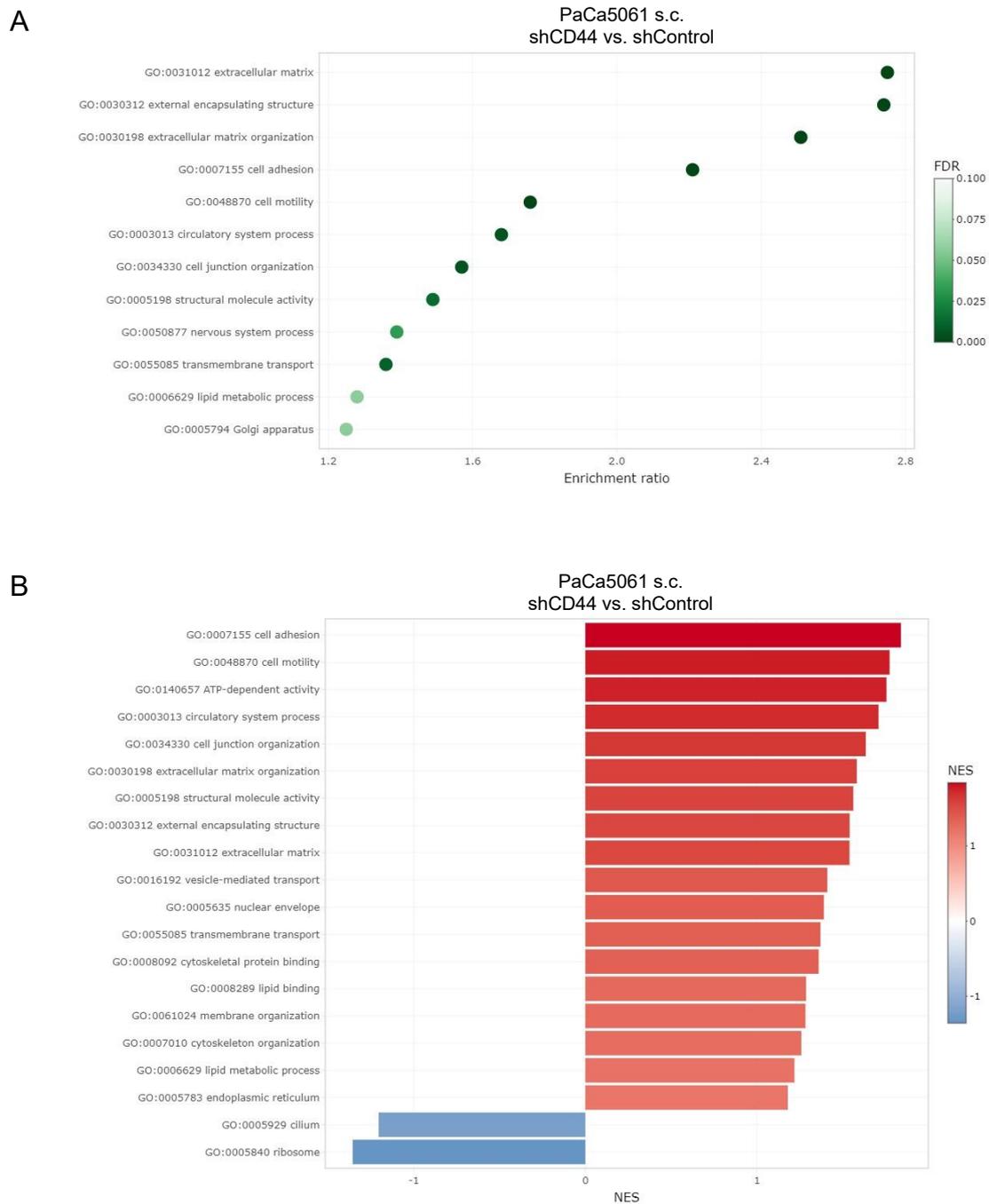
war (Abb. 15A-D). Ebenso fiel auf, dass in beiden Injektionsmodellen von BxPC3 das Zelladhäsionsmolekül CEACAM7 im CD44-KD hochreguliert war (Abb. 15 C+D).



**Abbildung 15: Differentielle Genexpression in den Xenografttumoren.** Subkutan gewachsene Primärtumoren oder IP-Karzinosen von (A+B) PaCa5061 und (C+D) BxPC3 shControl bzw. shCD44 wurden anhand von RNA-Sequenzierungsdaten auf regulierte Gene analysiert (n=4). Die Volcano-Plots zeigen z.T. einzeln benannte DEGs (grün) und detektierte, aber nicht differentiell exprimierte Gene (grau).

Bei Betrachtung der funktionellen Gencluster, die innerhalb der DEGs angereichert waren, zeigte sich im CD44-KD von PaCa5061 s.c., dass gemäß ORA (Over-representation analysis) zwei der drei am stärksten angereicherten Cluster die EZM und ihre Organisation betrafen

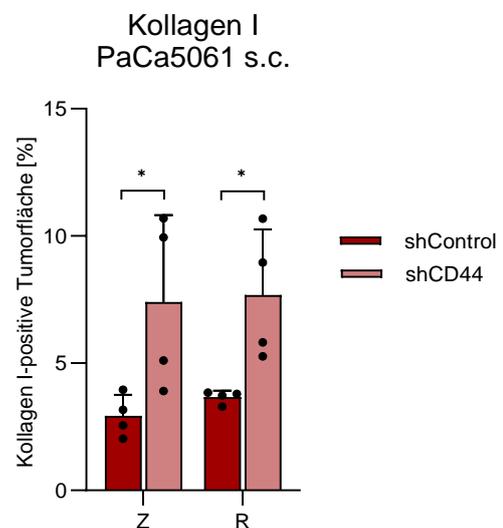
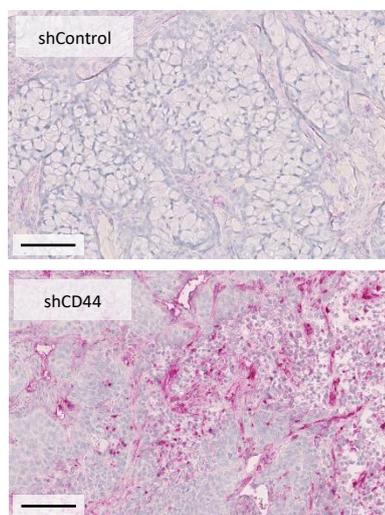
(Abb. 16A). Passend dazu waren auch Gene zur Zelladhäsion, Motilität, Organisation von Zelljunctionen sowie Aktivität von Strukturmolekülen im KD angereichert. In den Top 20 der GSEA (Gene set enrichment analysis) waren ebenfalls Gene der Zelladhäsion, Zellmotilität und Zelljunction, aber auch der EZM angereichert (Abb. 16B).



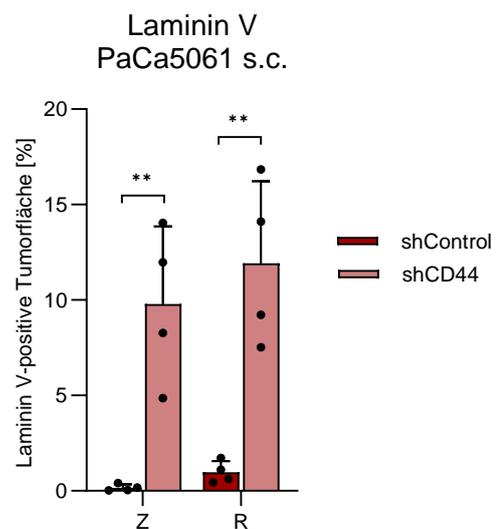
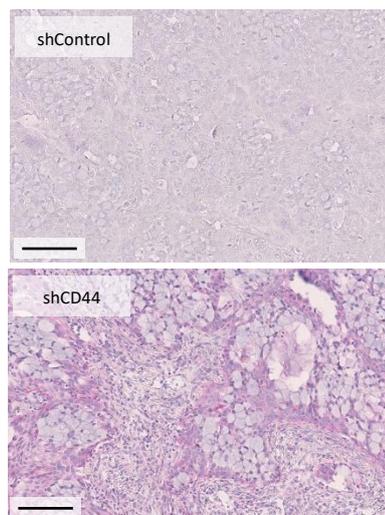
**Abbildung 16: Angereicherte Gencluster im CD44-KD von PaCa5061 s.c. shCD44 vs. shControl.** (A) Die ORA und (B) GSEA erfolgten anhand des Transkriptomdatensatzes der Xenografttumoren (n=4). Bei der ORA ergibt sich für die dargestellten Cluster ein Anreicherungsverhältnis (enrichment ratio) mit einer definierten FDR (false discovery rate, je niedriger, desto wahrscheinlicher besteht ein Unterschied des Clusters zwischen Kontrolle und CD44-KD). Die Ergebnisse der GSEA wurden als NES (normalized enrichment score, je höher, desto stärker ist ein Cluster angereichert) dargestellt.

Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob sich diese Anreicherung von EZM-Bestandteilen im CD44-KD auch auf Proteinebene bestätigen lässt. Färbungen von CD44-Liganden innerhalb der EZM wie Kollagen I, Laminin V, Fibronectin (jeweils mittels IHC) und auch Hyaluronsäure (indirekter Nachweis über biotinyliertes *hyaluronic acid binding protein*, HABP) (Abb. 17A-D) zeigten tatsächlich eine Zunahme von Matrixkomponenten in CD44-KD Tumoren, und zwar sowohl im Tumorzentrum als auch am Tumorrand (mit Ausnahme von Fibronectin und HABP am Tumorrand). Eine allgemeine Zunahme des Bindegewebsanteils nach CD44-KD konnte mittels Masson Goldner Färbung hingegen nicht bestätigt werden (Abb. 17E).

A

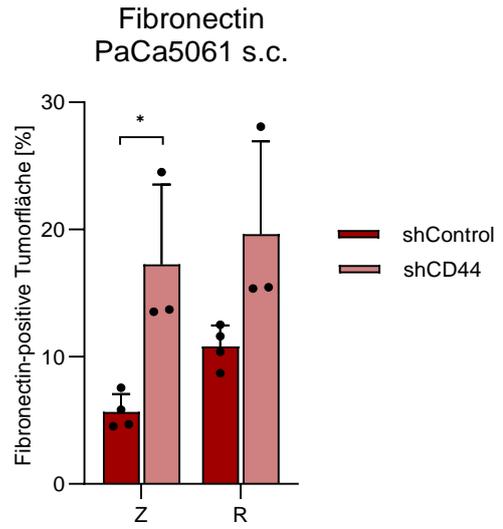
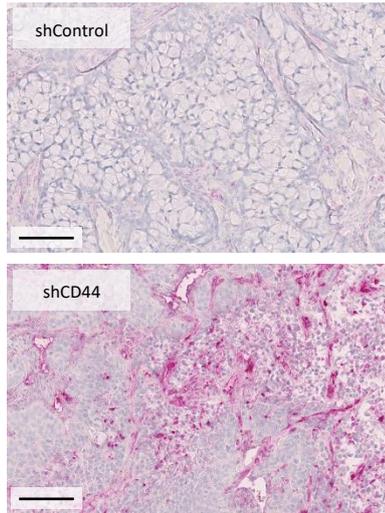


B

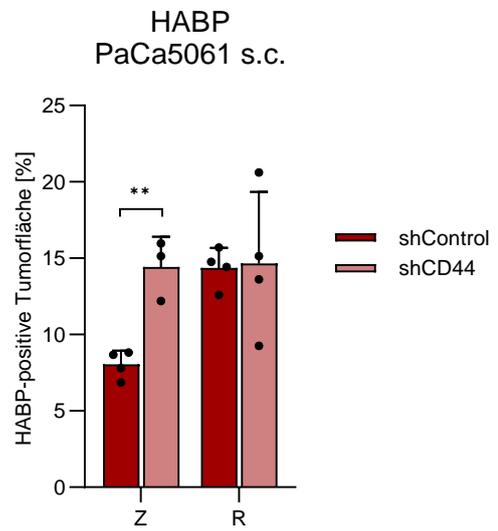
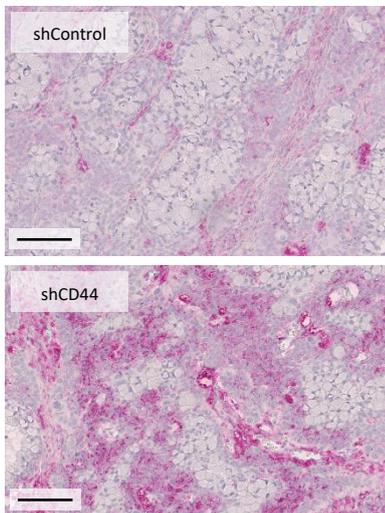


Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

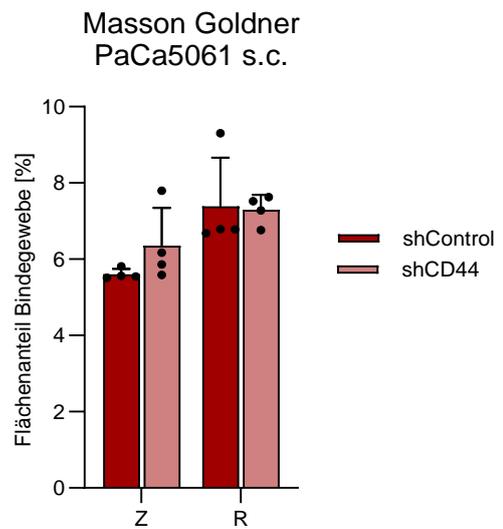
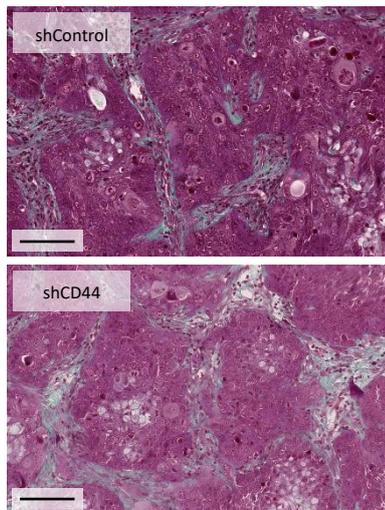
C



D



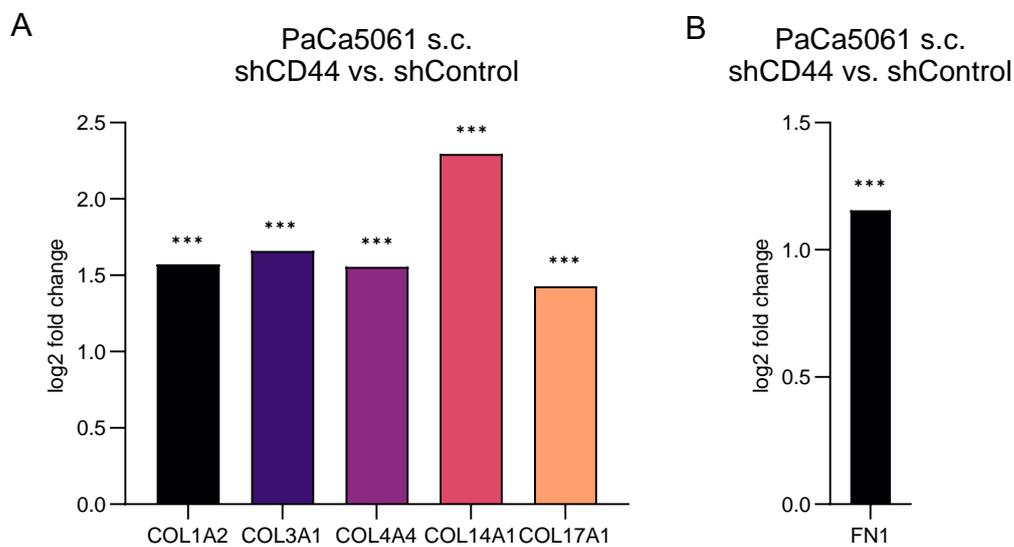
E



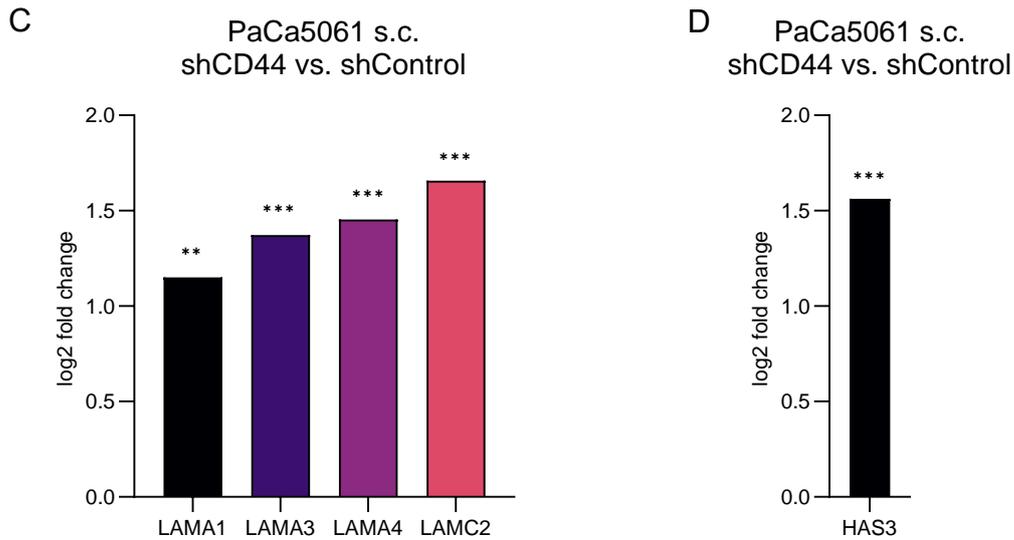
**Abbildung 17: Immunhistochemischer und histologischer Nachweis von EZM-Bestandteilen im PaCa5061 s.c. Xenograftmodell.** Xenografttumoren von PaCa5061 shControl und shCD44 wurden mit

Antikörpern gegen **(A)** Kollagen I, **(B)** Laminin V, **(C)** Fibronectin oder **(D)** mittels biotinyliertem HABP (Nachweis von Hyaluronsäure), bzw. histologisch nach **(E)** Masson Goldner gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts. Pro Tumorprobe wurden je nach Größe unterschiedlich viele Blickfelder analysiert (Kollagen I: 6 bis 24; Laminin V: 3 bis 26; Fibronectin: 9 bis 30; HABP: 10 bis 29; Masson Goldner: 4 bis 24) und hieraus anschl. ein Mittelwert für jede Tumorprobe gebildet. Dabei wurden das Tumorzentrum (Z) und der Tumorrund (R) getrennt betrachtet. Der Maßstab entspricht 100 µm. Die Fotos sind repräsentativ für die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

Anhand der Transkriptomanalyse der RNA-Sequenzierung von PaCa5061 s.c. konnten wir das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen nochmals validieren. Sowohl mehrere Kollagen- und Laminin-Subtypen, als auch Fibronectin und die Hyaluronansynthase *HAS3* waren signifikant hochreguliert in CD44-KD Xenografttumoren (Abb. 18A-D). Es gab keine Gene innerhalb der betrachteten Gengruppen, die herabreguliert waren. In den Transkriptomdatensätzen der anderen Xenograftmodelle (PaCa5061 i.p., BxPC3 s.c., BxPC3 i.p.) konnten wir keine Regulation der EZM-Komponenten finden, was angesichts der insgesamt sehr wenigen DEGs in diesen Modellen zu erwarten war. Hiervon ausgenommen war ein 1,5-facher Anstieg von COL5A2 im CD44-KD von BxPC3 s.c.



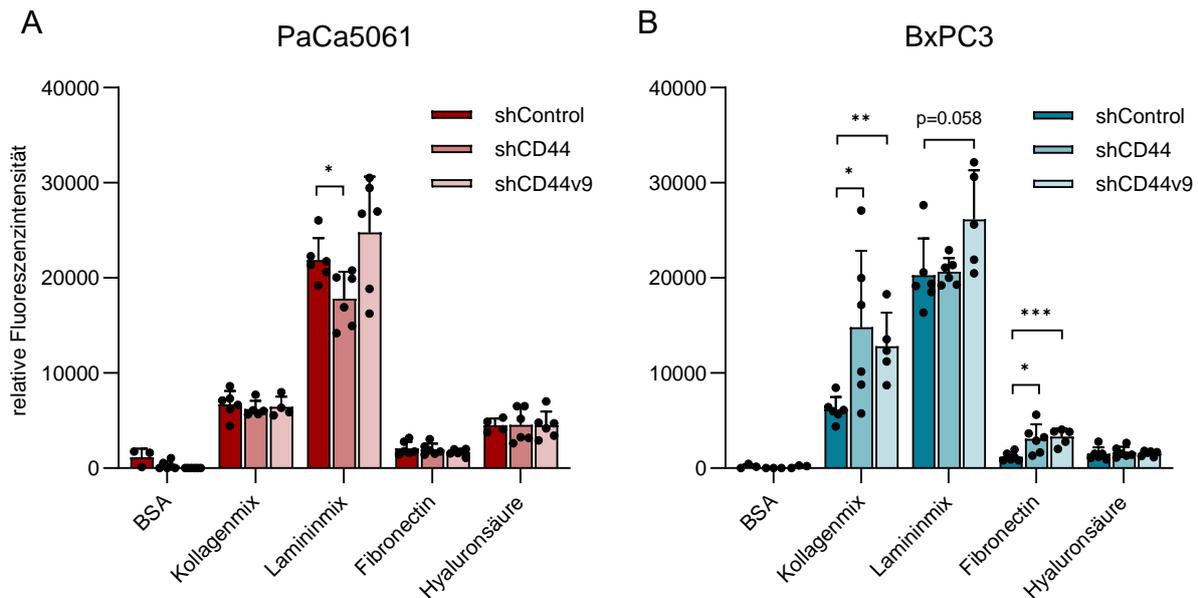
**Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.**



**Abbildung 18: Analyse der Genregulation von extrazellulären Matrixbestandteilen im Xenograftmodell.** Die RNA-Expressionsdaten von PaCa5061 s.c. shCD44 vs. shControl zeigten regulierte Gene für verschiedene **(A)** Kollagene, **(B)** Fibronectin, **(C)** verschiedene Laminine und **(D)** eine Hyaluronsäure-Synthase. Alle Änderungen wurde als log<sub>2</sub> fold change (ggü. shControl) dargestellt.

### 3.8 Einfluss von CD44 auf die Bindung von Tumorzellen an EZM-Komponenten *in vitro*

Nachdem wird nachweisen konnten, dass in den Tumoren des CD44-KDs mehr EZM-Proteine angereichert waren, kam die Frage nach der Bindungsfähigkeit der Tumorzelllinien an ebendiese auf. Wir haben hierfür, wie auch für alle weiteren *in vitro*-Analysen, perspektivisch den CD44v9-KD auch ohne vorangegangenen Tierversuch mitgetestet, um abschätzen zu können, ob im Vergleich mit dem pan-CD44 KD ein Tierversuch mit dem CD44v9-KD sinnvoll erscheint. Im statischen Adhäsionsassay mit immobilisierten EZM-Proteinen konnten wir beobachten, dass bei PaCa5061 nur der shCD44-KD weniger an Laminin bindet (Abb. 19A). Bei allen anderen EZM-Proteinen gab es keine Unterschiede im Bindungsverhalten und auch der shCD44v9-KD zeigte hier keinen Einfluss. BxPC3 hingegen konnte sowohl an Kollagen als auch an Fibronectin nach shCD44-KD und nach shCD44v9-KD signifikant besser binden (Abb. 19B). Entgegen unserer Erwartung zeigte sich bei beiden Zelllinien weder im pan-CD44-KD noch im CD44v9-KD eine Reduktion der statischen Tumorzelladhäsion an Hyaluronsäure, dem Hauptliganden von CD44.



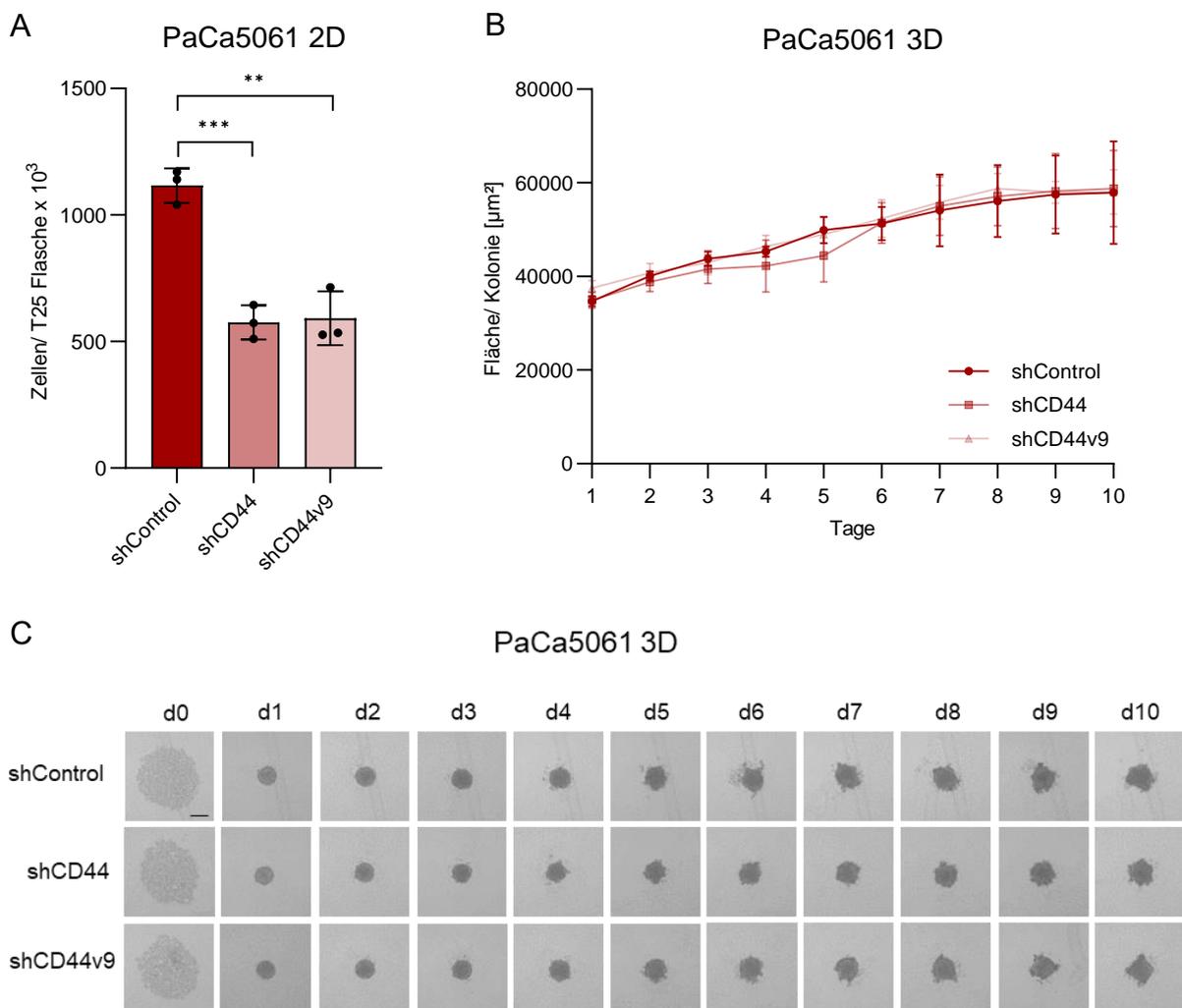
**Abbildung 19: Statischer Adhäsionsassay auf EZM-Komponenten.** Relative Fluoreszenzintensität als Maß für die Anzahl adhärenter **(A)** PaCa5061- und **(B)** BxPC3-Derivate (shControl, shCD44, shCD44v9) nach statischer Inkubation für 15 min auf BSA- (Negativkontrolle), Kollagenmix- (Kollagen I, Kollagen III und Kollagen IV), Lamininmix- (LN332, LN511, LN521), Fibronectin- oder Hyaluronsäure-beschichteten Platten (n=6).

Um im nächsten Schritt zu überprüfen, welchen Einfluss der panCD44-KD oder der *in vivo* beobachtete sekundäre Effekt auf den Umbau der extrazellulären Matrix auf Proliferation, Apoptose und Angiogenese in unseren Xenograftmodellen gespielt haben könnte, haben wir die Xenografttumoren *ex vivo* weiter analysiert. Zudem haben wir für die Parameter Proliferation, Viabilität und Apoptose die pan-CD44-KD-Zellen sowie perspektivisch auch die CD44v9-KD-Zellen *in vitro* untersucht.

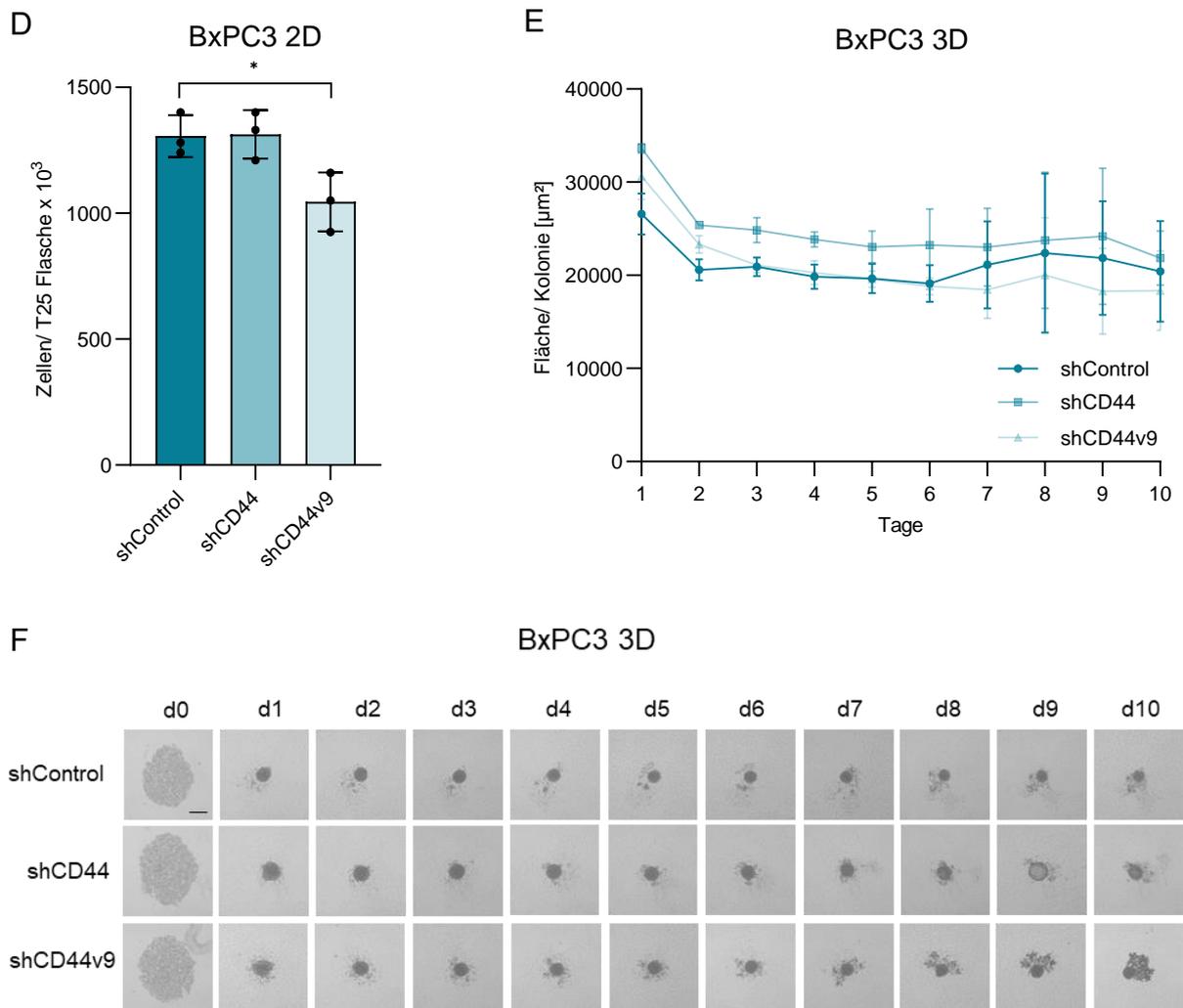
### 3.9 Zelllinien-spezifische Effekte der CD44-KDs auf die Tumorzell-Proliferation

Um zu untersuchen, weshalb es *in vivo* einen Überlebensvorteil der Mäuse mit CD44-KD (PaCa5061 s.c.) gegeben haben könnte, haben wir in mehreren *in vitro*-Assays die Eigenschaften der Tumorzellen bzgl. Wachstum und Überleben analysiert. Die Proliferation unter 2D-Wachstumsbedingungen war bei beiden KD-Derivaten (panCD44-KD bzw. CD44v9-KD) von PaCa5061 im Vergleich zur Kontrolle gehemmt (Abb. 20A). Bei der Messung der verankerungslosen 3D-Wachstumsfähigkeit zeigten die Tumorzellen nach 24 h eine Sphäroidbildung. PaCa5061 war grundsätzlich in der Lage in poly-HEMA-beschichteten Wells ohne Verankerung zu proliferieren, wobei es zwischen Kontroll- und KD-Zellen keinen Unterschied im Umfang der Sphäroide über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen gab (Abb. 20B+C).

Bei BxPC3 zeigte nur der CD44v9-KD unter 2D-Wachstumsbedingungen einen Wachstumsnachteil (Abb. 20D), während der CD44-KD keine verminderte Proliferation aufwies. In 3D-Kultur waren die Sphäroide aller Zellerivate von BxPC3 grundsätzlich nicht in der Lage zu wachsen (Abb. 20E+F). Wir konnten allerdings beobachten, dass sich einige der BxPC3 Sphäroide ohne zu proliferieren blasig aufgebläht haben, weshalb man ab Tag 7 eine leichte Zunahme des Sphäroidumfangs in Abbildung 20E erkennt, die ab Tag 9 wieder abnimmt. Auch in Abbildung 20F erkennt man an Tag 9 dieses Phänomen, das bereits an Tag 10 wieder rückläufig war. Außerdem war auffällig, dass vor allem bei BxPC3 sehr viele Zelltrümmer über die Zeit ins umgebende Medium abgegeben wurden.

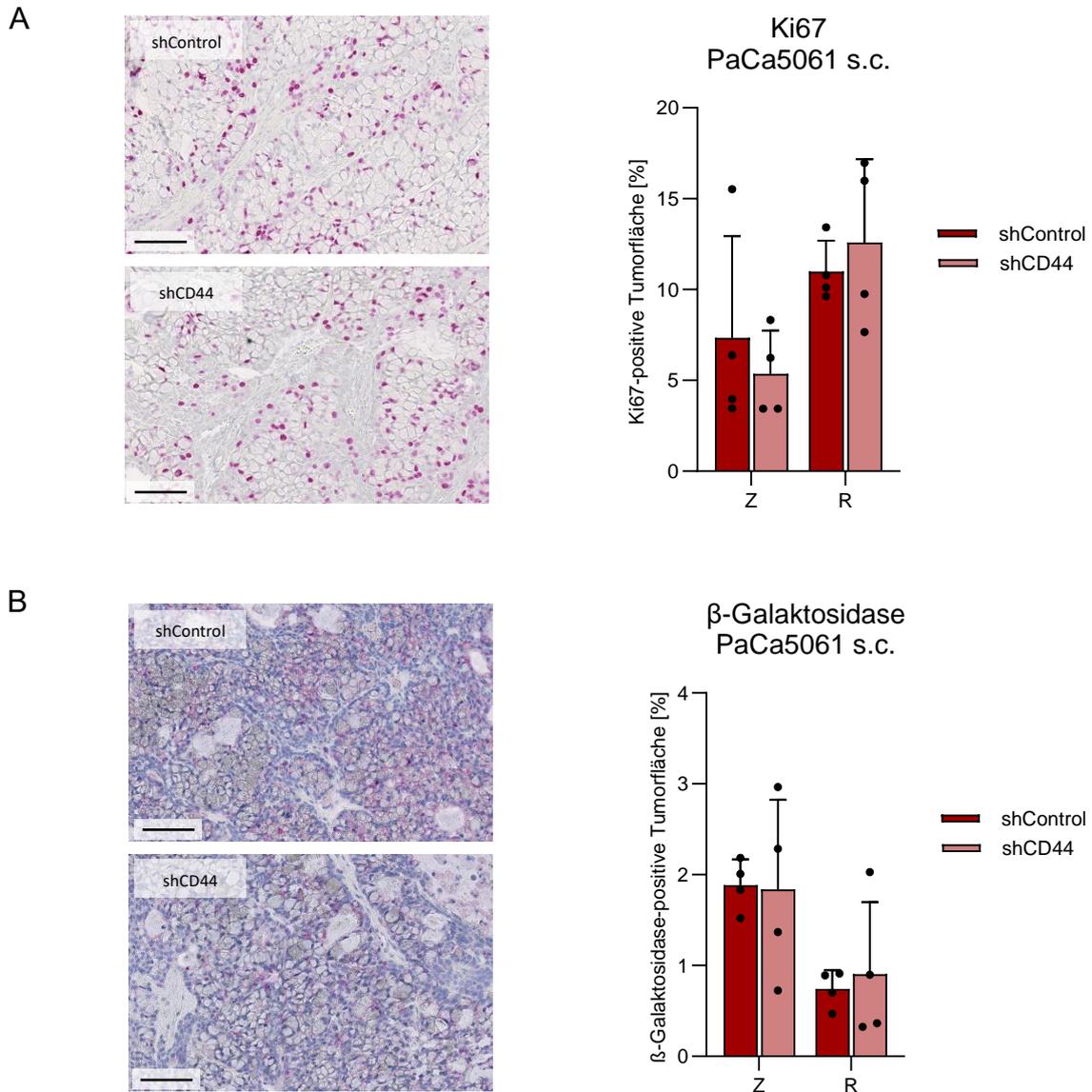


**Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.**



**Abbildung 20: Proliferation von Tumorzellen unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen (poly-HEMA).** Die Bestimmung der 2D-Proliferationsfähigkeit von (A) PaCa5061 erfolgte durch initiale Aussaat einer definierten Zellzahl, Wachstum über 4 Tage und anschl. Zellzählung. (B+C) Das 3D-Zellwachstum erfolgte unter mikroskopischer Dokumentation über 10 Tage. Hierbei wurde pro Kondition und Tag die mittlere Fläche aller abgrenzbaren Kolonien eines Well bestimmt (n=6). Für (D-F) BxPC3 galten jeweils dieselben Konditionen.

In den Xenografttumoren haben wir den Anteil proliferierender Tumorzellen zum Autopsie-Zeitpunkt mittels immunhistochemischem Nachweis von Ki67 gemessen. Im Gegensatz zu den Proliferationseffekten der CD44-KDs *in vitro*, konnten wir in den Xenografttumoren von PaCa5061 s.c. keinen Unterschied im Ki67-Level feststellen (Abb. 21A). Auch eine vermehrte Seneszenz, also das Einstellen der Zellteilung, konnten wir mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Galaktosidase nicht beobachten (Abb. 21B).

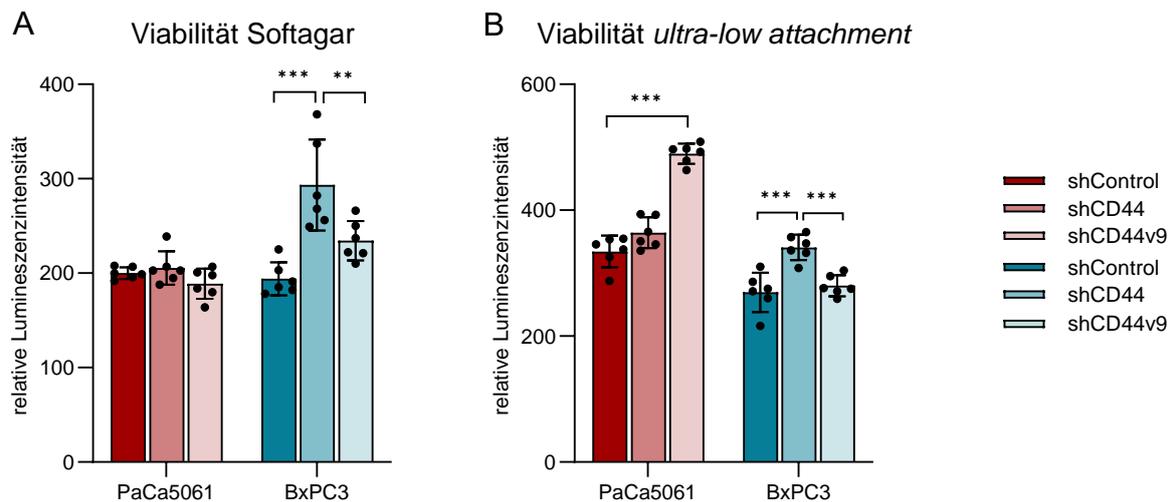


**Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von (A) Ki67 und (B)  $\beta$ -Galaktosidase in PaCa5061 s.c. Xenografttumoren.** Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts. Pro Tumorprobe wurden für beide Färbungen 8 bis 21 Blickfelder analysiert und hieraus anschl. ein Mittelwert für jede Tumorprobe gebildet. Dabei wurden das Tumorzentrum (Z) und der Tumorrand (R) getrennt betrachtet. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. Die Fotos sind repräsentativ für die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

### 3.10 Viabilität von 3D-kultivierten Tumor-Sphäroiden

Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit von 3D-kultivierten Tumorzellen haben wir zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt: 1) mit semi-solider Umgebung im Softagar-Modell, um die 3D-Wachstumssituation von s.c. Tumoren ansatzweise zu simulieren, oder 2) schwimmend in *ultra-low attachment*-Mikrowell-Platten, ähnlich zu Tumorzellen, die sich in i.p.-Flüssigkeit befinden.

Auf diese Weise erzeugte PaCa5061-Sphäroide zeigten im Softagar keinen Unterschied zwischen Kontroll- und KD-Zellen im Hinblick auf die Viabilität (Abb. 22A). In den *ultra-low attachment*-Mikrowell-Platten hingegen waren die shCD44v9-KD-Zellen besser lebensfähig als shControl- und shCD44-Zellen (Abb. 22B). Bei BxPC3 konnten wir in beiden Versuchsansätzen einen Vorteil im shCD44-KD gegenüber den Kontrollzellen und dem shCD44v9-KD feststellen (Abb. 22A+B).

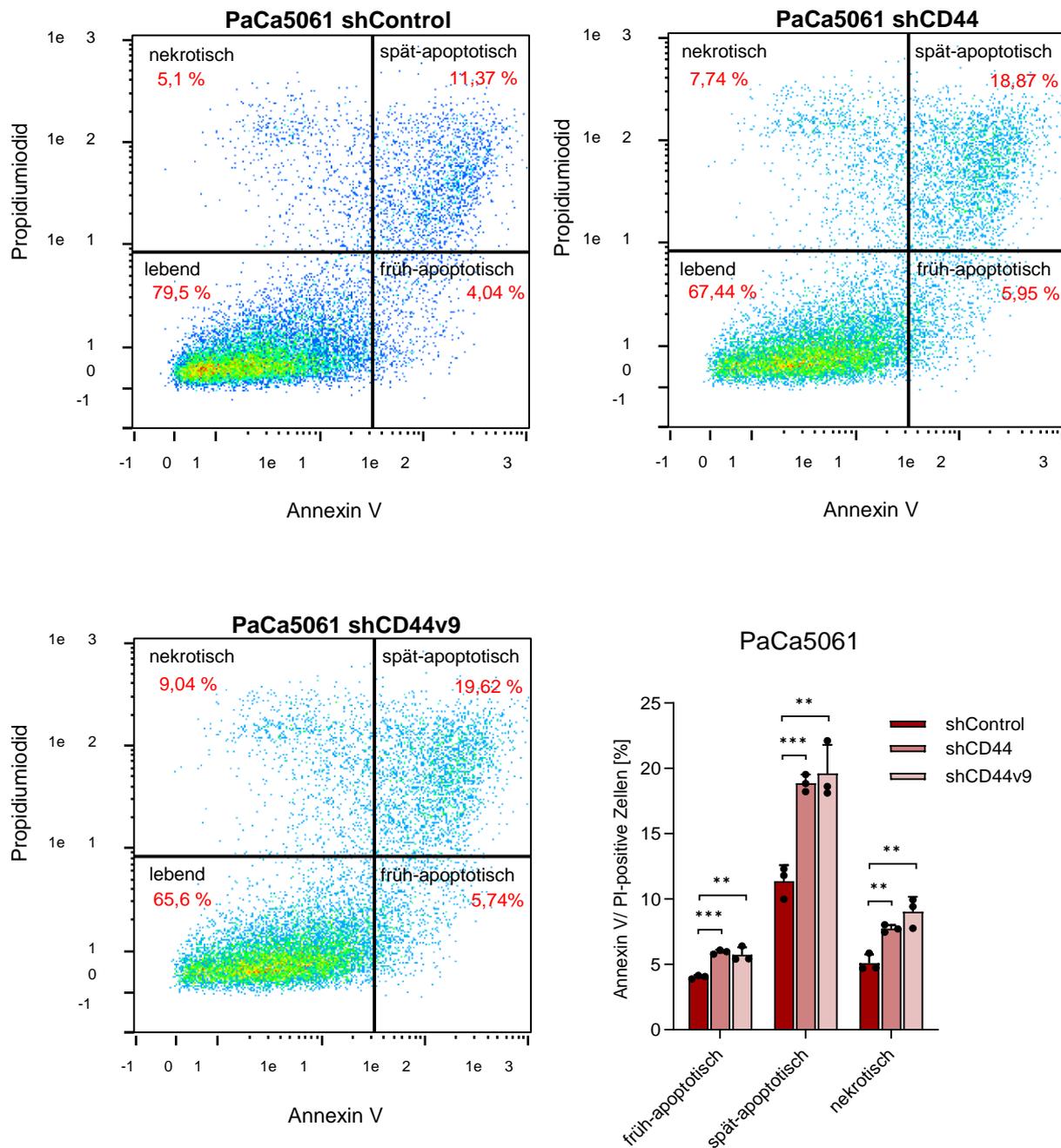


**Abbildung 22: Viabilitäts-Assay mit 3D-kultivierten Tumor-Sphäroiden.** Relative Lumineszenzintensität als Maß für die Viabilität der Tumorzellen nach vier Tagen Wachstum in **(A)** Softagar oder **(B)** *ultra-low attachment* Mikrowell-Platten.

### 3.11 Zelllinien-spezifische Effekte der CD44-KDs auf die Tumorzell-Apoptose nach 3D-Zellkultur

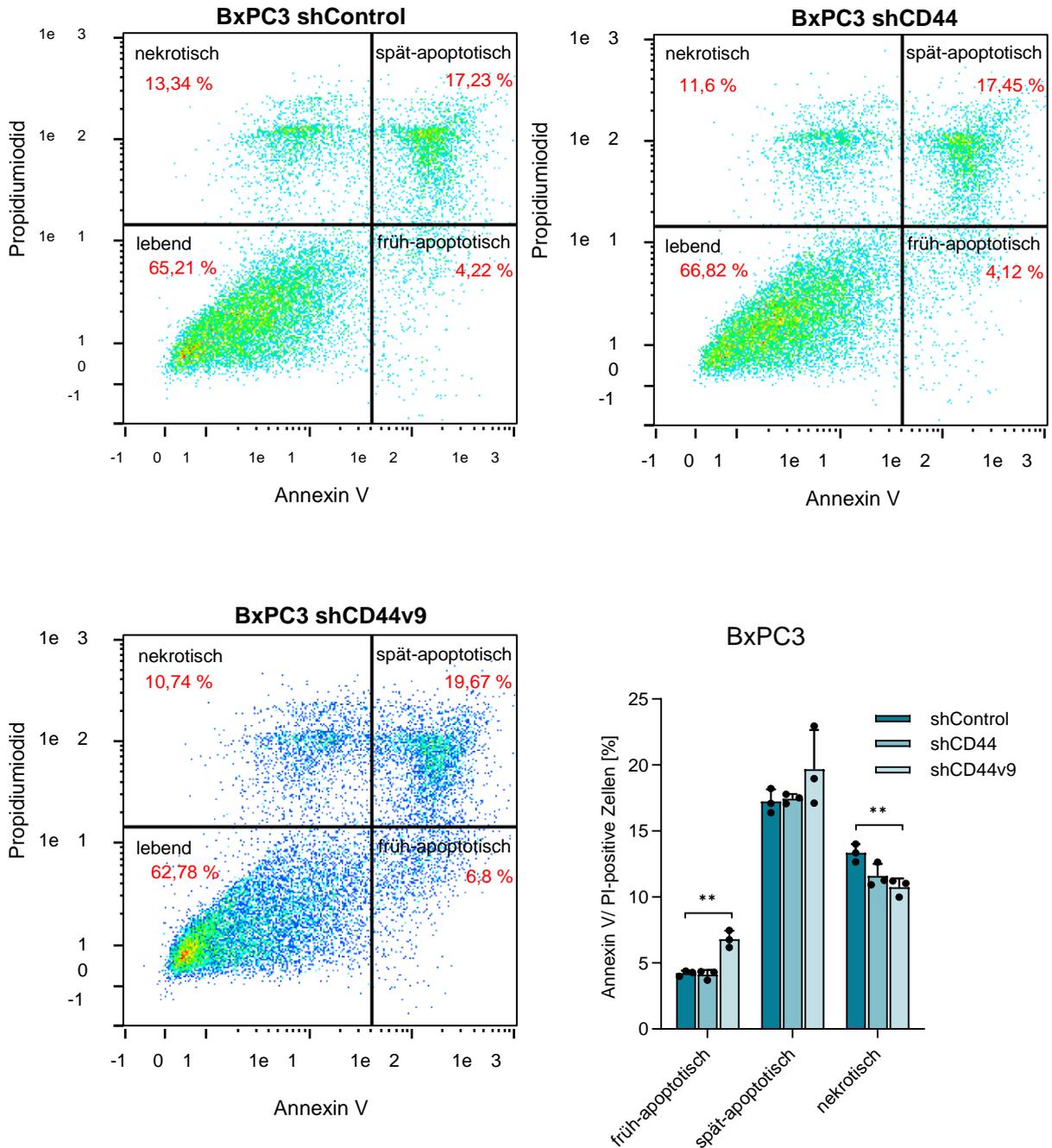
Während beim Viabilitäts-Assay nicht nur Überleben, sondern gleichzeitig auch Proliferation miterfasst wird, haben wir zusätzlich noch die Anteile früh-apoptotischer, spät-apoptotischer und nekrotischer Tumorzellen nach verankerungslosem 3D-Wachstum auf poly-HEMA-beschichteten Zellkulturflaschen über vier Tage gemessen. Interessanterweise zeigten beide CD44-KD-Derivate von PaCa5061 sowohl mehr früh- (Annexin V-positiv) und spät-apoptotische Zellen (Annexin V- und Propidiumiodid-positiv), als auch mehr nekrotische Zellen (Propidiumiodid-positiv) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23A). Schaut man hingegen auf BxPC3, sieht man nur im CD44v9-KD eine Zunahme der früh-apoptotischen Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der nekrotischen Zellen (Abb. 23B).

A



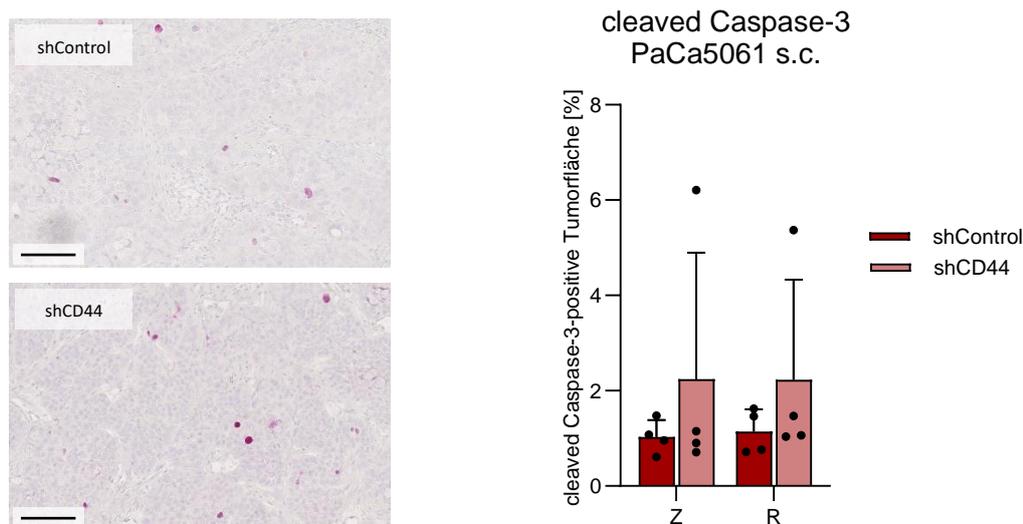
Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

B



**Abbildung 23: Bestimmung von früh-/ spät-apoptotischen und nekrotischen Tumorzellanteilen nach verankerungslosem 3D-Wachstum.** (A) PaCa5061 oder (B) BxPC3 shControl, shCD44 und shCD44v9 Sphäroide wurden mit Annexin V (Apoptosemarker) und Propidiumiodid (Nekrosemarker) gefärbt und die Subpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. Annexin V-positiv = früh-apoptotisch, Annexin V-/ Propidiumiodid-positiv = spät-apoptotisch, Propidiumiodid-positiv = nekrotisch.

Die vermehrte Apoptose nach 3D-Wachstum von PaCa5061 CD44-KD-Sphäroiden konnten wir nach Wachstum dieser Zellen *in vivo* anhand von IHC-Färbungen der Xenografttumoren für cleaved Caspase-3 nicht bestätigen (Abb. 24).



**Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von apoptotischen Zellen mit Antikörpern gegen cleaved Caspase-3 in PaCa5061 s.c. Xenografttumoren.** Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts. Pro Tumorprobe wurden 7 bis 23 Blickfelder analysiert und hieraus anschl. ein Mittelwert für jede Tumorprobe gebildet. Dabei wurden das Tumorzentrum (Z) und der Tumorrand (R) getrennt betrachtet. Der Maßstab entspricht 100 µm. Die Fotos sind repräsentativ für die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

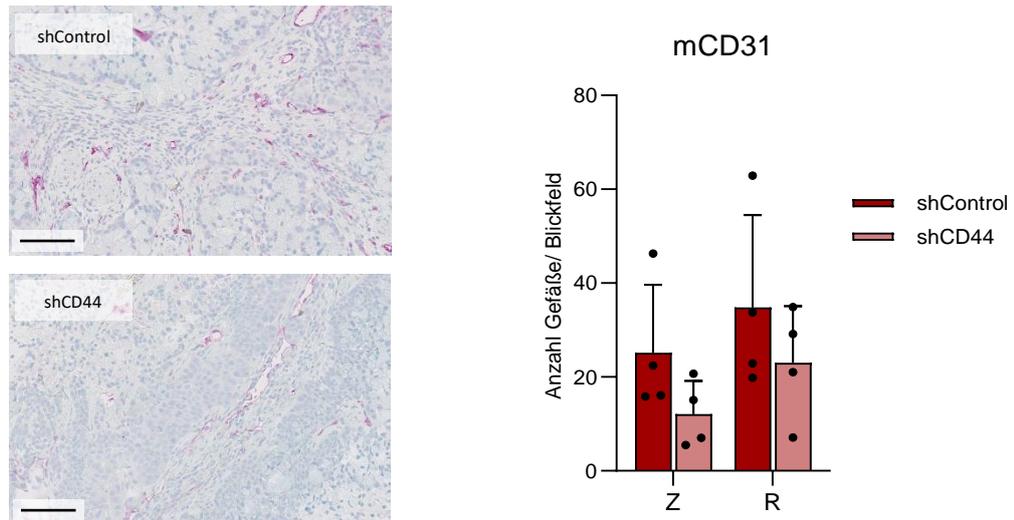
Wir konnten zusätzlich mit dem Human Cell Death PathwayFinder RT2 Profiler™ PCR Array (Qiagen) zwei regulierte Gene im Zusammenhang mit Apoptose in den PaCa5061 s.c. Xenografttumoren identifizieren (Tab. 5). Interessanterweise haben diese Gene entgegengesetzte Funktionen; während *BIRC3* Apoptose inhibiert, stellt *FAS* einen Rezeptor mit einer Domäne für die Induktion des programmierten Zelltods dar. Beide Gene waren im CD44-KD von PaCa5061 s.c. signifikant hochreguliert.

**Tabelle 5: Regulierte Zelltod-assoziierte Gene in PaCa5061 s.c. shCD44 vs. shControl.**

Gene Symbol	Fold Regulation	p-Value
BIRC3	2.56	0.012454
FAS	2.00	0.005371

### 3.12 Effekt des CD44-KDs auf die Anzahl der Gefäße in Xenografttumoren

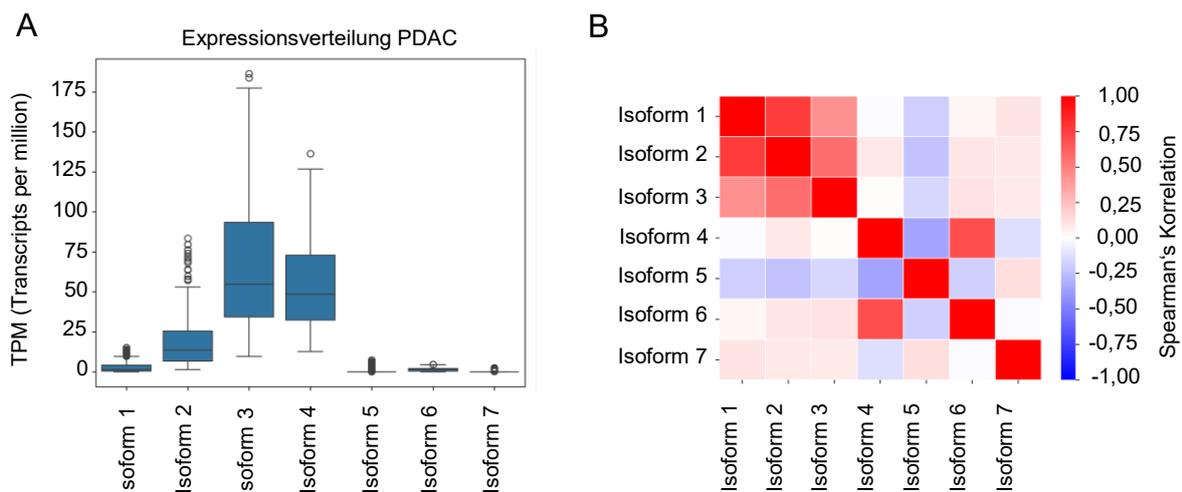
Anhand von IHC-Färbungen gegen das murine CD31 (Marker von Endothelzellen) konnten wir in den Xenografttumoren der Gruppen PaCa5061 shControl und shCD44 keinen Unterschied in der Anzahl der Tumorgefäße feststellen (Abb. 25).



**Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von Blutgefäßen anhand von murinem CD31 in PaCa5061 s.c. Xenografttumoren.** Die Auswertung erfolgte durch manuelle Bestimmung der mittleren Gefäßanzahl pro Blickfeld an 6 bis 31 Blickfeldern pro Tumorprobe. Dabei wurden das Tumorzentrum (Z) und der Tumorrand (R) getrennt betrachtet. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. Die Fotos sind repräsentativ für die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

### 3.13 CD44-Isoformen in PDAC Patient:innen (TCGA)

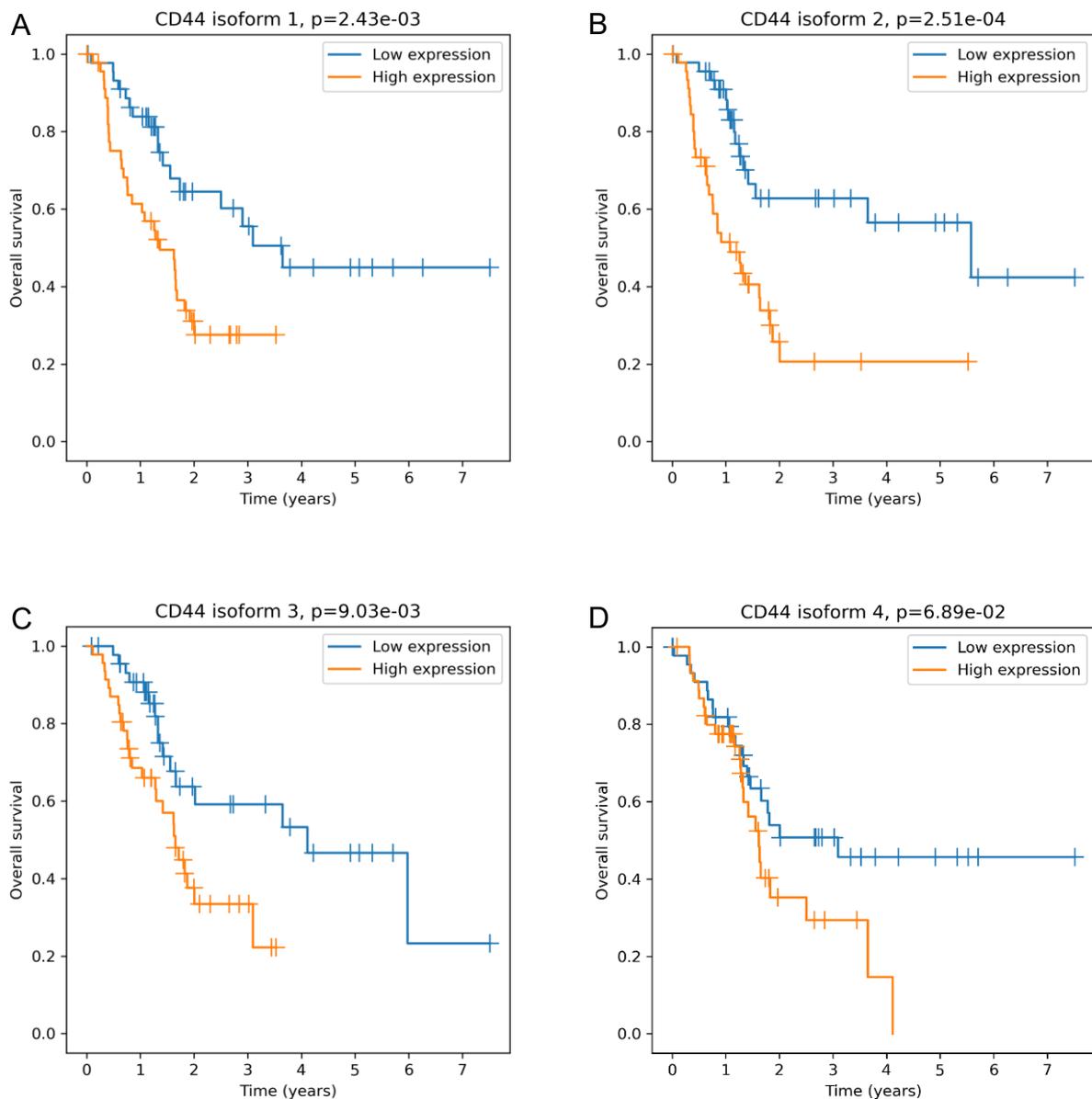
Eine *in silico*-Analyse zur Verteilung der CD44-Isoformen 1-7 in der PDAC Datenbank (TCGA) zeigte, dass vor allem Isoform 3 und 4, gefolgt von Isoform 2 und 1, in Patient:innen exprimiert werden (Abb. 26A). Dabei bestand eine moderate bis starke Korrelation zwischen den CD44-Isoformen 1-3 untereinander, aber keine Korrelation mit Isoform 4 (Abb. 26B). Isoform 4 korrelierte allerdings mit Isoform 6, welche in PDAC aber kaum exprimiert wurde.



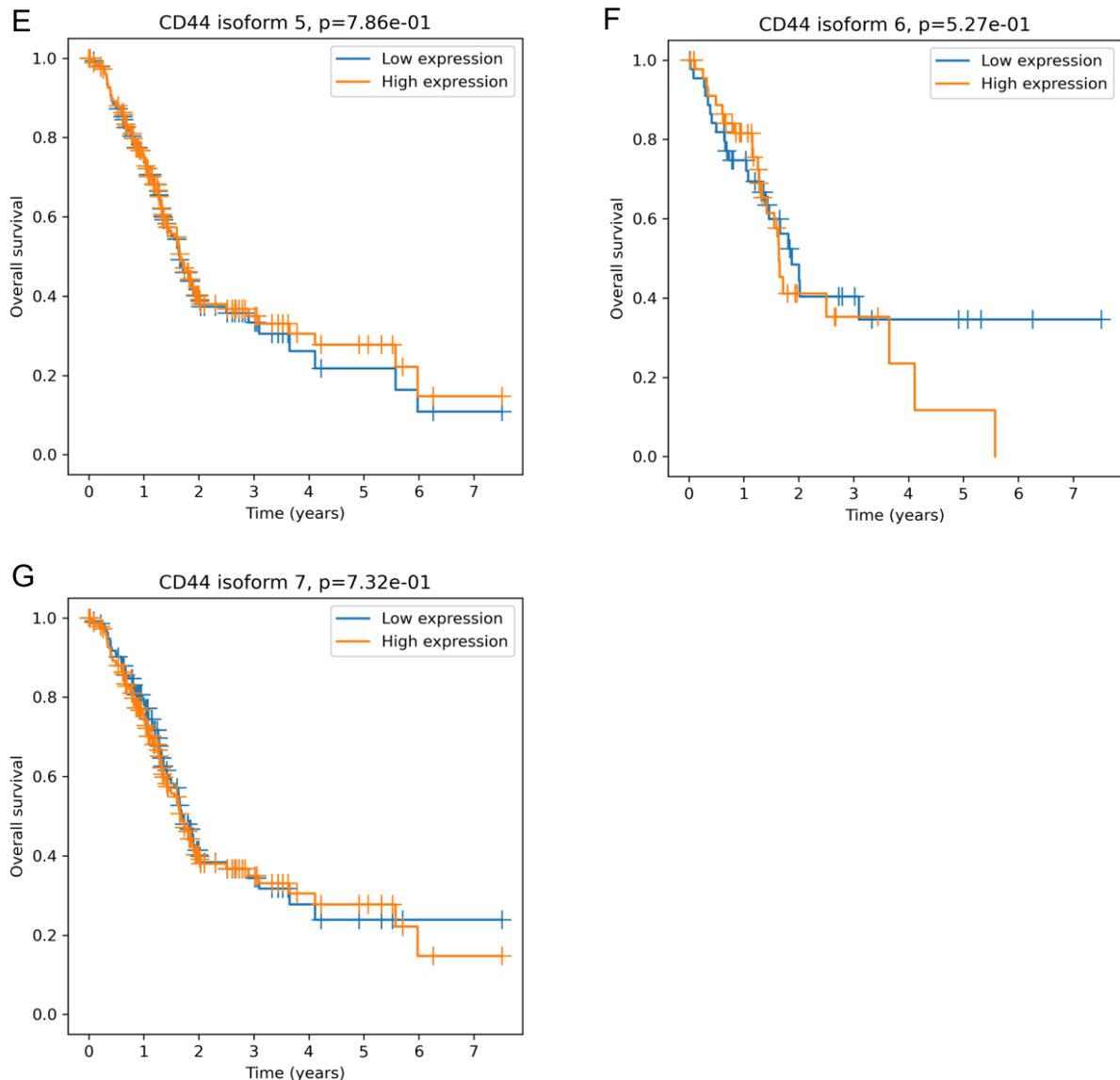
**Abbildung 26: (A) Verteilung der CD44-Isoformen Expression in PDAC-Patient:innen und (B) Korrelation der CD44-Isoformen untereinander** (TCGA-Analyse in Kooperation mit Dr. Stepan Nersisyan, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia).

### 3.14 CD44-Isoformen 1-3 sind prognostisch relevant in PDAC Patient:innen

In der TCGA Datenbankanalyse haben wir die prognostische Relevanz der CD44-Isoformen 1-7 in PDAC Patient:innen untersucht (Isoform 8 ist in der Datenbank nicht vertreten). Wie man in Abbildung 27A-G erkennt, war eine hohe Expression der Isoformen 1-3 signifikant prognostisch ungünstig für das Gesamtüberleben (Isoform 1:  $p > 0,002$ , Isoform 2:  $p > 0,0002$ , Isoform 3:  $p > 0,009$ ), Isoform 4 mit  $p > 0,06$  jedoch knapp nicht signifikant. Isoform 5 ( $p > 0,7$ ), Isoform 6 ( $p > 0,5$ ) und Isoform 7 ( $p > 0,7$ ) waren nicht prognostisch relevant.



Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

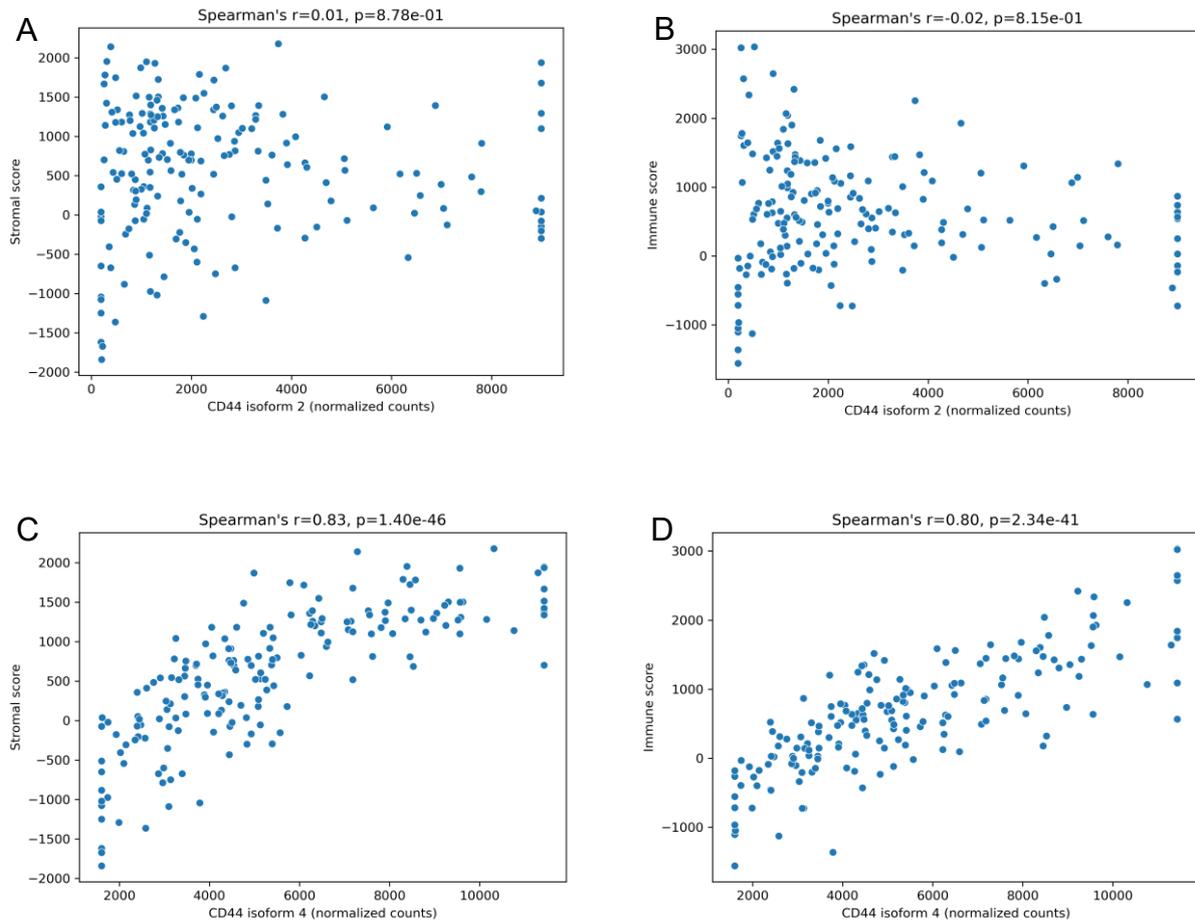


**Abbildung 27: Überlebenskurven von PDAC Patient:innen mit hoher bzw. niedriger Expression der einzelnen CD44-Isoformen 1-7 (TCGA). (A-C) Eine hohe Expression der Isoformen 1-3 war prognostisch ungünstig, (D-G) Isoformen 4-7 waren nicht prognostisch (TCGA-Analyse in Kooperation mit Dr. Stepan Nersisyan, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia).**

### 3.15 CD44-Isoform 4 korreliert stark mit Stroma- und Immunzellen in PDAC Patient:innen (TCGA)

Die Überlebenskurven zeigten, dass Isoform 4 knapp nicht prognostisch relevant war in der TCGA PDAC-Kohorte. Dabei war auffällig, dass Isoform 4, aber keine der anderen CD44-Isoformen, sehr stark mit Stroma- und Immunzellen korrelierte (Abb. 28A-D). In Abbildung 28 sind beispielhaft für die fehlende Korrelation die Korrelationsdiagramme von Isoform 2 gezeigt (A+B) sowie die starke Korrelation von Isoform 4 mit dem Stroma- bzw. Immunscore (C+D). Die Stroma- bzw. Immunscores wurden in einem vorangegangenen Schritt mithilfe des Online-

Tools ESTIMATE (<https://www.nature.com/articles/ncomms3612>) anhand der bei TCGA hinterlegten Patient:innen-Daten ermittelt.



**Abbildung 28: Korrelationsdiagramme der CD44-Isoformen 2 und 4 mit Stroma- bzw. Immunzellen** (TCGA-Analyse in Kooperation mit Dr. Stepan Nersisyan, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia).

Nach Adjustieren des prognostischen Effekts der einzelnen Isoformen auf den Stroma- und Immun-Score, das Geschlecht und Tumorstaging verlor Isoform 4 mit  $p = 0,1$  (multivariate Regression) noch weiter an Signifikanz hinsichtlich ihrer (univariat ohnehin nicht signifikanten) prognostischen Bedeutung (Tab. 6). Im Gegensatz dazu behielten Isoformen 1-3 ihre univariat gezeigte prognostische Bedeutung auch im multivariaten Regressionsmodell nach Adjustieren auf die genannten Parameter (Tab. 6).

**Tabelle 6: Multivariates Regressionsmodell der CD44-Isoformen adjustiert auf Geschlecht, Tumorstaging, Stroma- und Immunzellen.** Angegeben sind p-Wert und Hazard Ratio der prädiktiven Rolle der CD44-Isoformen für das Gesamtüberleben von PDAC Patient:innen (TCGA-Analyse in Kooperation mit Dr. Stepan Nersisyan, Computational Medicine Center, Thomas Jefferson Universität, Philadelphia).

	p-Wert	HR (Hazard Ratio)
<b>Isoform 1</b>	<b>0,001</b>	<b>1,17</b>
<b>Isoform 2</b>	<b>0,0002</b>	<b>1,36</b>
<b>Isoform 3</b>	<b>0,02</b>	<b>1,28</b>
Isoform 4	0,1	1,58
Isoform 5	0,97	1,00
Isoform 6	0,7	0,99
Isoform 7	0,26	1,04

### 3.16 Diskordante Regulation von Genen durch CD44 Isoform 1-4 (TCGA)

Um zu erfahren, welche Gene in Patient:innen (TCGA) durch CD44 Isoform 1-4 reguliert werden, haben wir eine DEG-Analyse nach Unterteilung der Kohorte in die jeweils 25 % der stärksten bzw. schwächsten CD44 Isoformen-Expression vorgenommen. Die Hälfte der Kohorte mit einer mittleren Expression von CD44-Isoform war hier also aus der Analyse ausgeschlossen. Es resultierten Vergleichsgruppen mit einer Fallzahl von n=46. Es galten auch hier die adjustierenden Parameter wie aus der multivariaten Analyse (siehe Tab. 6). Hierbei zeigten sich 917 DEGs (bei Isoform 1), 774 DEGs (bei Isoform 2), 684 DEGs (bei Isoform 3) und 540 DEGs (bei Isoform 4). Im Vergleich von Isoform 1-3 jeweils mit Isoform 4 zeigte sich ein nahezu vollständig diskordanter Overlap (152 von 153 Gene bei Isoform 1 vs. 4,  $p < 0,0001$ ; 162 von 164 Gene bei Isoform 2 vs. 4,  $p < 0,0001$ ; 110 von 112 Gene bei Isoform 3 vs. 4,  $p < 0,0001$ ). Interessanterweise waren also fast alle Gene, die von Isoform 1-3 bzw. 4 in Patient:innen reguliert werden, in genau entgegengesetzte Richtungen reguliert.

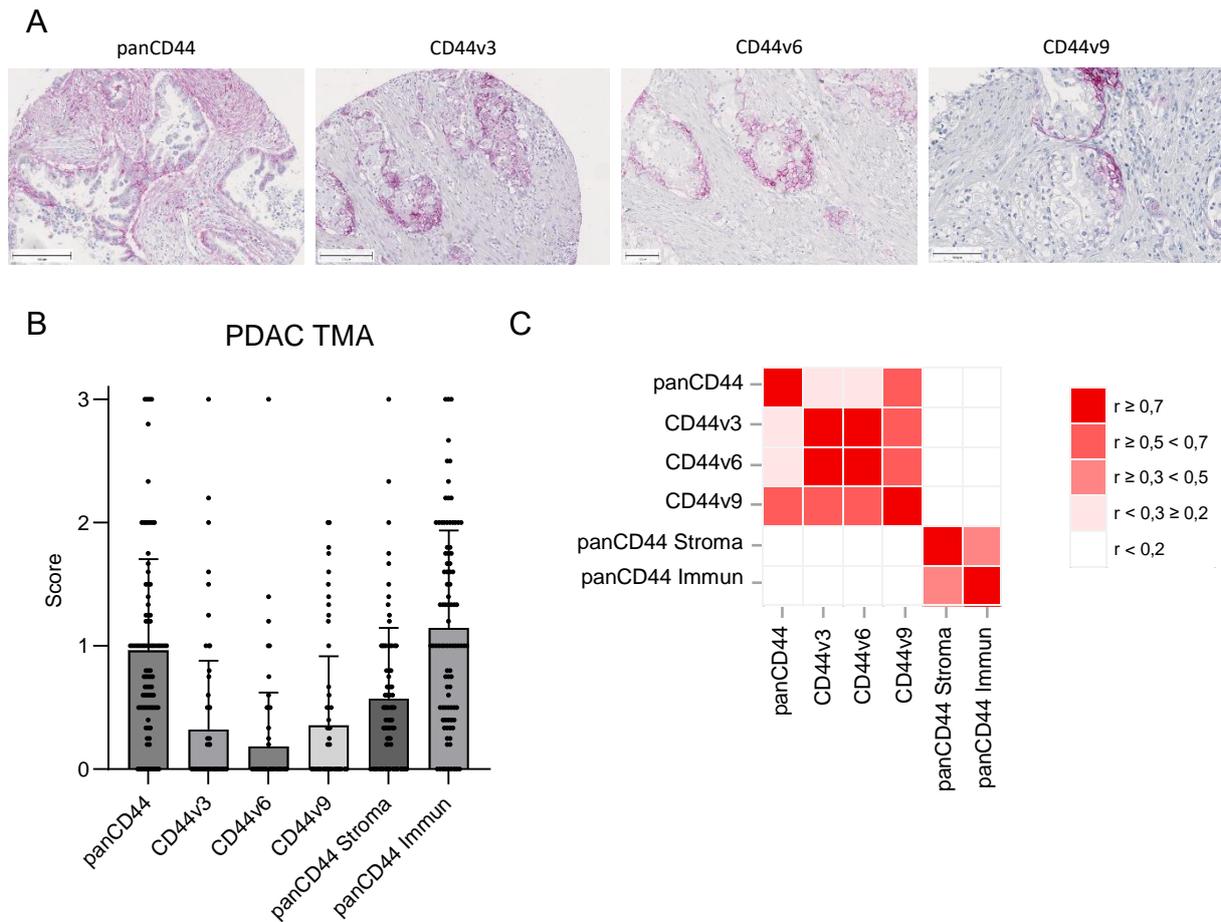
### 3.17 CD44v3 und CD44v6 korrelieren eng miteinander in PDAC Patient:innen (TMA-Analysen)

Zusätzlich zu den TCGA-Daten zu Prognose und Korrelation der CD44-Isoformen in PDAC, haben wir einen TMA mit Tumorstanzen von 93 PDAC Patient:innen sowie Pankreas-Normalgewebe (Kooperation mit Prof. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, und Prof. Susanne Sebens, Institut für Tumorbologie, beide CAU Kiel) verwendet. Die Basischarakteristika der analysierten Kohorte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Der TMA wurde mit Antikörpern gegen panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9 gefärbt (Abb. 29A) und ein Score für die Stärke der Färbungen der enthaltenen Tumorzellen erhoben (0 = negativ, 1

= schwach, 2 = mittel, 3 = stark). Da pro Patient:in mehrere Tumorstanzen vorlagen, wurde jeweils der mittlere Färbe-Score pro Patient:in ermittelt. Stanzen, die nur Normalgewebe enthielten, wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Da der panCD44-Antikörper auch das CD44 des Stroma- und Immunzellanteils mit anfärbt, haben wir hierfür ebenfalls Scores erhoben und getrennt ausgewertet. Die anderen Färbungen (gegen CD44v3, v6, v9) haben keinerlei Farbreaktion im Tumorstroma oder begleitenden Immunzellen hervorgebracht, sondern nur im Bereich der Tumorzellen. Die Häufigkeit der ermittelten Färbescores ist in Abbildung 29B gezeigt. Eine Korrelationsanalyse ergab, dass das panCD44-Signal der Tumorzellen nur mit CD44v9 moderat korrelierte ( $r=0,6492$ ). CD44v3 und CD44v6 korrelierten stark miteinander ( $r=0,8645$ ), und jeweils moderat mit CD44v9 ( $r=0,5351$  bzw.  $r=0,5617$ ). Stroma- und Immunzellen (panCD44) korrelierten lediglich schwach untereinander ( $r=0,3698$ ) (Abb. 29C). Zum Zeitpunkt der Analyse lagen uns leider noch keine weiteren Verlaufsdaten der Patient:innen zum Überleben vor, so dass wir noch keine Validierung der prognostischen Rolle der CD44 Isoformen aus der TCGA-Analyse anhand eines Proteinnachweises am TMA vornehmen konnten.

**Tabelle 7: Basischarakteristika der Patient:innen-Kohorte des PDAC-TMAs.** Informationen zum Geschlecht lagen nicht vor.

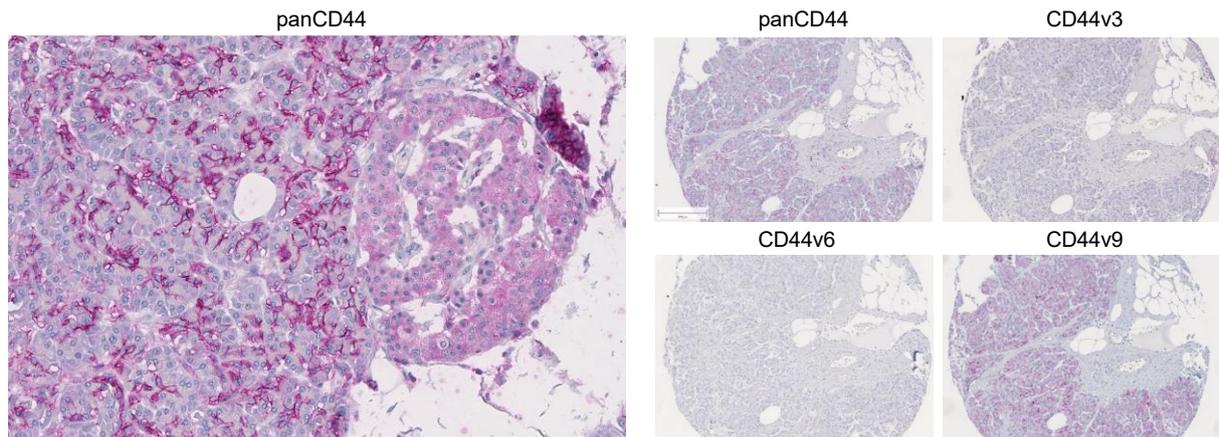
	Total N = 93, N (%)
<b>Alter</b>	
40-49	2 (2,2 %)
50-59	13 (14,0 %)
60-69	30 (32,2 %)
70-79	39 (41,9 %)
80-89	9 (9,7 %)
<b>T-Stadium</b>	
T1	4 (4,3 %)
T2	9 (9,7 %)
T3	78 (83,8 %)
T4	2 (2,2 %)
<b>Lymphknotenstatus</b>	
N0	21 (22,6 %)
N1	71 (76,3 %)
N2	1 (1,1 %)
<b>Grading</b>	
G1	2 (2,2 %)
G2	48 (51,6 %)
G3	38 (40,9 %)
unbekannt	4 (4,3 %)



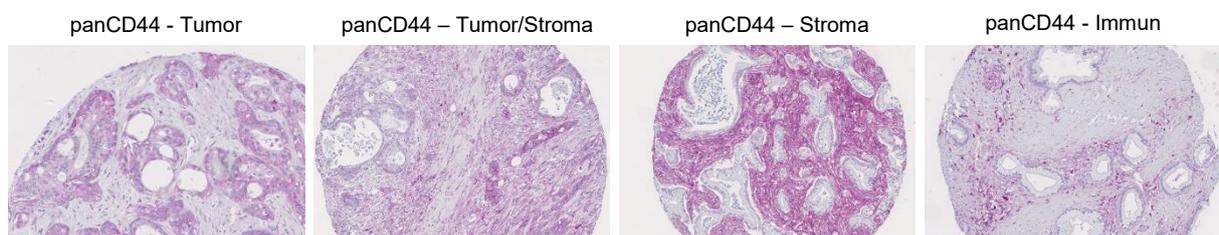
**Abbildung 29: CD44-Scores und Korrelation von immunhistochemischen Färbungen mit panCD44 und CD44-Varianten beim PDAC TMA. (A)** Beispiele positiv gefärbter Tumorareale für panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9. **(B)** Die Vergabe des Scores erfolgte nach Stärke der Färbung. Da pro Patient:in mehrere Tumorstanzen im TMA vorlagen, wurde die mittlere Intensität pro Patient:in errechnet. **(C)** Die Korrelation der Scores wurde über Spearman-Korrelation ermittelt.

Passend zu den Scores des TMAs und den daraus resultierenden Korrelationen, gab es mehrere Besonderheiten im Färbemuster. Normales Pankreasgewebe ließ sich regelmäßig für panCD44 und CD44v9 anfärben, für CD44v3 und CD44v6 hingegen nicht (Abb. 30A). Wie oben bereits erwähnt, konnten wir mit panCD44 nicht nur eine Anfärbung der Tumorzellen, sondern auch des Stromas und der Immunzellen feststellen (Abb. 30B). Mit allen CD44-Antikörpern gegen Exonvarianten konnten wir diese Stroma-/ Immunzell-Anfärbung nicht beobachten (Abb. 30C). Außerdem gab es Fälle, bei denen die Tumorzellen nur mit panCD44 und CD44v3 angefärbt werden konnten (Abb. 30D), oder mit panCD44 und CD44v9 (Abb. 30E). Interessanterweise gab es ebenso vereinzelt Fälle, die nur CD44v3 und CD44v6 positiv waren (Abb. 30F), aber negativ für panCD44 und CD44v9.

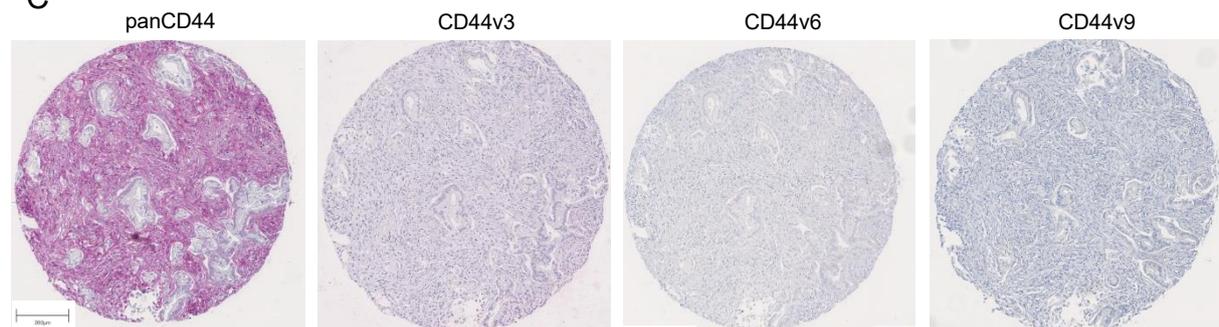
A



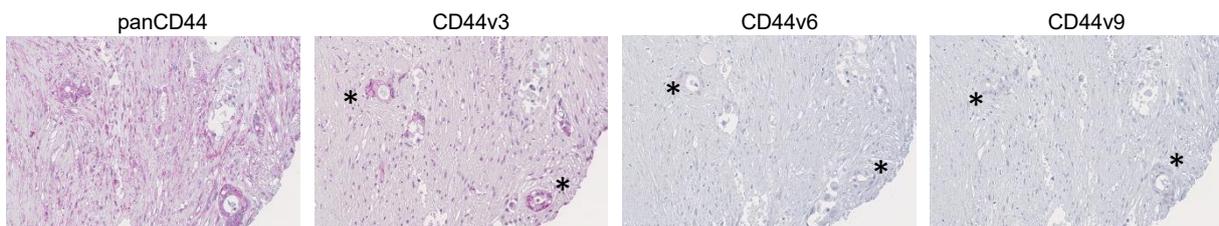
B



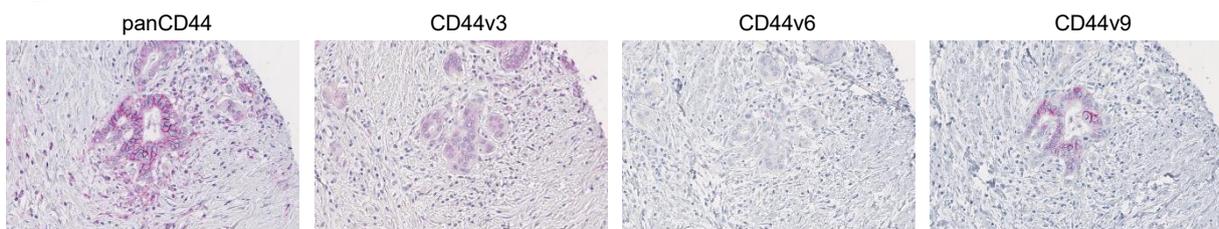
C



D

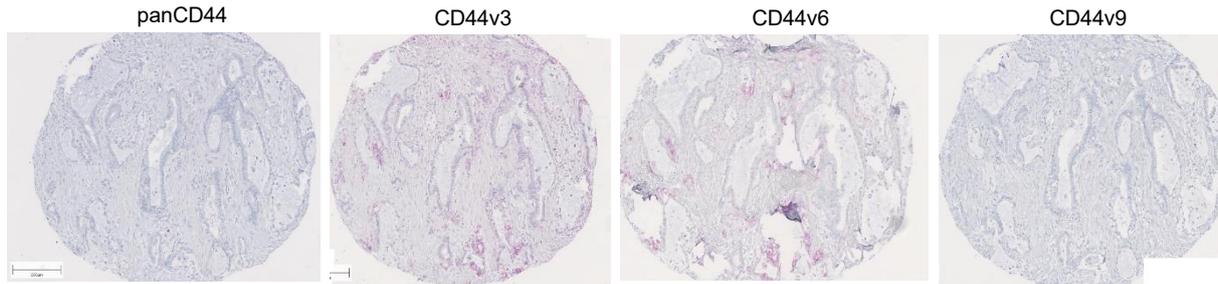


E



Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

F

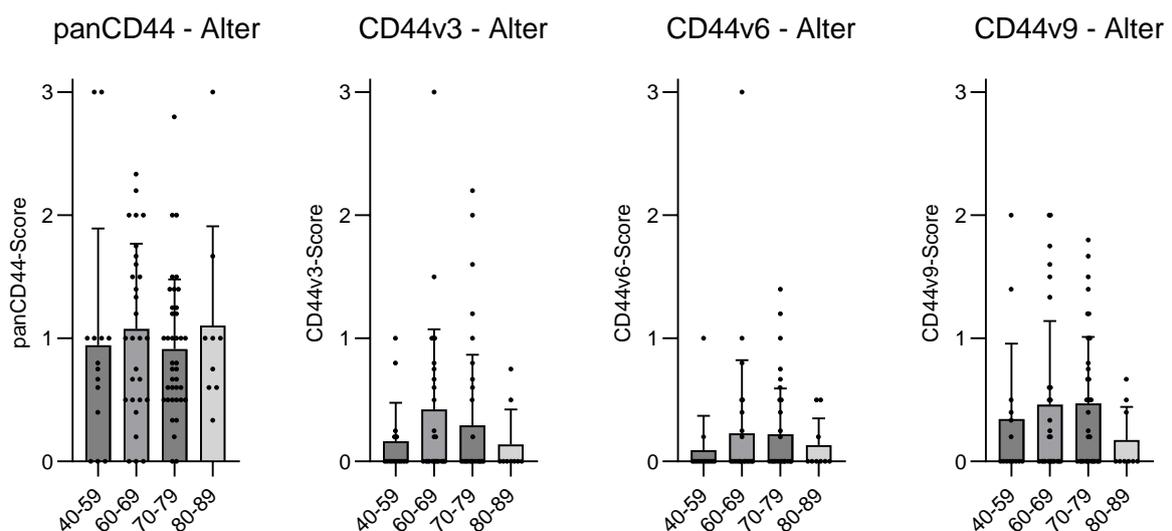


**Abbildung 30: Beispiele von CD44-Färbemustern beim PDAC TMA. (A)** Anfärbung von normalem Pankreasgewebe mit panCD44 und CD44v9, aber nicht CD44v3 und CD44v6. **(B)** PanCD44 färbt Tumorzellen, Stroma- und Immunzellen an, **(C)** mit varianten CD44-Antikörpern sind Stroma- und Immunzellen dagegen negativ. Es liegen auch vereinzelt Fälle vor, bei denen nur **(D)** panCD44 und CD44v3, **(E)** panCD44 und CD4v9, oder **(F)** CD44v3 und CD44v6 die Tumorzellen anfärben. (Kleine Tumorzellnester sind mit einem \* markiert.)

### 3.18 Assoziation der CD44 Färbesresultate mit den Tumorphänotypen (TMA)

Eine Analyse bzgl. der Assoziationen zwischen CD44-Färbescores und den Basischarakteristika der Tumorstanzen der Pankreaskarzinom-Patient:innen (Alter (Abb. 31A), T-Stadium/ Tumordurchmesser bei OP (Abb. 31B), N-Status/ Lymphknotenstatus (Abb. 31C) und Grading/ Dedifferenzierungsgrad (Abb. 31D)) ergab, dass mit den Antikörpern gegen CD44v3 und CD44v6 stärkere Signale bei Patient:innen mit einem höheren Grading einhergingen. Für die Analysen wurden Untergruppen der einzelnen Charakteristika zusammengefasst, wenn sie nur sehr wenige Datenpunkte umfassten.

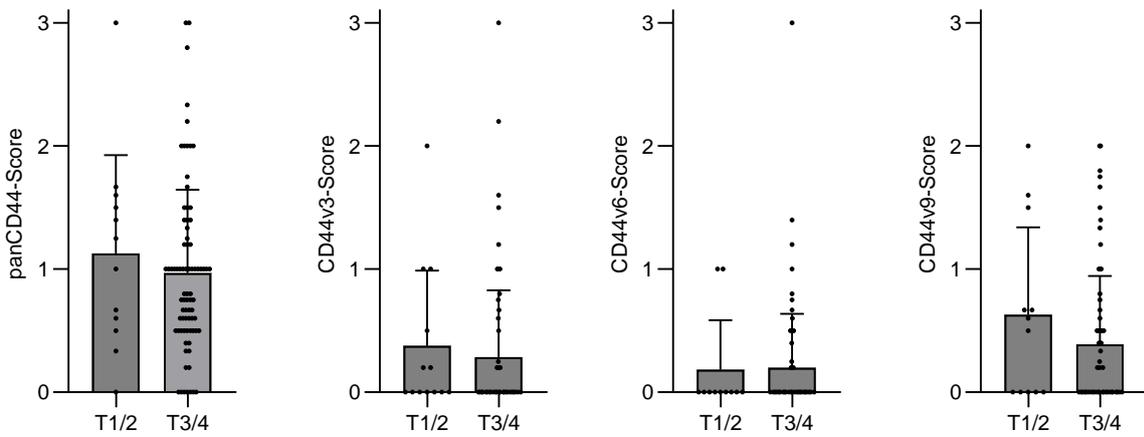
A



Abbildungsfortsetzung und Legende auf nächster Seite.

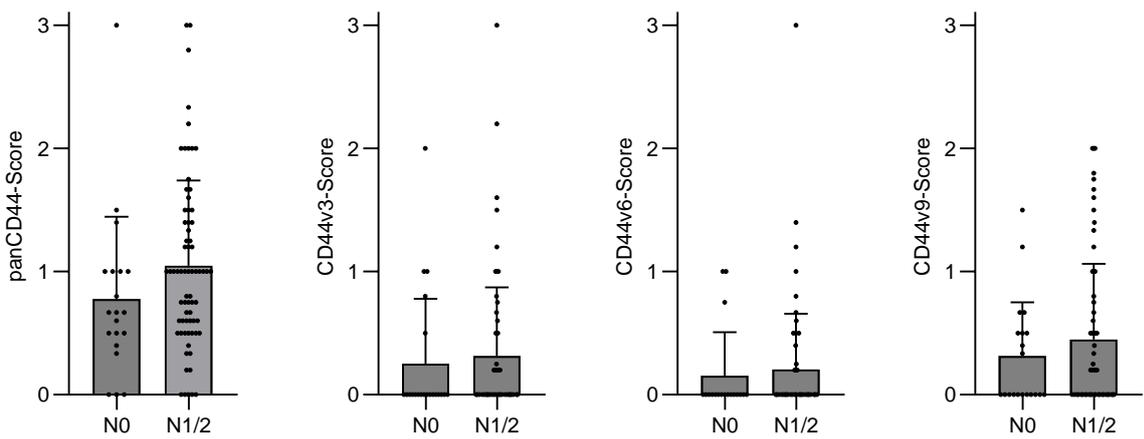
B

panCD44 - T-Stadium    CD44v3 - T-Stadium    CD44v6 - T-Stadium    CD44v9 - T-Stadium



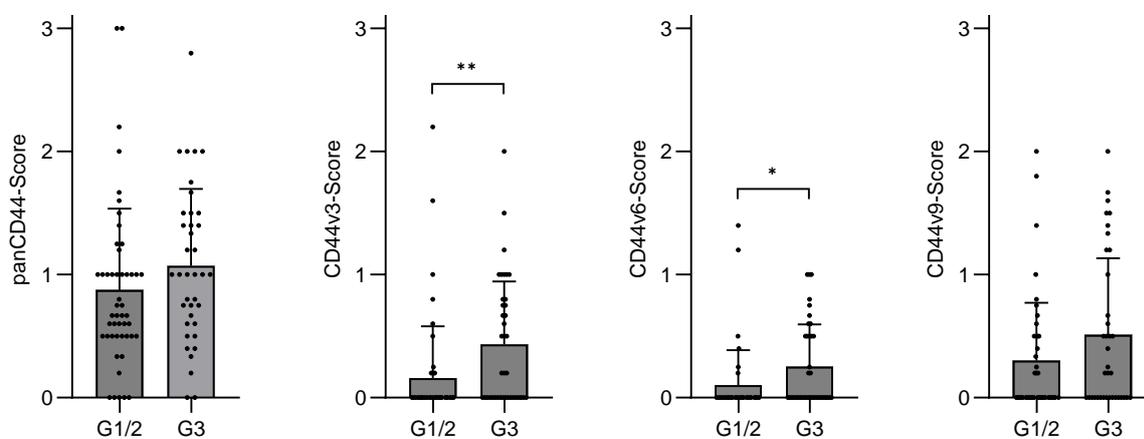
C

panCD44 - N-Status    CD44v3 - N-Status    CD44v6 - N-Status    CD44v9 - N-Status



D

panCD44 - Grading    CD44v3 - Grading    CD44v6 - Grading    CD44v9 - Grading



**Abbildung 30: Assoziations-Analyse zwischen CD44-Färbescores und den Basischarakteristika (A) Alter, (B) T-Stadium, (C) N-Status und (D) Grading der Pankreaskarzinom-Patient:innen Kohorte.**

## 4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt eine der am fatalsten verlaufenden Tumorerkrankungen dar. Trotz aller Fortschritte in der medizinischen Forschung ist es in den letzten Jahrzehnten aber nicht gelungen, durch etablierte oder neue Therapien eine substanzielle Verbesserung des Überlebens für PDAC Patient:innen zu schaffen. Daher ist es von fundamentaler Bedeutung, die Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung beim Pankreaskarzinom besser zu verstehen. Ein vielversprechendes Molekül in diesem Kontext ist CD44. Es ist bereits Gegenstand jahrelanger Forschung und seine Überexpression steht im Zusammenhang mit vielen Tumorerkrankungen (Chen et al., 2023; Senbanjo and Chellaiah, 2017). Vor allem seine unterschiedlichen Isoformen scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen, sodass es für uns von besonderem Interesse war, uns der Rolle der CD44-Isoformen im Pankreaskarzinom zu widmen.

Zur Bearbeitung dieses Projekts haben wir uns für die beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaCa5061 und BxPC3 entschieden. Beide Zelllinien exprimieren vorrangig die im PDAC abundantesten CD44-Isoformen 1-4 und deren variante Exons, die auch in publizierten Studien zu CD44 in Tumoren meist im Fokus liegen (Li et al., 2014). Zudem zeigte sich in allen durchgeführten Methoden zum Nachweis der CD44-Isoformen ein vergleichbares Isoformen-Muster zwischen PaCa5061 und BxPC3 (Durchflusszytometrie, qRT-PCR, Western Blot, RNA-Sequenzierung, Immunhistochemie). Ausgehend von diesen zwei sehr ähnlichen CD44-Niveaus haben wir zunächst versucht, neben einem panCD44-KD auch Isoform-spezifische CD44-KDs mittels shRNA zu erzeugen. Für die Isoformen 1-4 ist uns dies zunächst nicht gelungen, da meist auch die jeweils anderen Isoformen mit verändert wurden. Nur bei dem CD44v9-KD, der auf die Isoformen 1-3 abzielt, haben wir einen spezifischen, wenn auch nicht sehr starken KD generieren können (ca. 55 % bei PaCa5061 und 42 % bei BxPC3). Der panCD44-KD hat dahingegen sehr effizient alle Isoformen reduziert (um ca. 89 % bzw. um 96 %). Ein mögliches Problem für die fehlende Spezifität der Isoform-KDs könnte im Design der shRNAs liegen. Da die varianten Exons, auf die man mit der shRNA abzielt, nur eine sehr kurze Sequenz haben und zudem die shRNA-Sequenz zwei Isoform-spezifisch benachbarte variante Exons überspannen sollte, sind auch die Variationsmöglichkeiten für die shRNA-Sequenzen sehr begrenzt. Die wenigen überhaupt in Frage kommenden shRNA-Sequenzen könnten dann eine geringere Spezifität für das Target aufweisen als Sequenzen, die innerhalb großer Exons variabel ausgewählt werden können, letztlich auch unter Berücksichtigung potenzieller Off-Target-Effekte. Die Herstellung der Isoform-spezifischen CD44-KDs war im Rahmen dieser Arbeit ein erster Versuch und nach unserem Wissensstand gibt es bisher kaum Studien dazu (Tsubouchi et al., 2017). Es könnte also vielversprechend sein, mit weiterer Etablierungsarbeit gute und spezifische KDs zu

generieren und diese im Pankreaskarzinom zu erforschen. Alternativ könnte die CRISPR/Cas9-Technologie zur Erzeugung von Knockouts zum Einsatz kommen.

Obwohl wir zu dem Zeitpunkt sowohl spezifische panCD44-KDs als auch CD44v9-KDs von PaCa5061 und BxPC3 generiert hatten, haben wir uns zunächst aufgrund der deutlich besseren KD-Effizienzen dazu entschieden, nur die panCD44-KDs im Xenograftmodell zu testen. So konnten wir generell schauen, welchen Einfluss eine CD44-Depletion auf subkutanes und intraperitoneales Tumorstadium und deren Metastasierungswege hat und welche CD44-Isoformen nach Wachstum der Zellen *in vivo* prädominant exprimiert werden.

Wie bereits erwähnt, wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe bereits eine medizinische Doktorarbeit von Benjamin Fritz verfasst, die sich mit den Auswirkungen eines pan-CD44-KDs in PaCa5061 und BxPC3 im Xenograftmodell befasst (Veröffentlichungsversion\_Fritz\_Benjamin\_20201023.pdf, 2020). Es hat sich allerdings mittlerweile aus Authentifizierungsergebnissen herausgestellt, dass es scheinbar während der Generierung der CD44-KDs eine Verwechslung bei PaCa5061 CD44-KD mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 gegeben hat, sodass die Auswirkungen eines CD44-KD in dieser Zelllinie tatsächlich bislang nie untersucht wurde. Die Versuche von B. Fritz fanden außerdem ausschließlich subkutan und in einem anderen Mausmodell (*Pfp<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>* auf C57BL/6J-Hintergrund) statt. Die nun vorliegende Arbeit umfasst sowohl ein s.c.- als auch ein i.p.-Mausmodell, so dass mehrere Metastasierungswege (hämatogen und intraperitoneal), die in Pankreaskarzinom-Patient:innen vorkommen können, untersucht werden konnten. Für beide Modelle wurden SCID-Mäuse verwendet, die im Gegensatz zu *Pfp/Rag2*-Mäusen voll funktionsfähige NK-Zellen ausbilden, andererseits jedoch aufgrund ihres Balb/c-Hintergrundes eine höhere Affinität zwischen SIRPA und CD47 ("*don't eat me*"-Signal) aufweisen (Waern et al., 2012), so dass die humanen Zellen durch murine Makrophagen in SCID-Mäusen weniger angegriffen werden. Obwohl die Ergebnisse aus der medizinischen Doktorarbeit von B. Fritz zu BxPC3 also nicht ganz vergleichbar sind, sollte bedacht werden, dass damals für BxPC3 CD44-KD im Vergleich zur Kontrolle eine niedrigere Metastasenlast in der Lunge festgestellt werden konnte. Dabei war insgesamt ein höheres pulmonales Metastasen-Level vorhanden als in dieser Studie. Es könnte also an den nicht voll funktionsfähigen NK-Zellen der *Pfp/Rag2*-Mäuse liegen (fehlender Perforin-Granzym-Weg), dass die Zellen sich stärker metastatisch verbreiten konnten. Aus diesem Blickwinkel hätte die gleichzeitig stärker gehemmte Phagozytose durch Makrophagen in SCID-Mäusen eine eher untergeordnete Bedeutung. Ein weiterer möglicher Grund könnte sein, dass wir für die vorliegende Arbeit die Zelllinie BxPC3 neu erworben haben, während die BxPC3-Zellen aus der medizinischen Dissertation von B. Fritz bereits mehrere Jahre am Institut genutzt worden waren. Trotz des Anlegens eines umfangreichen Kryo-Stocks bei niedriger Passage könnte es bereits durch die Zellkultur zu

zellbiologischen Änderungen gekommen sein. Auch das Verwenden einer mittlerweile neuen Charge FCS kann entscheidend zu einem veränderten Verhalten der kultivierten Zellen beitragen. Das stellt zurzeit in der Zelllinien-basierten Forschung noch ein Problem dar, da Chargen von FCS aufgrund ihrer tierischen Herkunft endlich sind und Änderungen zellulärer Eigenschaften wie der Glykosylierung, die gerade auch während der Metastasierung von Tumorzellen von zentraler Bedeutung sind, hervorrufen können. Vor diesem Hintergrund hatten wir uns dazu entschlossen, hinsichtlich Vergleichbarkeit und Verbesserung der Methoden die Xenograftversuche wie dargestellt durchzuführen.

Interessanterweise konnten wir ausschließlich bei den subkutan injizierten PaCa5061 einen Überlebensvorteil durch langsames Tumorwachstum nach CD44-KD beobachten. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass nur die wenigen Zellen mit einer Rest-Expression von CD44 überhaupt in der Lage sind zu wachsen und es deshalb länger braucht, bis die CD44-KD Tumoren dieselbe Größe erreicht haben wie die Tumoren der Kontrollgruppe. Für BxPC3 scheint der CD44-KD keinen Einfluss auf das s.c. Tumorwachstum zu haben, genauso wie bei beiden Zelllinien nach intraperitonealer Injektion. Als Erklärung für diese Beobachtung könnten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der *ex vivo* Tumoren mit Antikörpern gegen panCD44, CD44v3, CD44v6 und CD44v9 dienen. Man erkennt deutlich, dass der CD44-KD nach s.c. Wachstum von PaCa5061 *in vivo* nicht für alle Varianten stabil geblieben ist, wohingegen BxPC3 bei allen Antikörpern einen signifikanten und auch sehr starken KD zeigt. Das würde für ein Auswachsen von vor allem CD44-positiven Zellen im CD44-KD von PaCa5061 bzw. für ein CD44-abhängiges s.c. Tumorwachstum sprechen. Beim i.p.-Modell von PaCa5061, wo es keinen Effekt des CD44-KD auf das Überleben gab, ist der KD auch nach *in vivo*-Wachstum sehr deutlich nachweisbar. Gleichzeitig erkennt man aber auch, dass die CD44-Signale der Kontrollen *ex vivo* im Vergleich zu den *in vitro* kultivierten Zellen bei beiden Modellen deutlich niedriger sind. Skoda et al. haben bereits gezeigt, dass *in vitro*-kultivierte PDAC-Zellen eine gesteigerte CD44-Expression im Gegensatz zu den PDAC-Tumoren gezeigt haben (Skoda et al., 2016). Bei unseren Xenografttumoren sind sowohl das Gesamtlevel niedriger, als auch die Schwankungen der Einzelmessungen größer, was an einer Heterogenität der Tumoren liegen könnte. Diese Heterogenität zeigte sich dann auch in der anschließenden IHC-Analyse. Im Zentrum der s.c. PaCa5061 Tumoren waren der CD44-KD für panCD44, CD44v6 und CD44v9 verloren gegangen, während am Tumorrand der KD noch vorhanden war. Dass nun nur CD44v3 bei PaCa5061 s.c. im Tumorzentrum noch einen KD anzeigt, könnte auch damit zusammenhängen, dass dieser Antikörper besonders sensitiv, aber nicht besonders spezifisch war und deshalb evtl. mehr schwach-positive Zellen erkannt wurden als mit den anderen Antikörpern. Wir haben also in

zwei Nachweismethoden auf Proteinebene gesehen, dass der CD44-KD von PaCa5061 s.c. nicht stabil bleibt, je nach Tumorregion. Auf RNA-Ebene mittels RNA-Sequenzierung und Isoform-spezifischer qRT-PCR konnten wir allerdings für alle Injektionsmodelle signifikante KDs nachweisen, was gegen eine Regulation von CD44 schon auf Transkriptomebene spricht.

Leider haben wir in keinem der Injektionsmodelle einen Effekt auf die Metastasierung beobachten können, bzw. war die Metastasenlast insgesamt in allen untersuchten Geweben so niedrig, dass wir davon ausgehen können, dass die Tumoren fast gar nicht in der Lage waren zu metastasieren. Einzig in den Lungen vom CD44-KD der BxPC3 i.p.-Gruppe haben wir überhaupt Werte mit  $>1$  Tumorzelle/ 60ng DNA in der *Alu*-PCR identifizieren können. Eine weitere histologische Auswertung der Lungenmetastasen hat die Ergebnisse der *Alu*-PCR nochmals bestätigt. Da wir aber wissen, dass das Pankreaskarzinom in Patient:innen sehr früh zu metastatischen Läsionen führt, könnte man die Xenograftmodelle weiterentwickeln. Hierbei wäre zu berücksichtigen, dass ein möglicher Grund für das Ausbleiben manifester Metastasen die schnelle Wachstumsdauer der Tumorzellen gewesen sein könnte. Im i.p.-Modell wäre es schwer dafür eine Lösung zu finden, da die ersten Tiere innerhalb weniger Wochen eine so starke IP-Karzinose inkl. Aszitesbildung mit einer allgemeinen Verschlechterung des Gesundheitszustands entwickelten, dass ein weiteres Hinauszögern der Beendigung des Versuchs undenkbar wäre. Anders sieht es bei den s.c.-injizierten Mäusen aus; während des Tumorstwachstums gibt es keine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere. Einzig die Ulzeration der Haut über den wachsenden Tumoren hat in einem Teil der Versuchstiere dazu geführt, dass Tiere bereits vor Erreichen des Endpunktes „Tumorgroße“ aus dem Versuch genommen werden mussten. In beiden Fällen könnte man jedoch das Auswachsen von Metastasen dadurch begünstigen, indem man die s.c.-Tumoren frühzeitig herausoperiert und so die Überlebensdauer der Tiere und damit die Wachstumsdauer der potenziellen Metastasen insgesamt verlängert. Es wäre auch eine Überlegung, den Mäusen initial weniger als  $1 \times 10^6$  Zellen zu injizieren, um das Auswachsen der Tumormasse zu verlangsamen. Wobei es andererseits fraglich wäre, ob dadurch das Entstehen und Auswachsen von Metastasen auch verlangsamt werden würde. Dieser Ansatz könnte dann allerdings auch für das i.p.-Modell in Betracht gezogen werden. Wie wir in der Dissertation von Benjamin Fritz bereits gesehen haben, wäre es auch eine Überlegung, die Mauslinie von SCID hin zu einer noch immundefizienteren Mauslinie wie NSG oder Pfp/Rag2 zu ändern. So könnten Metastasen möglicherweise leichter auswachsen, da sie weniger von Immunzellen attackiert werden würden. Auf der anderen Seite könnten die fehlenden NK-Zellen im i.p.-Modell dazu führen, dass die Tumormasse noch schneller wächst und die Tiere noch schneller aus dem Versuch genommen werden müssten, ebenfalls wieder bevor manifeste Metastasen entstehen konnten.

Die RNA-Sequenzierung der Xenografttumoren hat gezeigt, dass bei der PaCa5061 s.c.-Gruppe mit Abstand die meisten Gene (1.246 DEGs) reguliert waren. Im Gegensatz dazu war bei den anderen Gruppen kaum Genregulation vorhanden (PaCa5061 i.p. = 35 DEGs, BxPC3 s.c. = 90 DEGs, BxPC3 i.p. = 9 DEGs). Insofern spiegelte sich der nachgewiesene Unterschied in der Tumorstadiumsgeschwindigkeit (Überleben) in dieser Gruppe auf Ebene einer stärkeren Genregulation wider und das obwohl hier der CD44-KD-Grad am Versuchsende am wenigsten ausgeprägt war. Offenbar war hier nicht das absolute CD44 Level selbst entscheidend für die Regulation der Genexpression, sondern das verlangsamte Tumorstadium, welches mit einer deutlichen Änderung der EZM-Zusammensetzung einherging. Abgesehen davon fiel auf, dass in beiden BxPC3-Modellen CEACAM7 im CD44-KD stark hochreguliert war. CEACAM7 ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches in einer kürzlich veröffentlichten Studie als möglicher prädiktiver Marker in PDAC gehandelt wird (Dhasmana et al., 2024). Möglicherweise ist diese Hochregulation von CEACAM7 ein Zelllinien-spezifischer Nebeneffekt des CD44-KDs, könnte aber Grund für den tendenziellen Anstieg der Lungenmetastasen im CD44-KD von BxPC3 sein. Aus Zeitgründen haben wir uns diesem Nebenbefund nicht weiter gewidmet, aber es wäre sicherlich interessant, ob der CEACAM7 Anstieg auch in den Primärtumoren und den dazugehörigen Lungenmetastasen auf Proteinebene zu finden ist. Eine weitere Idee wäre, im BxPC3 CD44-KD CEACAM7 zu co-targeten, um zu untersuchen, ob dadurch *in vivo* ein Phänotyp entsteht.

Nähere Analysen zur Anreicherung von Genclustern im Transkriptom von PaCa5061 s.c. haben uns gezeigt, dass vor allem viele Gene, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind, im CD44-KD heraufreguliert sind. Auch Gene für Zelladhäsion, Motilität oder Zellkontakten sind gesteigert im KD. Das brachte uns dazu, in den Xenografttumoren mittels immunhistochemischer Nachweise verschiedener EZM-Komponenten nachzuprüfen, ob sich dies auch auf Proteinebene widerspiegelt. Dabei ist uns aufgefallen, dass Kollagen I und Laminin V in den gesamten CD44-KD Tumoren gesteigert vorhanden ist, während für Fibronectin und Hyaluronsäure jeweils nur im Tumorzentrum ein erhöhtes Level nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Anreicherung von EZM-Komponenten in den CD44-KD Tumoren könnte eine gestörte Regulation der EZM-Synthese durch das Fehlen von CD44 auf der Tumorzell-Oberfläche sein. Falls die Produktion der EZM durch Interaktionen zwischen CD44 und EZM-Komponenten selbst gesteuert werden sollte, könnte der Wegfall dieser Interaktionen zu einem Verlust der Kontrolle über die produzierte EZM-Menge und folglich zu einer gesteigerten Anreicherung führen. Auch in den Transkriptomdaten konnten wir übereinstimmende Heraufregulationen für viele Kollagene und Laminine, aber auch Fibronectin und eine Hyaluronansynthese finden. In den Transkriptomdatensätzen der anderen Xenograftmodelle konnten wir bis auf ein Kollagen, das in BxPC3 s.c. im KD erhöht ist, keine solche Veränderung der EZM sehen. Es wäre aber

sinnvoll auch die anderen Xenograftmodelle noch auf Proteinebene hinsichtlich der EZM-Komponenten zu analysieren, um zu beweisen, dass diese Änderungen dort nicht auftraten (wie die Transkriptomanalyse vermuten lässt). Anhand der Transkriptomanalyse der Zelllinien konnten wir bereits feststellen, dass *in vitro* eine Anreicherung von EZM-Komponenten im CD44-KD noch nicht vorhanden war, sondern scheinbar erst *in vivo* aufgetreten ist. Trotz der doch drastischen Zunahme von EZM-Komponenten im CD44-KD konnten wir jedoch keine allgemeine Zunahme von Stroma feststellen (Masson-Goldner). In einer Arbeit von Askan et al. wurde allerdings schon gezeigt, dass das Stroma in PDAC sich auch darin unterscheidet, wie dicht es im Tumor vorliegt, und nicht unbedingt darin, welche Fläche es einnimmt (Askan et al., 2021). In einem *in vitro*-Adhäsionsassay wollten wir schauen, ob die Tumorzellen mit CD44-KD auch stärker an die EZM-Komponenten binden. Im Fall von PaCa5061 ging die Bindungsfähigkeit an Laminin nach CD44-KD allerdings zurück, während bei BxPC3 der CD44-KD stärker an Kollagen und Fibronectin, der CD44v9-KD sogar zusätzlich noch stärker an Laminin binden konnte. Überraschend gab es überhaupt keinen Effekt der CD44-KDs an Hyaluronan, obwohl es sich dabei um den Hauptliganden von CD44 handelt. Insgesamt war die Bindung allerdings auch eher gering, was an der lediglich zweidimensionalen Orientierung im Versuchsaufbau liegen könnte und eventuell noch weiterer Etablierungsarbeit bedarf. Die Ergebnisse waren allgemein nicht plausibel in Bezug auf die vorher beobachtete Zunahme der EZM *in vivo*. Andererseits muss die Produktion der EZM auch nicht unmittelbar verknüpft sein mit deren Bindung, zumal sich die Zellen unter diesen unphysiologischen 2D-*in vitro* Bedingungen wahrscheinlich grundsätzlich unterscheiden zu den *in vivo* gewachsenen Tumorzellen. Zudem muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die EZM-Komponenten nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den benachbarten murinen Stromazellen produziert wurden und dass diese parakrin auf die CD44-Depletion der Tumorzellen mit einer veränderten Produktion/ Sekretion der EZM-Komponenten reagiert haben könnten. Die eingesetzten Antikörper waren laut Herstellerangaben zwar human-spezifisch, doch Kreuzreaktivitäten mit murinen Epitopen können nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Hier wäre außerdem interessant zu untersuchen, ob sich die Anzahl muriner Fibroblasten in den s.c. PaCa5061 Tumoren nach CD44-KD geändert hat (z.B. mithilfe von Färbungen für murines Vimentin).

Der Umbau der EZM, aber auch CD44 selbst, haben laut Literatur Einfluss auf biologische Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder Angiogenese während der Tumorprogression (Edderkaoui et al., 2007; Ghura et al., 2021; Nissen et al., 2021; Siddhartha and Garg, 2023; Vaquero et al., 2003; Wang et al., 2021). In unseren Analysen zur Proliferation konnten wir im 2D *in vitro*-Assay bei PaCa5061 shCD44 eine verringerte Proliferation beobachten, bei BxPC3 dagegen nicht, was sehr gut zu den Wachstumsunterschieden in unserem s.c.-Xenograftmodell passt. Der 3D *in vitro*-Proliferationsassay unter verankerungslosen

Wachstumsbedingungen zeigte in keiner der beiden Zelllinien einen Wachstumsnachteil im CD44-KD, was interessanterweise zu den i.p.-Xenograftmodellen passt, bei denen sich die Tumorzellen zunächst frei-schwimmend in der Peritonealflüssigkeit befinden, ohne von einer Matrix umgeben zu sein. Nicht übereinstimmend ist, dass BxPC3 in unserem 3D *in vitro*-Versuch überhaupt nicht proliferierte, während wir in den Tieren ein sehr schnelles Tumorstadium verzeichnen konnten. Zusätzlich zu den beiden panCD44-KDs haben unsere *in vitro*-Analysen auch die CD44v9-KDs miteingeschlossen, und zumindest in 2D sehen wir bei beiden Zelllinien eine verringerte Proliferation. Falls diese *in vitro*-Daten tatsächlich mit dem Wachstumsverhalten der Tumorzellen *in vivo* übereinstimmen sollten, wären die CD44v9-Derivate beider Zelllinien für zukünftige Studien im s.c.-Modell interessant. In den Xenografttumoren von PaCa5061 s.c. konnten wir mit immunhistochemischen Färbungen weder für Ki67 einen Unterschied in der Proliferation, noch mit  $\beta$ -Galaktosidase in der Seneszenz zwischen Kontrolle und CD44-KD feststellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass wir in diesem Überlebensversuch die Xenografttumoren nicht alle zum gleichen Zeitpunkt, sondern alle individuell nach Erreichen der Kriterien entnommen haben. Bei gleichzeitiger Entnahme wären die CD44-KD Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren noch kleiner gewesen und hätten eventuell Unterschiede für Proliferation und/oder Seneszenz gezeigt. In unserem Überlebensversuch hatten die CD44-KD Tumoren jedoch mehr Zeit und konnten sich den Kontrolltumoren dahingehend offenbar anpassen. Neben der Proliferation haben wir *in vitro* zudem noch auf die Überlebensfähigkeit (Viabilität) der Zellen in 3D-Wachstumsbedingungen geschaut, einmal mit umgebender Matrix (wie im s.c.-Modell) und einmal ohne umgebende Matrix (wie im i.p.-Modell). In beiden Versuchsansätzen zeigte der CD44-KD von PaCa5061 keinen Unterschied, bei BxPC3 hingegen war der CD44-KD in beiden Ansätzen viabler. Auch hier haben wir darüber hinaus die CD44v9-KDs mitgetestet. Bei PaCa5061 ergab sich daraus ein verbessertes Überleben im KD ohne Matrix, bei BxPC3 sah man mit und ohne Matrix keine verbesserte Überlebensfähigkeit des KDs. Ob diese *in vitro*-Analysen zur Überlebensfähigkeit auf das *in vivo* Überleben der Tumorzellen zu übertragen sind, ist fraglich. Man kann aber sagen, dass in der Zelllinie, wo es ein langsames Tumorstadium *in vivo* gab, die Zellen *in vitro* nicht schlechter überlebensfähig sind. In der Zelllinie, wo die Xenografttumoren nicht langsamer wachsen, konnte hingegen *in vitro* ein verbessertes Überleben nachgewiesen werden. Anhand von 3D-Viabilitätsassays mit oder ohne Matrix-Umgebung ließ sich in diesem Versuch also nicht vorhersagen, ob *in vivo* ein Wachstumsvor- oder -nachteil besteht.

Ganz anders sah dies beim Apoptose-Nachweis nach 3D-Wachstum aus: hier zeigte sich eine deutliche Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen in beiden KDs von PaCa5061, von denen der getestete pan-CD44-KD auch *in vivo* schlechter wuchs. Bei BxPC3 gab es dagegen im CD44-KD keinen Unterschied zur Kontrolle, im CD44v9-KD immerhin einen Anstieg der

früh- und eine Tendenz zu mehr spät-apoptotischen Zellen. Auch das könnte für einen möglichen Tierversuch mit den CD44v9-KDs sprechen und erklärt möglicherweise, weshalb mit dem pan-CD44-KD bei BxPC3 *in vivo kein* Unterschied auftrat. Mit der Färbung der Xenografttumoren mit dem Apoptose-Marker cleaved Caspase-3 konnten wir jedoch keinen Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen zwischen CD44-KD und Kontrolle bei PaCa5061 s.c. festmachen. Um das genauer zu analysieren, haben wir von den Xenografttumoren außerdem einen qRT-PCR Array zur Identifizierung regulierter Zelltod-assoziiierter Gene durchgeführt. Die einzigen signifikant heraufregulierten Gene waren hier *BIRC3* und *FAS*. *BIRC3* kodiert für ein Protein, welches unter anderem anti-apoptotische Fähigkeiten besitzt (Frazzi, 2021). Von *FAS* hingegen ist bekannt, dass es eine Todesdomäne beinhaltet und eine Rolle für die Induktion des programmierten Zelltods spielt (Mondal et al., 2023). Diese Heraufregulation könnte ein Anzeichen von vermehrtem NK-Zell vermittelten Zelltod sein, da dieser Immunzelltyp FAS-Ligand-positiv ist und bei Bindung an FAS Apoptose auslöst (Chua et al., 2004). Eine vermehrte Anwesenheit von NK-Zellen im CD44-KD unseres Xenograftmodells könnte man mit NK-Zell-spezifischen Marker immunhistologisch testen. Sollte dies der Fall sein, könnte man in einem nächsten Schritt die PaCa5061 Kontroll- und CD44-KD-Zellen in NSG-Mäuse injizieren, um zu schauen, ob das verringerte Tumorstadium mit CD44-KD-Zellen auch in NSG-Mäusen auftritt. NSG-Mäuse besitzen keine NK-Zellen, sodass man so einen potenziellen Einfluss der NK-Zellen auf die Apoptose ausschließen könnte. Den Einfluss von *BIRC3* auf das Tumorstadium könnte man testen, indem man dem anti-apoptotischen-Pathway mit einer shRNA gegen *BIRC3* entgegenwirkt. Wir konnten also zwei Apoptose-assoziierte Gene identifizieren, die entgegengesetzte Funktionen erfüllen. Dies ist sehr gut passend zu den nicht unterschiedlichen Anteilen von cleaved Caspase 3-positiven Tumorzellen in den ausgewachsenen Xenografttumoren. Berücksichtigt man die vermehrte Apoptose nach 3D-Wachstum dieser Zellen, könnte während des verzögerten Auswachsens der CD44-KD-Zellen im s.c. PaCa5061 Xenograft eine „Resistenz“- oder Toleranzentwicklung gegen anfangs vorhandene pro-apoptotische Stimuli (möglicherweise über die Heraufregulation von *BIRC3*) passiert sein.

Sowohl die *in silico* Analysen mittels TCGA Datenbank, als auch unsere Befunde zu CD44 im TMA von PDAC Patient:innen, lassen darauf schließen, dass vor allem die varianten CD44-Isoformen 1-3 eine entscheidende Rolle im Pankreaskarzinom spielen. Diese drei Isoformen sind als einzige CD44-Isoformen in uni- und multivariaten Analysen im PDAC prognostisch und korrelieren, im Gegensatz zu Isoform 4, auch nicht mit Stroma- und Immunzellen. Interessanterweise zeigte eine DEG-Analyse der 25 % am stärksten bzw. schwächsten durch CD44-Isoformen regulierten Gene bei PDAC Patient:innen eine nahezu vollständige diskordante Genregulation zwischen den Isoformen 1-3 vs. Isoform 4. Möglicherweise ist diese gegensätzliche Regulation der Gene Grund dafür, dass wir in drei unserer vier

Xenograftmodelle so gut wie keine DEGs zwischen shControl und shCD44 finden konnten. Einzig im PaCa5061 s.c.-Modell konnten wir einhergehend mit einer hohen Anzahl an DEGs auch einen Phänotyp (längeres Überleben durch langsames Tumorwachstum) beobachten. Es ist denkbar, dass in diesem Modell durch den CD44-KD eine „Störung“ der Gegenregulation von Isoform 1-3 und Isoform 4 regulierten Genen entstand, und sich so ein Phänotyp ausbilden konnte.

Unsere Befunde deuten klar darauf hin, dass die Stroma- und Immunzellen vorrangig Isoform 4 exprimieren, so wurden sie auch nur vom pan-CD44-Ak, nicht aber von den Antikörpern gegen variante Exons angefärbt. Auch die Zellen des Normalgewebes exprimieren laut Literatur hauptsächlich Isoform 4 bzw. die CD44-Standardisoform, können aber zum Beispiel im Zuge von Leukozytenauswanderung während inflammatorischer Prozesse über Zytokinausschüttung ein Isoform-Switching vollziehen und somit ihre Eigenschaften gewebespezifischen Funktionen anpassen („Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans,” 1994). Einige Normalgewebe, vor allem solche epithelialen Ursprungs wie auch das Pankreas, exprimieren zudem variante CD44-Isoformen (vor allem CD44v9), um ihre spezifischen Funktionen ausführen zu können. Auch in dem hier eingesetzten TMA wurden Pankreas-Normalgewebe teils sehr deutlich mit dem pan-CD44- und dem CD44v9-Ak angefärbt.

Die Tatsache, dass wir in den TMAs verschiedene Kombinationen von positiv gefärbten Exonvarianten gefunden haben, erscheint zunächst nicht immer plausibel, wenn man davon ausgeht, dass die Exons bei der Transkription seriell gespleißt werden. Wenn man aber sieht, dass es Fälle gibt, die zwar für CD44v3 positiv sind, aber nicht für CD44v9, spricht das dafür, dass hier Exon-Skipping stattgefunden hat. Exon-Skipping kommt bei CD44 relativ häufig vor und trägt zu noch weiteren, noch nicht ganz entschlüsselten Isoformen bei (Batsché et al., 2021; Fukushima et al., 2020; Maltseva and Tonevitsky, 2023). Eine weitere, bereits oben diskutierte Erklärung könnte sein, dass unser Antikörper gegen CD44v3 sehr sensitiv, aber nicht besonders spezifisch war, sodass schwach CD44-exprimierende Tumorzellen mit anti-CD44v3 erkannt wurden, jedoch nicht mit anti-CD44v9. Ebenso Fälle, die für CD44v3 und CD44v6 positiv sind, aber nicht mit dem pan-spezifischen CD44-Antikörper angefärbt werden konnten, erscheinen zunächst nicht plausibel. PanCD44 bindet ein Epitop innerhalb der konstanten Exons im extrazellulären Teil von CD44, und sollte, so verspricht es der Name, alle Isoformen erkennen. Wie wir bereits in der Übersicht zu den Isoformen gesehen haben (Abb. 2), gibt es auch Ausnahmen wie Isoform 5, bei der auch die konstanten Exons der extrazellulären Domäne herausgespleißt werden können. Es ist also durchaus vorstellbar, dass in diesen betrachteten Fällen Isoformen exprimiert wurden, an die der Antikörper nicht binden kann, da Teile der konstanten Exons fehlen. Es wäre auch möglich, dass hier der

Antikörper nicht binden kann, obwohl die Exons exprimiert werden, aber das Protein eventuell seine Konformation geändert hat, oder auch weitere posttranslationale Modifikationen stattgefunden haben, die eine Bindung sterisch verhindern.

Nach Assoziations-Analysen der erhobenen Färbescores des TMAs mit den korrespondierenden Basischarakteristika der PDAC-Patient:innen fiel auf, dass scheinbar ein Zusammenhang zwischen den Färbeintensitäten mit Antikörpern gegen CD44v3 bzw. CD44v6 und dem Grading (Grad an De-Differenzierung) der Patient:innen bestand. Dieser Befund passt zu der prognostischen Bedeutung der CD44 Isoformen 1 und 2 aus der TCGA-Analyse, da Tumoren umso aggressiver sind, je mehr sie ihre ursprünglichen Eigenschaften und damit auch Gewebe-spezifische Differenzierung verlieren.

Zusammengenommen kann man sagen, dass die CD44-Isoformen 1-3 in PDAC Patient:innen prognostisch bedeutsam sind. In unserem Zelllinien-basierten Xenograftmodell konnten wir nach panCD44-Depletion deutliche Änderungen im Überleben, der transkriptionellen Genregulation und in der Zusammensetzung vom Stroma beobachten. Für weitere Untersuchungen wäre es interessant zu schauen, welche distinkten funktionellen Effekte Isoform-spezifische KDs haben.

## 5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom, das für seine Aggressivität und schlechte Prognose bekannt ist, stellt eine große Herausforderung in der Onkologie dar. CD44, ein multifunktionales Zelloberflächenprotein, und seine Isoformen haben sich als potenzielle Schlüsselfaktoren für das Fortschreiten des Pankreaskarzinoms erwiesen, insbesondere bei der Metastasierung. Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des komplexen Zusammenspiels zwischen CD44-Isoformen, Tumorwachstum und Metastasierung und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix. In Pankreaskarzinom-Xenograftmodellen wurden die Auswirkungen einer CD44-Depletion auf Tumorwachstum und Metastasierung untersucht und durch *in vitro*-Analysen ergänzt. Dazu wurden die beiden humanen Zelllinien PaCa5061 und BxPC3 lentiviral transduziert, um stabile shRNA-vermittelte CD44-KDs zu generieren. Umfangreiche Untersuchungen zur Identifizierung der CD44-Isoformen zeigten in beiden Zelllinien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* prädominante Expressionen der Isoformen 1-3. Ausschließlich in den s.c.-injizierten PaCa5061-Xenografts zeigte sich nach CD44-KD ein langsames Tumorwachstum und damit ein verlängertes Überleben. Im Transkriptom dieser s.c. PaCa5061 Tumoren konnte eine deutliche Anreicherung von regulierten Genen im CD44-KD entdeckt werden, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix kodieren oder im Zusammenhang mit deren Umbau stehen, ebenso wie Gene, die an Zelladhäsion, Zellkontakten oder Zellmotilität beteiligt sind. Durch immunhistochemische Färbungen konnte eine Anreicherung von Matrixbestandteilen im CD44-KD auf Proteinebene bestätigt werden. Weitere immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Proliferation, Apoptose und Angiogenese zeigten in den s.c. Xenografttumoren von PaCa5061 allerdings keine Unterschiede, was möglicherweise im Zuge des verlangsamten Auswachsens der Tumoren zu einer bestimmten Größe verschleiert wurde. *In vitro*-Analysen zeigten unter 2D-Bedingungen eine verringerte Proliferation beim CD44-KD von PaCa5061, aber keinen Unterschied bei BxPC3. Außerdem konnte man beim CD44-KD von PaCa5061 eine Erhöhung apoptotischer und nekrotischer Zellen beobachten, bei BxPC3 hingegen eine Steigerung der Überlebensfähigkeit im CD44-KD. Auch eine verringerte Adhäsion von PaCa5061 CD44-KD an Laminin, aber eine vermehrte Bindung von BxPC3 CD44-KD an Kollagen und Fibronectin zeigte unterschiedliche funktionelle Effekte des CD44-KDs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die CD44-KDs beider Zelllinien bereits *in vitro* deutlich durch ihre molekularen Eigenschaften in Bezug auf das Tumorwachstum unterscheiden und erste Hinweise auf potenzielle Mechanismen für die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms *in vivo* geben könnten. Mittels TCGA-Datenbankanalyse konnten die CD44 Isoformen 1-3 als prognostisch relevant für das Pankreaskarzinom identifiziert werden. Ein TMA von Pankreaskarzinom-Patient:innen hat außerdem eine Korrelation zwischen CD44v3 und CD44v6 sowie zwischen panCD44 und CD44v9 zeigen können.

## 5 Abstract

Pancreatic cancer, known for its aggressiveness and poor prognosis, represents a major challenge in oncology. CD44, a multifunctional cell surface protein, and its isoforms have been shown to be potential key factors in the progression of pancreatic cancer, particularly in metastasis. This work focuses on investigating the complex interplay between CD44 isoforms, tumor growth/ metastasis dynamics and interactions with the extracellular matrix in pancreatic cancer.

The effects of CD44 depletion on tumor growth and metastasis were investigated in pancreatic cancer xenograft models. For this purpose, the two human cell lines PaCa5061 and BxPC3 were lentivirally transduced to generate stable shRNA-mediated CD44-KDs. Extensive studies to identify the CD44 isoforms showed predominant expression of isoforms 1-3 in both cell lines both *in vitro* and *in vivo*. Only s.c.-injected PaCa5061 showed slower tumor growth and thus prolonged survival after CD44-KD. In the transcriptome of these PaCa5061 s.c. tumors, a significant enrichment of regulated genes in CD44-KD was detected that encode components of the extracellular matrix or are related to its remodeling, as well as genes involved in cell adhesion, cell junctions or motility. Immunohistochemical staining confirmed an enrichment of matrix components in the CD44-KD at the protein level. However, further immunohistochemical stainings to detect proliferation, apoptosis and angiogenesis showed no differences in the PaCa5061 s.c. xenograft tumors, which may have been hidden during the delayed outgrowth of the tumors to a certain size.

*In vitro* analyses showed reduced proliferation in CD44-KD of PaCa5061 under 2D conditions, but no difference in BxPC3. In addition, an increase in apoptotic and necrotic cells was observed in the CD44-KD of PaCa5061, whereas an increase in viability was observed in the CD44-KD of BxPC3. Also, decreased adhesion of PaCa5061 CD44-KD to laminin but increased binding of BxPC3 CD44-KD to collagen and fibronectin shows different functional effects of CD44-KD. These results indicate that the CD44-KDs of both cell lines already differ significantly *in vitro* by their molecular properties in relation to tumor growth and may provide first clues to potential mechanisms for pancreatic cancer tumor progression *in vivo*. Using TCGA database analysis, CD44 isoforms 1-3 were identified as prognostically relevant for pancreatic cancer. A TMA of pancreatic cancer patients also showed a correlation between CD44v3 and CD44v6, while panCD44 correlated with CD44v9.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 3</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD44	<i>Cluster of differentiation-44</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CEACAM7	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7</i>
CP	<i>Crossing point</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
DEG	<i>Differentially expressed gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HABP	<i>Hyaluronic acid binding protein</i>
HAS3	Hyaluronan Synthase 3
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
H-CAM	<i>Homing Cell Adhesion Molecule</i>
HCELL	<i>Hematopoietic Cell E- And L-Selectin Ligand</i>
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC-70	Hitzeschockprotein-70
IHC	Immunhistochemie
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IP-Karzinose	Intraperitonealkarzinose
IVC	Individually ventilated cages
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NES	<i>Normalized enrichment score</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSG	<i>NOD SCID Gamma Mouse</i>
ORA	<i>Over-representation analysis</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
Pfp/Rag2	<i>Perforin-Knockout/Recombinant activating gene 2-Knockout</i>
PVDF	Polyvenylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitations-Puffer
s.c.	<i>subcutaneous</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
sLeA	Sialyl-Lewis A
sLeX	Sialyl-Lewis X
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
ü.N.	Über Nacht

## 7 Literaturverzeichnis

- Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L.B., Bateman, A.C., Conti, J.A., Fine, D.R., Johnson, C.D., Benyon, R.C., Iredale, J.P., 2004. Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 7427–7437. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0825>
- Askan, G., Sahin, I.Halil., Chou, J.F., Yavas, A., Capanu, M., Iacobuzio-Donahue, C.A., Basturk, O., O'Reilly, E.M., 2021. Pancreatic cancer stem cells may define tumor stroma characteristics and recurrence patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 21, 385. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08123-w>
- Avula, L.R., Hagerty, B., Alewine, C., 2020. Molecular mediators of peritoneal metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev* 39, 1223–1243. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09924-4>
- Azevedo, R., Gaiteiro, C., Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Lima, L., Santos, L.L., Ferreira, J.A., 2018. CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications. *Clinical Proteomics* 15, 22. <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9198-9>
- Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Caffery, T., Ouellette, M.M., Hollingsworth, M.A., 2008. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14, 5995–6004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0291>
- Batsché, E., Yi, J., Mauger, O., Kornobis, E., Hopkins, B., Hanmer-Lloyd, C., Muchardt, C., 2021. CD44 alternative splicing senses intragenic DNA methylation in tumors via direct and indirect mechanisms. *Nucleic Acids Res* 49, 6213–6237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab437>
- Bendas, G., Borsig, L., 2012. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int J Cell Biol* 2012, 676731. <https://doi.org/10.1155/2012/676731>
- Biddle, A., Gammon, L., Fazil, B., Mackenzie, I.C., 2013. CD44 staining of cancer stem-like cells is influenced by down-regulation of CD44 variant isoforms and up-regulation of the standard CD44 isoform in the population of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One* 8, e57314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057314>
- Bisht, S., Nigam, M., Kunjwal, S.S., Sergey, P., Mishra, A.P., Sharifi-Rad, J., 2022. Cancer Stem Cells: From an Insight into the Basics to Recent Advances and Therapeutic Targeting. *Stem Cells Int* 2022, 9653244. <https://doi.org/10.1155/2022/9653244>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cannon, A., Thompson, C., Hall, B.R., Jain, M., Kumar, S., Batra, S.K., 2018. Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: insight into pathological function and therapeutic potential. *Genes Cancer* 9, 78–86. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.171>
- Catenacci, D.V.T., Junttila, M.R., Karrison, T., Bahary, N., Horiba, M.N., Nattam, S.R., Marsh, R., Wallace, J., Kozloff, M., Rajdev, L., Cohen, D., Wade, J., Sleckman, B., Lenz, H.-J., Stiff, P., Kumar, P., Xu, P., Henderson, L., Takebe, N., Salgia, R., Wang, X., Stadler, W.M., de Sauvage, F.J., Kindler, H.L., 2015. Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *JCO* 33, 4284–4292. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.8719>
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., Freeman, J.W., 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 11, 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- Chen, C., Zhao, S., Zhao, X., Cao, L., Karnad, A., Kumar, A.P., Freeman, J.W., 2022. Gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells is mediated by IGF1R dependent upregulation of CD44 expression and isoform switching. *Cell Death Dis* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05103-1>

- Chen, Shaoyong, Zhang, S., Chen, Shaohua, Ma, F., 2023. The prognostic value and immunological role of CD44 in pan-cancer study. *Sci Rep* 13, 7011. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34154-3>
- Chua, H.L., Serov, Y., Brahmi, Z., 2004. Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum Immunol* 65, 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.01.004>
- 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, 44–53. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00606.x>
- Cotran, R.S., Karnovsky, M.J., 1968. ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON THE PERMEABILITY OF THE MESOTHELIUM TO HORSERADISH PEROXIDASE. *J Cell Biol* 37, 123–138.
- Dhasmana, A., Dhasmana, S., Kotnala, S., Laskar, P., Khan, S., Haque, S., Jaggi, M., Yallapu, M.M., Chauhan, S.C., 2024. CEACAM7 expression contributes to early events of pancreatic cancer. *Journal of Advanced Research* 55, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.02.013>
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
- 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, 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Durko, L., Wlodarski, W., Stasikowska-Kanicka, O., Wagrowska-Danilewicz, M., Danilewicz, M., Hogendorf, P., Strzelczyk, J., Malecka-Panas, E., 2017. Expression and Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD24, CD44, and CD133 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. *Disease Markers* 2017, e3276806. <https://doi.org/10.1155/2017/3276806>
- Edderkaoui, M., Hong, P., Lee, J.K., Pandol, S.J., Gukovskaya, A.S., 2007. Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Mediates the Prosurvival Effect of Fibronectin \*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26646–26655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702836200>
- Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans, 1994. *J Cell Biol* 124, 71–82.
- Fidler, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Frazzi, R., 2021. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. *Cell Biosci* 11, 8. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00521-0>
- Fukushima, S., Farea, M., Maeta, K., Rani, A.Q.M., Fujioka, K., Nishio, H., Matsuo, M., 2020. Dual Fluorescence Splicing Reporter Minigene Identifies an Antisense Oligonucleotide to Skip Exon v8 of the CD44 Gene. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 9136. <https://doi.org/10.3390/ijms21239136>
- Gao, F., Zhang, G., Liu, Y., He, Y., Sheng, Y., Sun, X., Du, Y., Yang, C., 2022. Activation of CD44 signaling in leader cells induced by tumor-associated macrophages drives collective detachment in luminal breast carcinomas. *Cell Death Dis* 13, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04986-4>
- Garantziotis, S., Savani, R.C., 2019. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol* 78–79, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.02.002>
- 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<sup>-/-</sup>/rag2<sup>-/-</sup> mice. *Gut* 62, 741–750. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300629>

- Genes for Homo sapiens (human) [WWW Document], n.d. . NCBI. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/id/960/products/> (accessed 4.17.24).
- Ghura, H., Keimer, M., von Au, A., Hackl, N., Klemis, V., Nakchbandi, I.A., 2021. Inhibition of fibronectin accumulation suppresses TUMOR growth. *Neoplasia* 23, 837–850. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.06.012>
- Giraud, J., Seeneevassen, L., Rousseau, B., Bourriez, D., Sifré, E., Giese, A., Nguyen, T.L., Tiffon, C., Lippi, Y., Azzi-Martin, L., Pannequin, J., Ménard, A., Bessède, E., Staedel, C., Mégraud, F., Belleannée, G., Lehours, P., Gronnier, C., Dubus, P., Varon, C., 2023. CD44v3 is a marker of invasive cancer stem cells driving metastasis in gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 26, 234–249. <https://doi.org/10.1007/s10120-022-01357-y>
- Govindaraju, P., Todd, L., Shetye, S., Monslow, J., Puré, E., 2019. CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix Biol* 75–76, 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.06.004>
- Gupta, G.P., Massagué, J., 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127, 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- Hibino, S., Shibuya, M., Hoffman, M., Engbring, J., Hossain, R., Mochizuki, M., Kudoh, S., Nomizu, M., Kleinman, H., 2005. Laminin 5 Chain Metastasis- and Angiogenesis-Inhibiting Peptide Blocks Fibroblast Growth Factor 2 Activity by Binding to the Heparan Sulfate Chains of CD44. *Cancer research* 65, 10494–501. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0314>
- Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhr, J.-M., Neoptolemos, J., Real, F.X., Van Laethem, J.-L., Heinemann, V., 2015. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology* 15, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2014.10.001>
- Hosein, A.N., Brekken, R.A., Maitra, A., 2020. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 487–505. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0300-1>
- Hou, W., Kong, L., Hou, Z., Ji, H., 2022. CD44 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer. *BMC Med Genomics* 15, 225. <https://doi.org/10.1186/s12920-022-01383-w>
- HSU, C.-P., LEE, L.-Y., HSU, J.-T., HSU, Y.-P., WU, Y.-T., WANG, S.-Y., YEH, C.-N., CHEN, T.-C., HWANG, T.-L., 2018. CD44 Predicts Early Recurrence in Pancreatic Cancer Patients Undergoing Radical Surgery. *In Vivo* 32, 1533–1540. <https://doi.org/10.21873/invivo.11411>
- Hsu, S.-K., Jadhao, M., Liao, W.-T., Chang, W.-T., Hung, C.-T., Chiu, C.-C., 2022. Culprits of PDAC resistance to gemcitabine and immune checkpoint inhibitor: Tumour microenvironment components. *Front. Mol. Biosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1020888>
- Increased CD44s and decreased CD44v6 RNA expression are associated with better survival in myxofibrosarcoma patients: a pilot study [WWW Document], n.d. . [springermedizin.de](https://www.springermedizin.de/increased-cd44s-and-decreased-cd44v6-rna-expression-are-associat/9685326). URL <https://www.springermedizin.de/increased-cd44s-and-decreased-cd44v6-rna-expression-are-associat/9685326> (accessed 4.14.24).
- Ishiwata, T., n.d. Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods.
- Janiszewska, M., Primi, M.C., Izard, T., 2020. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem* 295, 2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007759>
- Jin, C., Bai, L., 2020. Pancreatic Cancer: Current Situation and Challenges. *Gastroenterology & Hepatology Letters* 2, 1–3. <https://doi.org/10.18063/ghl.v2i1.243>
- Jinno, N., Yoshida, M., Hayashi, K., Naitoh, I., Hori, Y., Natsume, M., Kato, A., Kachi, K., Asano, G., Atsuta, N., Sahashi, H., Kataoka, H., 2021. Autotaxin in ascites promotes peritoneal dissemination in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 112, 668–678. <https://doi.org/10.1111/cas.14689>
- Kalinina, T., Güngör, C., Thieltges, S., Möller-Krull, M., Penas, E.M.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>
- Kim, H.J., Kim, M.-J., Ahn, S.H., Son, B.H., Kim, S.B., Ahn, J.H., Noh, W.C., Gong, G., 2011. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *The Breast* 20, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2010.08.001>
- Kim, S.J., Owen, S.C., 2020. Hyaluronic acid binding to CD44S is indiscriminate of molecular weight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862, 183348. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183348>
- Klingbeil, P., Marhaba, R., Jung, T., Kirmse, R., Ludwig, T., Zöller, M., 2009. CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance. *Mol Cancer Res* 7, 168–179. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0207>
- 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, 602–609. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605492>
- Lange, T., Valentiner, U., Wicklein, D., Maar, H., Labitzky, V., Ahlers, A.-K., Starzonek, S., Genduso, S., Staffeldt, L., Pahlow, C., Dück, A.-M., Stürken, C., Baranowsky, A., Bauer, A.T., Bulk, E., Schwab, A., Riecken, K., Börnchen, C., Kiefmann, R., Abraham, V., DeLisser, H.M., Gemoll, T., Habermann, J.K., Block, A., Pantel, K., Schumacher, U., 2022. Tumor cell E-selectin ligands determine partialefficacy of bortezomib on spontaneous lung metastasis formation of solid human tumors in vivo. *Mol Ther* 30, 1536–1552. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.01.017>
- Lee, C.J., Dosch, J., Simeone, D.M., 2008. Pancreatic Cancer Stem Cells. *JCO* 26, 2806–2812. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6702>
- Leonhardt, L., Hebrok, M., 2024. KRAS degradation averts PDAC chemoresistance. *Nat Cancer* 5, 375–377. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00708-7>
- Li, X.-P., Zhang, X.-W., Zheng, L.-Z., Guo, W.-J., 2015. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 6724–6731.
- Li, Zhonghu, Chen, K., Jiang, P., Zhang, X., Li, X., Li, Zhihua, 2014. CD44v/CD44s expression patterns are associated with the survival of pancreatic carcinoma patients. *Diagn Pathol* 9, 79. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-79>
- López, J.C., Ielpo, B., Iglesias, M., Pinilla, F.B., Sánchez-Velázquez, P., 2024. The impact of vascular margin invasion on local recurrence after pancreatoduodenectomy in pancreatic adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 409, 122. <https://doi.org/10.1007/s00423-024-03301-3>
- Maltseva, D., Tonevitsky, A., 2023. RNA-binding proteins regulating the CD44 alternative splicing. *Front. Mol. Biosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1326148>
- Matzke-Ogi, A., Jannasch, K., Shatirishvili, M., Fuchs, B., Chiblak, S., Morton, J., Tawk, B., Lindner, T., Sansom, O., Alves, F., Warth, A., Schwager, C., Mier, W., Kleeff, J., Ponta, H., Abdollahi, A., Orian-Rousseau, V., 2016. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling. *Gastroenterology* 150, 513-525.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.020>
- Merika, E.E., Syrigos, K.N., Saif, M.W., 2012. Desmoplasia in Pancreatic Cancer. *Can We Fight It? Gastroenterol Res Pract* 2012, 781765. <https://doi.org/10.1155/2012/781765>
- Mizrahi, J.D., Surana, R., Valle, J.W., Shroff, R.T., 2020. Pancreatic cancer. *Lancet* 395, 2008–2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0)
- Molejon, M.I., Tellechea, J.I., Loncle, C., Gayet, O., Gilabert, M., Duconseil, P., Lopez-Millan, M.B., Moutardier, V., Gasmi, M., Garcia, S., Turrini, O., Ouaisi, M., Poizat, F., Dusetti, N., Iovanna, J., 2015. Deciphering the cellular source of tumor relapse identifies CD44 as a major therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget* 6, 7408–7423.

- Mondal, T., Gaur, H., Wamba, B.E.N., Michalak, A.G., Stout, C., Watson, M.R., Aleixo, S.L., Singh, A., Condello, S., Faller, R., Leiserowitz, G.S., Bhatnagar, S., Tushir-Singh, J., 2023. Characterizing the regulatory Fas (CD95) epitope critical for agonist antibody targeting and CAR-T bystander function in ovarian cancer. *Cell Death Differ* 30, 2408–2431. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01229-7>
- Morgan, R.T., Woods, L.K., Moore, G.E., Quinn, L.A., McGavran, L., Gordon, S.G., 1980. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 25, 591–598. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910250507>
- Naor, D., Sionov, R.V., Ish-Shalom, D., 1997. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71, 241–319. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60101-3)
- Naor, D., Wallach-Dayana, S.B., Zahalka, M.A., Sionov, R.V., 2009. CHAPTER 8 - Involvement of CD44, a Molecule with a Thousand Faces, in Cancer Dissemination, in: Stern, R. (Ed.), *Hyaluronan in Cancer Biology*. Academic Press, San Diego, pp. 127–146. <https://doi.org/10.1016/B978-012374178-3.10008-0>
- Nehmann, N., Wicklein, D., Schumacher, U., Müller, R., 2010. 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* 112, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.05.004>
- Nissen, N.I., Kehlet, S., Johansen, A.Z., Chen, I.M., Karsdal, M., Johansen, J.S., Diab, H.M.H., Jørgensen, L.N., Sun, S., Manon-Jensen, T., He, Y., Langholm, L., Willumsen, N., 2021. Noninvasive prognostic biomarker potential of quantifying the propeptides of Type XI collagen alpha-1 chain (PRO-C11) in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 149, 228–238. <https://doi.org/10.1002/ijc.33551>
- Oberstein, P.E., Olive, K.P., 2013. Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therap Adv Gastroenterol* 6, 321–337. <https://doi.org/10.1177/1756283X13478680>
- O'Reilly, E.M., Oh, D.-Y., Dhani, N., Renouf, D.J., Lee, M.A., Sun, W., Fisher, G., Hezel, A., Chang, S.-C., Vlahovic, G., Takahashi, O., Yang, Y., Fitts, D., Philip, P.A., 2019. Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* 5, 1431–1438. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1588>
- Orian-Rousseau, V., 2015. CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol* 6, 154. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00154>
- Peiper, M., Sato, T., Zurakowski, D., Eisenberger, C., Heinecke, A., Hosch, S., Knoefel, W.T., 2004. CD44s Expression is Associated with Improved Survival in Soft Tissue Sarcoma. *Anticancer Research* 24, 1053–1056.
- Peng, Y.-P., Zhang, J.-J., Liang, W., Tu, M., Lu, Z.-P., Wei, J.-S., Jiang, K.-R., Gao, W.-T., Wu, J.-L., Xu, Z.-K., Miao, Y., Zhu, Y., 2014. Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction. *BMC Cancer* 14, 738. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-738>
- 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, 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>
- Quiñonero, F., Mesas, C., Doello, K., Cabeza, L., Perazzoli, G., Jimenez-Luna, C., Rama, A.R., Melguizo, C., Prados, J., 2019. The challenge of drug resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma: a current overview. *Cancer Biol Med* 16, 688–699. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0252>
- Ramanathan, R.K., McDonough, S.L., Philip, P.A., Hingorani, S.R., Lacy, J., Kortmanský, J.S., Thumar, J., Chiorean, E.G., Shields, A.F., Behl, D., Mehan, P.T., Gaur, R., Seery, T., Guthrie, K.A., Hochster, H.S., 2019. Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic

- Adenocarcinoma: SWOG S1313. *J Clin Oncol* 37, 1062–1069.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.18.01295>
- Rawla, P., Sunkara, T., Gaduputi, V., 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* 10, 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Rodríguez-Rodríguez, L., Sancho-Torres, I., Mesonero, C., Gibbon, D.G., Shih, W.J., Zotalis, G., 2003. The CD44 receptor is a molecular predictor of survival in ovarian cancer. *Med Oncol* 20, 255–263. <https://doi.org/10.1385/MO:20:3:255>
- Sahin, I.H., Askan, G., Hu, Z.I., O'Reilly, E.M., 2017. Immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma: an emerging entity? *Ann Oncol* 28, 2950–2961.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx503>
- Sangisetty, S.L., Miner, T.J., 2012. Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg* 4, 87–95.  
<https://doi.org/10.4240/wjgs.v4.i4.87>
- Schwankhaus, N., Gathmann, C., Wicklein, D., Riecken, K., Schumacher, U., Valentiner, U., 2014. Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clin Exp Metastasis* 31, 483–496.  
<https://doi.org/10.1007/s10585-014-9643-8>
- Senbanjo, L.T., Chellaiah, M.A., 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* 5, 18.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- Shiozawa, Y., Nie, B., Pienta, K.J., Morgan, T.M., Taichman, R.S., 2013. Cancer Stem Cells and their Role in Metastasis. *Pharmacol Ther* 138, 285–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.014>
- Siddhartha, R., Garg, M., 2023. Interplay Between Extracellular Matrix Remodeling and Angiogenesis in Tumor Ecosystem. *Molecular Cancer Therapeutics* 22, 291–305.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0595>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 72, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Skoda, J., Hermanova, M., Loja, T., Nemeč, P., Neradil, J., Karasek, P., Veselska, R., 2016. Co-Expression of Cancer Stem Cell Markers Corresponds to a Pro-Tumorigenic Expression Profile in Pancreatic Adenocarcinoma. *PLOS ONE* 11, e0159255.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159255>
- Steeg, P.S., 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12, 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- Tonini, V., Zanni, M., 2021. Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. *World J Gastroenterol* 27, 5851–5889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i35.5851>
- Toole, B.P., Slomiany, M.G., 2008. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: Partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat* 11, 110–121.  
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2008.04.002>
- Tsubouchi, K., Minami, K., Hayashi, N., Yokoyama, Y., Mori, S., Yamamoto, H., Koizumi, M., 2017. The CD44 standard isoform contributes to radioresistance of pancreatic cancer cells. *J Radiat Res* 58, 816–826. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx033>
- Valastyan, S., Weinberg, R.A., 2011. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- Van Cutsem, E., Tempero, M.A., Sigal, D., Oh, D.-Y., Fazio, N., Macarulla, T., Hitre, E., Hammel, P., Hendifar, A.E., Bates, S.E., Li, C.-P., Hingorani, S.R., de la Fouchardiere, C., Kasi, A., Heinemann, V., Maraveyas, A., Bahary, N., Layos, L., Sahai, V., Zheng, L., Lacy, J., Park, J.O., Portales, F., Oberstein, P., Wu, W., Chondros, D., Bullock, A.J., HALO 109-301 Investigators, 2020. Randomized Phase III Trial of Pegvorhyaluronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 38, 3185–3194. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00590>
- Vaquero, E.C., Edderkaoui, M., Nam, K.J., Gukovsky, I., Pandol, S.J., Gukovskaya, A.S., 2003. Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and

- nonmitochondrial pathways. *Gastroenterology* 125, 1188–1202.  
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01203-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01203-4)
- Veröffentlichungsversion\_Fritz\_Benjamin\_20201023.pdf, n.d.
- Waern, J.M., Yuan, Q., Rüdrieh, U., Becker, P.D., Schulze, K., Strick-Marchand, H., Huntington, N.D., Zacher, B.J., Wursthorn, K., DiSanto, J.P., Guzman, C.A., Manns, M.P., Ott, M., Bock, M., 2012. Ectopic expression of murine CD47 minimizes macrophage rejection of human hepatocyte xenografts in immunodeficient mice. *Hepatology* 56, 1479–1488.  
<https://doi.org/10.1002/hep.25816>
- Wang, H., Ren, R., Yang, Z., Cai, J., Du, S., Shen, X., 2021. The COL11A1/Akt/CREB signaling axis enables mitochondrial-mediated apoptotic evasion to promote chemoresistance in pancreatic cancer cells through modulating BAX/BCL-2 function. *J Cancer* 12, 1406–1420.  
<https://doi.org/10.7150/jca.47032>
- 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\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6595–6605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308133200>
- Zhang, J., n.d. Multi-omics analysis reveals the chemoresistance mechanism of proliferating tissue-resident macrophages in PDAC via metabolic adaptation. OPEN ACCESS.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen, Fortwähren und Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, ohne dessen Unterstützung in meinem beruflichen Werdegang diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für das jahrelange Vertrauen und eine tolle Arbeitsatmosphäre im Institut.

Vor allem aber möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Tobias Lange für den immerwährenden Austausch, die stetige Motivation und die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Ich kann mir kein besseres Team vorstellen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer und Dr. Jasmin Wellbrock für ihre Bereitschaft danken, mein Thesis-Komitee zu vervollständigen und mich in dieser Arbeit zu unterstützen.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Daniel Wicklein, der mit seinem perfekten CD44KD-Konstrukt maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Danke auch an alle Kooperationspartner für ihre Arbeit und ihren Input, damit diese Arbeit gelingen konnte.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Kollegen, die mich während meiner Promotion im Labor, während der Mittagspause oder bei sonstigen Angelegenheiten (Dr. Marie-Therese Haider, Dr. Alina Schiecke, Dr. Ursula Valentiner, Dr. Vera Freytag, Ursula Makowski, Christine Knies, Jennifer Schröder-Schwarz, Tobias Gosau, Maike Märker, Mia Beine, Julia Kemmling) begleitet und unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht dabei an Lisa Staffeldt. Danke Lisa, dass du mir jeden Tag zur Seite standst. Ohne dich wäre die Zeit nicht halb so schön gewesen.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....