

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher

Der Einfluss von Hyaluronan und Integrin αV auf die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Marius Kemper

aus Georgsmarienhütte

Hamburg 2018

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.11.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. C. Schramm

Prüfungsausschuss, vierter Gutachter: PD Dr. med. F. Gebauer

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Duktales Adenokarzinom des Pankreas und Hyaluronan	2
2.2	Metastasierung, Leukozytenadhäsionskaskade und die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen	5
2.2.1	Cadherine	6
2.2.2	Selektine	7
2.2.3	Immunglobulin-Superfamilie	9
2.2.4	Integrine	9
2.3	ITGAV-abhängige Aktivierung von TGF- β	10
2.4	Funktionelle Einflüsse von ITGAV und TGF- β auf Primärtumorwachstum und Metastasierungskaskade	12
2.5	Pharmakologische Inhibition von ITGAV	13
3	Material und Methoden	15
3.1	Tissue-Microarray	15
3.2	Immunhistochemische und histologische Analysen	15
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	17
3.2.3	Masson-Goldner-Färbung	17
3.2.4	Mallory-Färbung	17
3.2.5	Feulgen-Reaktion	17
3.3	Die Pankreaskarzinomzelllinien und der Knockdown von ITGAV	19
3.3.1	Zelllinien und Charakteristika	19
3.3.2	Kultivierung der Zellen	19
3.3.3	Herstellung des ITGAV Knockdowns und Selektion mittels FACS	20
3.3.4	Western Blot	20
3.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung	22
3.4.1	Zellproliferationsassay	22

3.4.2	Colony-Forming-Assay	22
3.4.3	Zelladhäsion	22
3.4.4	Migrationsassay.....	24
3.4.5	Invasionsassay	24
3.5	Xenograft-Mausmodelle	25
3.5.1	Intraperitoneale Injektion	25
3.5.2	Subkutane Injektion	26
3.5.3	Quantifizierung humaner Tumorzellen mittels ALU-PCR in Blut, Knochenmark und Lunge	27
3.6	Genexpressionsanalyse der Primärtumore	28
3.7	Statistik	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Validierung der Färbung von Hyaluronan.....	30
4.2	Spezifische Färbung von Hyaluronan auf Tissue-Microarray und Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern.....	31
4.3	Färbung von ITGAV auf Tissue-Microarray und Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern	33
4.4	Verifizierung des ITGAV-Knockdowns in BxPC3 und PaCa 5061 Zellen.	35
4.5	<i>In Vitro</i> Charakterisierung des ITGAV Knockdowns in BxPC3 und PaCa 5061	37
4.6	Xenograft-Tiermodelle.....	41
4.6.1	Intraperitoneales Xenograft-Mausmodell.....	41
4.6.2	Subkutanes Xenograft-Tiermodell	43
4.7	Immunhistochemie	47
4.7.1	Beurteilung der Aktivität der SMAD abhängigen TGF- β -Signalkaskade.....	47
4.7.2	Generelle Morphologie, Proliferationsverhalten, Apoptoserate und Vaskularisierung.....	49
4.7.3	Extrazelluläre Matrix	55

4.7.4	Beurteilung der EMT.....	59
4.8	Genexpressionsanalyse.....	60
4.8.1	Übersicht der in PaCa 5061 und BxPC3 signifikant regulierten Gene...	60
4.9	Funktionelle Analyse der signifikant regulierten Gene	64
5	Diskussion	67
6	Zusammenfassung.....	80
7	Abstract.....	81
8	Aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen	82
9	Literaturverzeichnis	83
10	Erklärung des Eigenanteils.....	90
11	Danksagung.....	91
12	Lebenslauf.....	92
13	Eidesstattliche Versicherung	94

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das duktale Pankreaskarzinom (PDAC) stellte 2016 erstmals die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache in den USA dar (Siegel et al. 2016). Ein besseres molekularbiologisches Verständnis der an der Progression beteiligten Moleküle und der daraus resultierenden innovativen Therapieansätze sind zur Verbesserung der klinischen Situation dringend erforderlich. Das Tumorstroma stellt eine Diffusionsbarriere für Chemotherapeutika und Biologika dar, die dazu führt, dass die Wirkstoffe nicht an alle Tumorzellen gelangen. Hyaluronan ist ein elementarer Bestandteil dieser Extrazellulärmatrix des Tumorstromas. Die Interaktion mit dieser Matrix wird durch das Zell-Matrix-Adhäsionsmolekül Integrin αV (ITGAV) vermittelt. Veränderungen dieser Zell-Matrix-Interaktion sind funktionell wichtig, da sie es der Tumorzelle ermöglichen, in das umliegende Tumorstroma zu invadieren.

Gebauer et al. (2013) zeigten, dass ein Knockout von E- und P-Selektinen die Peritonealkarzinose reduziert und ITGAV in der residuellen Tumormasse kompensatorisch gesteigert exprimiert wird. Die Heraufregulation eines Integrins in den selektindefizienten Mäusen lässt sich pathophysiologisch erklären. Tumorzellen heften mit den gleichen oder zumindest ähnlichen Zelladhäsionsmolekülen an das Endothel am Zielort der Metastasen an, wie dies Leukozyten tun würden. Diese Anheftung geschieht in Form einer redundanten Kaskade, die mit Selektinen beginnt und mit Integrinen fortgesetzt wird. So ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen.

- Sind HA und ITGAV von prognostischer Signifikanz beim PDAC?
- Führt der Knockdown von ITGAV zu einer Reduktion der Peritonealkarzinose?
- Beeinflusst der Knockdown von ITGAV in den Tumorzellen eine Veränderung der Proliferation, Migration, Invasion und Adhäsion in vitro?
- Supprimiert der Knockdown von ITGAV in den Tumorzellen Primärtumorstromawachstum und Fernmetastasierung im Xenograft-Mausmodell?
- Sind Veränderungen der Primärtumore hinsichtlich genereller Morphologie, Proliferations- und Apoptoserate sowie Tumorstromavaskularisierung nachweisbar?

2 Einleitung

2.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas und Hyaluronan

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit 80-85 % das häufigste maligne des Pankreas. Weltweit beträgt die Inzidenz des Pankreaskarzinoms altersstandartisiert 4,9 Fälle pro 100 000 Einwohner. In den USA und in Deutschland beträgt die Inzidenz 7,2 bzw. 7,86 und ist so die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 65. - 75. Lebensjahr. Global betrachtet, ist die Inzidenz in der westlichen Welt erhöht (vgl. Abb. 1) (Alexakis et al. 2004, Hariharan et al. 2008, Siegel et al. 2016).

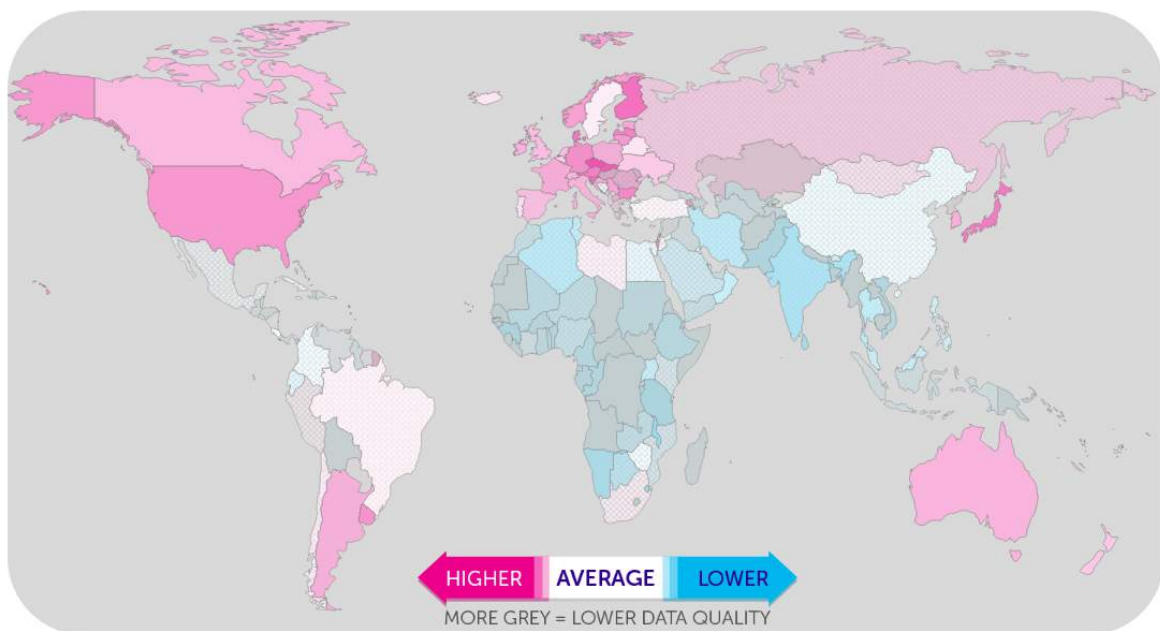


Abb. 1: Globale Inzidenzverteilung des Pankreaskarzinoms mod. n. *Cancer Research UK*

Patienten mit chronischer Pankreatitis haben ein 2,71-fach erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Zudem steigt das Risiko für Raucher 2,2-fach. Diabetes mellitus erhöht das Risiko um den Faktor 1,51. Davon unabhängig steigt das Risiko ab einem BMI > 35 m²/kg 1,55-fach an. Als weiterer schwächerer erworbener Risikofaktor gilt der chronische Alkoholabusus. Eine familiäre genetische Disposition entsteht durch Keimbahnmutationen von BRCA2, PALB2, CDKN2A, STK11, PRSS1 oder im Rahmen des HNPCC-Syndroms und erhöht das Risiko um den Faktor 1,9 - 13 (Wolfgang et al. 2013, Vincent et al. 2011).

Das PDCA präsentiert sich makroskopisch als solider Tumor unscharfer Begrenzung. Mit 60-70 % ist es am häufigsten im Pankreaskopf lokalisiert.

Histologisch ähnelt der Tumor in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad exokrinem Drüsengewebe. Typischerweise infiltriert das PDAC zum Zeitpunkt der Diagnose bereits umliegenden Nervenscheiden, Lymphgewebe und umliegende kleine Venen (Tannapfel 2010).

Potentiell kurativ therapierbar sind Patienten mit vollständig reseziertem Tumor und anschließend durchgeführter adjuvanter Chemotherapie mit Gemcitabin. Durch die rasche Infiltration umliegender vitaler Strukturen, wie z. B. der A. mesenterica superior, die frühe Fernmetastasierung vornehmlich in Leber, Peritoneum oder Lunge sowie die späte klinische Manifestation dieser Tumorentität sind lediglich 2,6-9 % für ein kuratives Therapiekonzept geeignet. Patienten mit kurativen Ansatz haben eine 5-Jahresüberlebensrate von 7-25 % und ein mittleres Überleben von 11-20 Monaten. Patienten, die diesem Therapieansatz nicht zugeführt werden können, haben im Vergleich ein deutlich geringeres mittleres Überleben von unter 6 Monaten und ein 5-Jahresüberleben von 0,4-5 % (Alexakis et al. 2004, Edge et al. 2010, Wolfgang et al. 2013).

Bei der schrittweisen Pathogenese des PDAC kommt es zu einer progressiven Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen. Die Ursprungszellen der beiden häufigsten prä-neoplastischen Läsionen, der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) und der intraduktalen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN) ist unbekannt. Bereits in den prä-neoplastischen Stadien liegt häufig eine onkogene KRAS-Mutationen vor. Diese ist in mehr als 90 % aller PDAC nachweisbar. Zudem treten vermehrt Mutationen oder Deletionen in den Tumorsuppressor-Genen TP53, CDKN2a und SMAD4 (DPC4) auf (vgl. Abb. 2). SMAD4 nimmt eine Schlüsselfunktion in der TGF- β Signalkaskade ein, ist in etwa 48-55% deletiert oder mutiert und so inaktiviert. Der funktionelle Verlust von SMAD4 führt zu vermehrter lokaler und distanter Metastasierung (Iacobuzio-Donahue et al. 2009, Bardeesy & DePinho 2002).

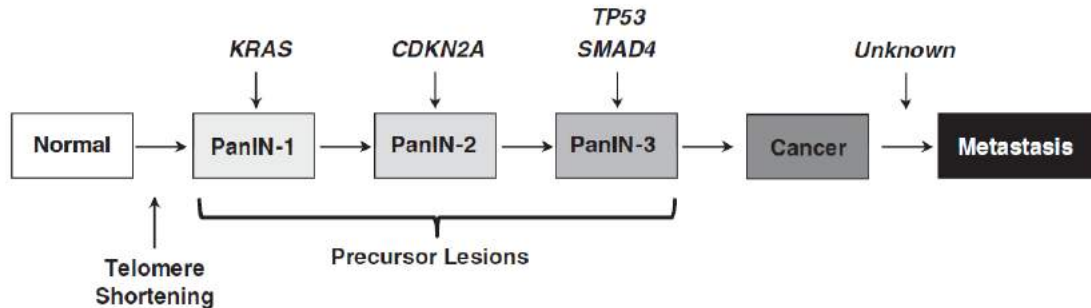


Abb. 2: Sequentieller genetischer Progress der Tumorgenese beim PDAC nach Yachida & Iacobuzio-Donahue (2013). Die Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen führt zur Steigerung der Malignität. Genetische Veränderungen von malignem Tumor zur Metastase sind unbekannt.

Weiterhin existieren zahlreiche Gene, die in weniger als 5 % der Fälle mutiert sind und so zu einer breiten interindividuellen genetischen Heterogenität führen (Ormanns 2014). Es konnten 14 für das PDAC zentrale Signalkaskaden und Prozessregulationen identifiziert werden (Jones et al. 2008, Yachida & Iacobuzio-Donahue 2013). Das dazu zählende *TGF- β -Signaling* und das *Integrin Signaling* sind für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung.

Die Desmoplasie, also die tumorinduzierte Bildung von Bindegewebe, ist charakteristisch für das PDAC und das gebildete Bindegewebe. Sie stellt eine Diffusionsbarriere für Chemotherapeutika und Biologika dar. Für die desmoplastische Stromabildung kennzeichnend ist eine ausgeprägte Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM), aktivierte Fibroblasten, Myofibroblasten, Leukozyten, pankreatische Sternzellen (*Pancreatic stellate cells*, *PSC*) sowie Blut- und Lymphgefäße. Die ECM setzt sich maßgeblich aus Kollagen Typ I und III sowie Fibronectin, Matrix-Metalloproteinasen sowie Hyaluronan zusammen (Jonas et al. 2005).

Hyaluronan (HA), bestehend aus Disaccharideinheiten, welche sich aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin zusammensetzen, fungiert als hydrophile Füllsubstanz der ECM. Dass *hyaluronan binding protein* (HABP) bindet HA hochspezifisch und ist zur Detektion methodisch geeignet (Hingorani et al. 2016). Ein hohes Expressionsniveau von Hyaluronan korreliert positiv mit der Progression des Tumors und dem Langzeitüberleben im Mammakarzinom (Auvinen et al. 1997), kolorektalem Karzinom (Ropponen et al. 1998) und Magenkarzinom (Setälä et al. 1999). Für das PDAC zeigten Cheng et al. (2013) an einem kleinen Kollektiv von 41 Patienten eine positive Korrelation zwischen der Expression von Hyaluronan und

einem verkürzten Überleben. Die Therapie mit intravenös verabreichter Hyaluronidase in Kombination mit konventioneller Chemotherapie wird erprobt. Aktuelle Daten an einem kleinen Kollektiv von 28 Patienten legen nahe, dass insbesondere Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom und einem hohen Anteil Hyaluoronan von einer kombinierten Therapie aus Gemcitabin und Hyaluonidase (PEGPH20) profitieren (Hingorani et al. 2016).

2.2 Metastasierung, Leukozytenadhäsionskaskade und die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen

Die Metastasierung ist die bedrohlichste Eigenschaft maligner Neoplasien. Generell sterben etwa 90 % der Patienten an den Folgen der Metastasierung und nicht an denen des Primärtumors (Reymond et al. 2013). Für den dynamischen Ablauf der Metastasierung kann pathophysiologisch ein sequentielles Grundmuster angenommen, wobei ein integrierendes Gesamtkonzept des komplex reguliertes Prozesses noch fehlt. Auf genetischer Ebene führt eine Verkettung von Mutationen zur Ausbildung eines Tumorzellklons mit hohem metastatischem Potential, wie in Abb. 3 schematisch dargestellt. Über die Zeit führt die Häufung immer neuer Mutationen zur Ausbildung invasiverer Subklone, die die parentale Generation partiell verdrängen. Dieser sequentielle Vorgang führt zur intratumeralen Heterogenität und letztlich zur Ausbildung von metastasierenden Subklonen. Eine genetische Signatur für die Metastasierung ist nicht bekannt (Vogelstein & Kinzler 2015).

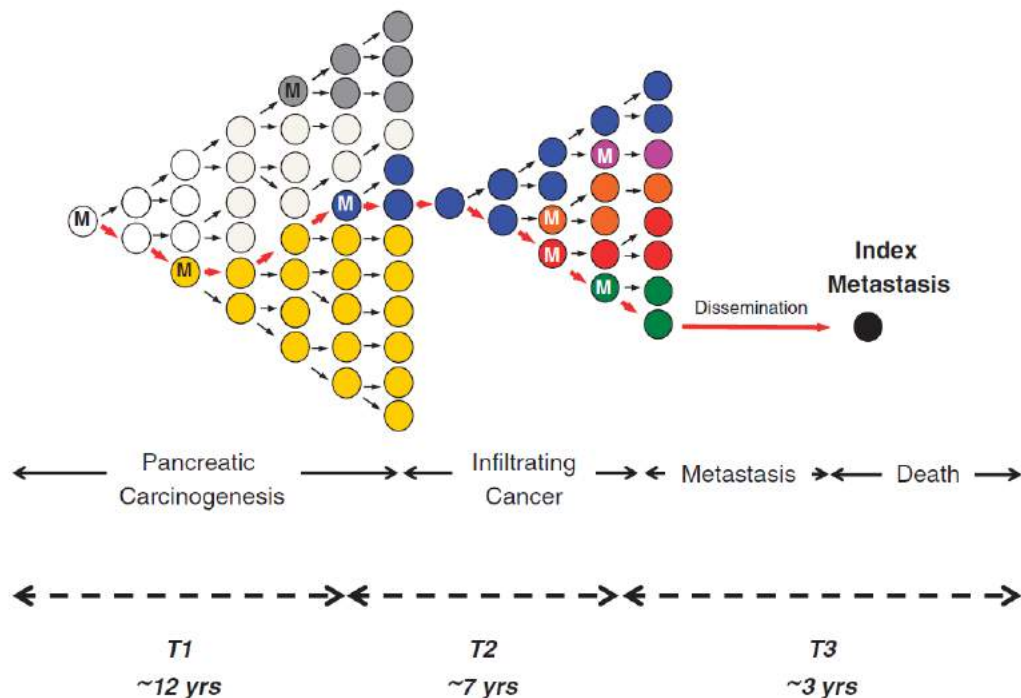


Abb. 3: Modell zur Evolution der metastasierende Tumorzellklone nach Yachida & Iacobuzio-Donahue (2013). Über die Zeit führt die Häufung immer neuer Mutationen (M) zu der Ausbildung invasiverer Subklone, die die parentale Generation partiell verdrängen. Dieser repetitive Vorgang führt zur intratumoralen Heterogenität und letztlich zur Ausbildung eines metastasierenden Subklons.

Der Prozess der Disseminierung lässt sich funktionell in Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT), Migration, Invasion, Intravasation, Adhäsion, Extravasation, Mesenchymal-Epitheliale-Transition (MET) und Induktion der Tumorangiogenese unterteilen. Im Kontext der Adhäsion und Extravasation von Tumorzellen ist bekannt, dass ähnliche Mechanismen wie bei der Adhäsion von Leukozyten, der sogenannten Leukozytenadhäsionskaskade, vorliegen, welche auf molekularer Ebene umfassend charakterisiert wurde (Reymond et al. 2013).

Bei diesem Prozess nehmen Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) hinsichtlich Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte sowie der Regulation des Zellzyklus und der Zellmigration eine herausragende Rolle ein. Sie lassen sich in vier Hauptgruppen, den Cadherinen, Integrinen, Selektinen sowie der Immunglobulin-Superfamilie, unterteilen (Makrilia et al. 2009).

2.2.1 Cadherine

Die Superfamilie der Cadherine stellt spezifische Zell-Zell-Kontakte her. Die kalziumabhängigen Glykoproteine bestehen aus einer extra-, trans- und einer zytoplasmatischen Domäne. E- und N-Cadherine nehmen bei der malignen

Progression eine zentrale Rolle ein. Der Verlust von E-Cadherin geht mit einem gesteigerten Migrations- und Invasionsverhalten einher (Wagner 2010).

2.2.2 Selektine

Die Familie der Selektine (*selective Lectin-dependent Cell Adhesion Molecule*) besteht aus den strukturell verwandten P(*platelet*)-, E(*endothelial*)- und L(*leukocyte*)-Selektinen. Mit ihrer extrazellulären, Kohlenhydrat erkennenden Domäne binden sie spezifische Zuckerepitope, weshalb sie aufgrund ihrer zuckerbindenden Eigenschaft zu den Lektinen gezählt werden. Selektine vermitteln physiologisch die Anheftung von Leukozyten an das Endothel. Die Expression von E-Selektin wird durch inflammatorische Stimuli auf dem Endothel induziert und vermittelt so die reversible Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel, wodurch letztlich die Extravasation der Leukozyten in inflammatorische Areale ermöglicht wird (Wagner 2010).

Die Extravasation von Leukozyten und zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) ist ähnlich. Die Leukozytenadhäsionskaskade beginnt mit *Tethering and Rolling*, also der reversiblen Anheftung der Leukozyten an das Endothel. Es folgen die verstärkte Adhäsion unter dem Einfluss von Chemokinen und letztlich die Extravasation (vgl. Abb. 4) (Vestweber 2012).

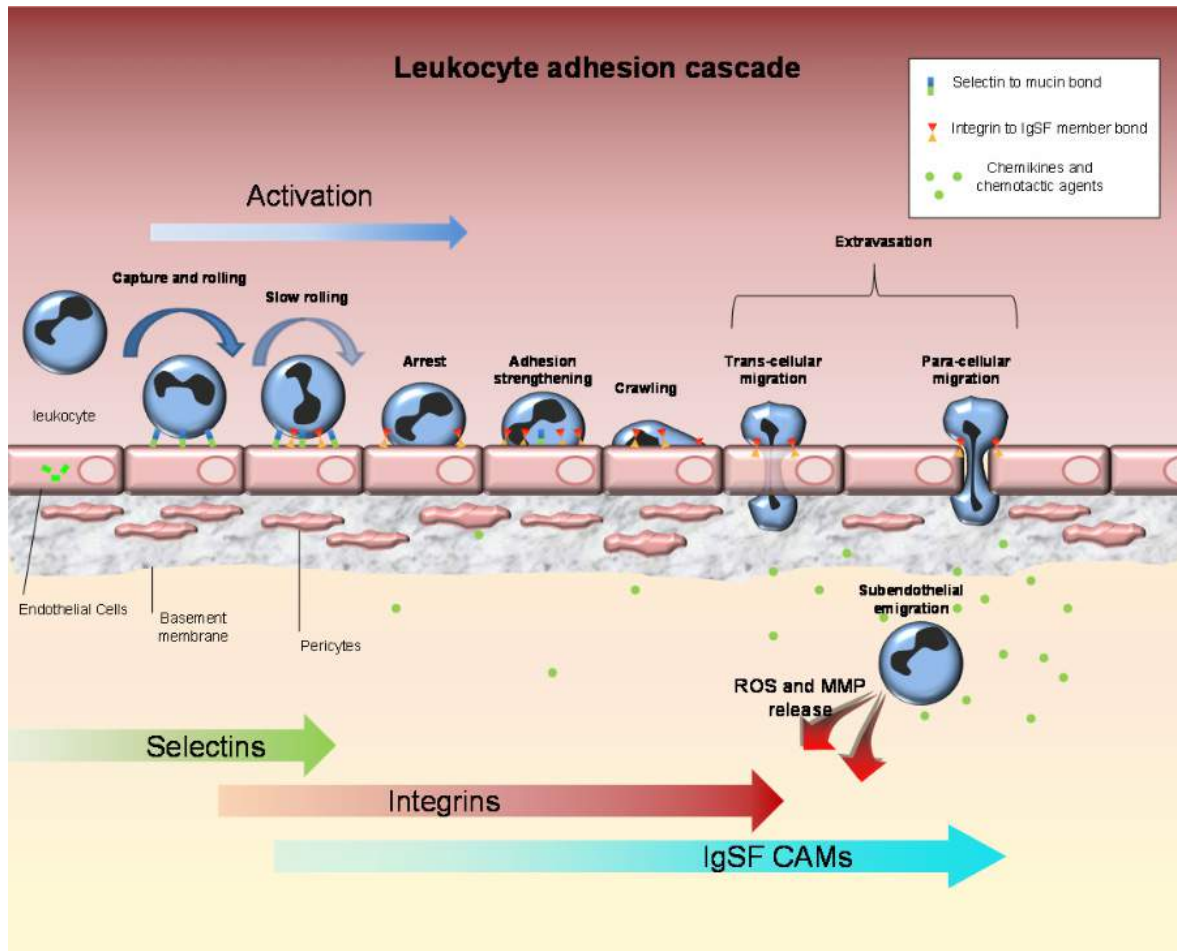


Abb. 4: Visualisierung der Leukozytenadhäsionskaskade. Die Adhäsion von Leukozyten und Tumorzellen verläuft ähnlich und lässt sich in initiale Anheftung, Adhäsion und Extravasation unterteilen. Selektine vermitteln die initiale Anheftung von Tumorzellen. Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, <https://www1.imperial.ac.uk/resources/A0F93F15-C796-4B19-9631-06877300AE3B/pic3.jpg>

Im tumorbiologischen Kontext konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen selbst oder assoziierte Makrophagen Zytokine freisetzen und so die Expression von E-Selektinen initiieren (Eichbaum et al. 2011). Tumorzellen bilden eine Vielzahl von Selektin-Liganden auf Ihrer Zelloberfläche aus, welche von Selektinen erfasst werden und die initialen, noch reversible Anheftung an das Endothel vermitteln (Vestweber 2012).

P-Selektin wird u.a. in den Granula von Thrombozyten gespeichert, nach Stimulierung durch Thrombin freigesetzt und vermittelt die endotheliale Anheftung von Leukozyten und dendritischen Vorläuferzellen. Hinsichtlich der Genese von Metastasen ist bekannt, dass P-Selektine der Thrombozyten die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel verstärken und so die Extravasation unterstützen (Coupland et al. 2012).

Für das PDAC konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von E- und P-Selektinen im Xenograft-Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der peritonealen Metastasierung führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass der Verlust von E- und P-Selektinen mit einer gesteigerten Expression von ITGAV verbunden ist (Gebauer et al. 2013).

2.2.3 Immunglobulin-Superfamilie

Bei den Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMS) handelt es sich um eine heterogene Gruppe Zelladhäsionsmoleküle, welche alle eine extrazelluläre strukturelle Domäne aus 4-6 Ig-ähnlichen Wiederholungen aufweisen. Die Expression von Ig-CAMS ist in Tumoren häufig verändert (Wagner 2010). Dazu gehört beispielsweise die CEACAM Familie (*carcioembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule*), welcher zwölf Glykoproteine, CEACAM-1-12 zugeordnet werden können. Für diese sind vielfältige Funktionen hinsichtlich Adhäsion, intra- und interzelluläre Signalwege sowie der Tumorprogression bekannt (Beauchemin & Arabzadeh 2013). Für CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 konnte gezeigt werden, dass sie als valide Biomarker für das PDAC herangezogen werden können (Gebauer et al. 2014). Immunhistochemische Analysen zu CEACAM7 zeigen eine oberflächliche Expression einzelner Zellen in Gangstrukturen des normalen Pankreas (Schölzel et al. 2000).

2.2.4 Integrine

Integrine vermitteln die Bindung von Zellen an Bestandteile der Extrazellulärmatrix, Zelladhäsionsmoleküle sowie an Komponenten des Blutgerinnungs- und Komplementsystems. Die heterodimere Rezeptorfamilie besteht aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten, welche jeweils aus einem extrazellulären, einem hydrophoben transmembranösen, sowie einem kurzen intrazellulärem Segment bestehen (Wagner 2010). Die α -Untereinheit V (ITGAV) kommt in Kombination mit β 1, β 3, β 5, β 6 und β 8 vor, woraus sich die Bindungsspezifität des jeweiligen Rezeptors ergibt. Die Tripeptid-Sequenz "Arg-Gly-Asp" (RGD) kennzeichnet die zahlreichen ITGAV-Liganden der Extrazellulärmatrix. Dennoch haben die Heterodimere spezifische Bindungseigenschaften. So bindet z.B. α v β 5 nur Vitronectin während α v β 3 mit Vitronectin, Fibronektin, vWF, Tenascin, Osteopontin, Fibrillin, Fibrinogen, Laminine und Thrombospondin interagiert (Humphries et al. 2006). Die nicht konstitutiv aktiven Integrine können zu einer extrazellulären Clusterbildung, welche sich

um Liganden bilden, aktiviert werden. Zum anderen kann eine Konformationsänderung durch eine intrazelluläre Kaskade ausgelöst werden, welche als *Inside-out-Signaling* bezeichnet wird (Wagner 2010). Hinsichtlich der Rolle von ITGAV im PDAC konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression von $\alpha\beta3$ positiv mit der lymphatischen Metastasierung korreliert (Hosotani et al. 2002). Die Expression von $\alpha\beta3$ ist beim Melanom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom und Zervixkarzinom mit dem Progress der Erkrankung assoziiert (Weis & Cheresch 2011). Für das Mammakarzinom ist bekannt, dass ITGAV TGF- β aktiviert und so die Metastasierung fördert (Li et al. 2015). Der TGF- β -Signalweg gehört zu den Schlüsselkaskaden im PDAC (Yachida & Iacobuzio-Donahue 2013).

2.3 ITGAV-abhängige Aktivierung von TGF- β

Die extrazelluläre Domäne des ITGAV bindet die RGD-Sequenz des latenten TGF- β -Komplex der ECM und moduliert so das *TGF- β -Signaling* (vgl. Abb. 5). Genauer assoziieren zuvor die drei Isoformen TGF- $\beta1$, TGF- $\beta2$, TGF- $\beta3$ nach ihrer Synthese mit dem *Latency-Associated-Peptide* (LAP) und bilden den *Small-Latent-Complex* (SLC). Nach Bindung an das *Latent TGF- β -Binding Protein* (LTBP) entsteht der *Large-Latent-Complex* (LLC) und wird in die ECM des Tumorstromas sezerniert. Von den drei bekannten TGF- β Isoformen enthalten die LAP von TGF- $\beta1$ und TGF- $\beta3$ die RGD-Sequenz, welche hypothetisch von $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha\beta8$ gebunden werden können (Henderson et al. 2013, Hinz 2013). Es konnte aber gezeigt werden, dass nur $\alpha\beta6$ und $\alpha\beta8$ eine aktivierende Konformationsänderung von TGF $\beta1$ einleitet (Ludbrook et al. 2003). Wie in Kapitel 2.1 beschrieben gehört der TGF- β -Signalweg zu den Schlüsselkaskaden im PDCA.

Aktiviertes TGF- β bindet an den heterodimeren TGF- β Rezeptor, welcher sich aus dem TGF- β -Typ-II-Rezeptor (TGF β RII) und dem TGF- β -Typ-I-Rezeptor (TGF β RI) zusammensetzt. Intrazellulär wird das Signal vor allem über sogenannte SMAD-Proteine weitergegeben (*canonical pathway*), aber auch SMAD-unabhängige Signalwege sind bekannt (*non-canonical pathway*) (Derynck & Zhang 2003). SMAD ist ein Akronym für die Fusion von *Caenorhabditis elegans* *Sma* Gene mit *Drosophila* *Mad*, *Mother against decapentaplegic* (Li & Flavell 2015). TGF- β bindet initial an den TGF- β -Typ-II-Rezeptor, was zu einer Aktivierung der Serin/Threoninkinase-Aktivität des Typ-I-Rezeptors führt. SMAD2 und SMAD3 werden so phosphoryliert. Phospho-SMAD-2 und phospho-SMAD3 bilden mit

SMAD4 einen oligomeren Komplex. Dieser transloziert in den Zellkern und bildet einen multimeren DNA-Bindungskomplex aus. SMAD6 und SMAD7 werden ebenfalls von TGF- β Rezeptoren aktiviert und bilden eine negative Rückkopplungsschleife, in dem sie die Bindung von SMAD2 und SMAD3 mit SMAD4 hemmen (Wagner 2010).

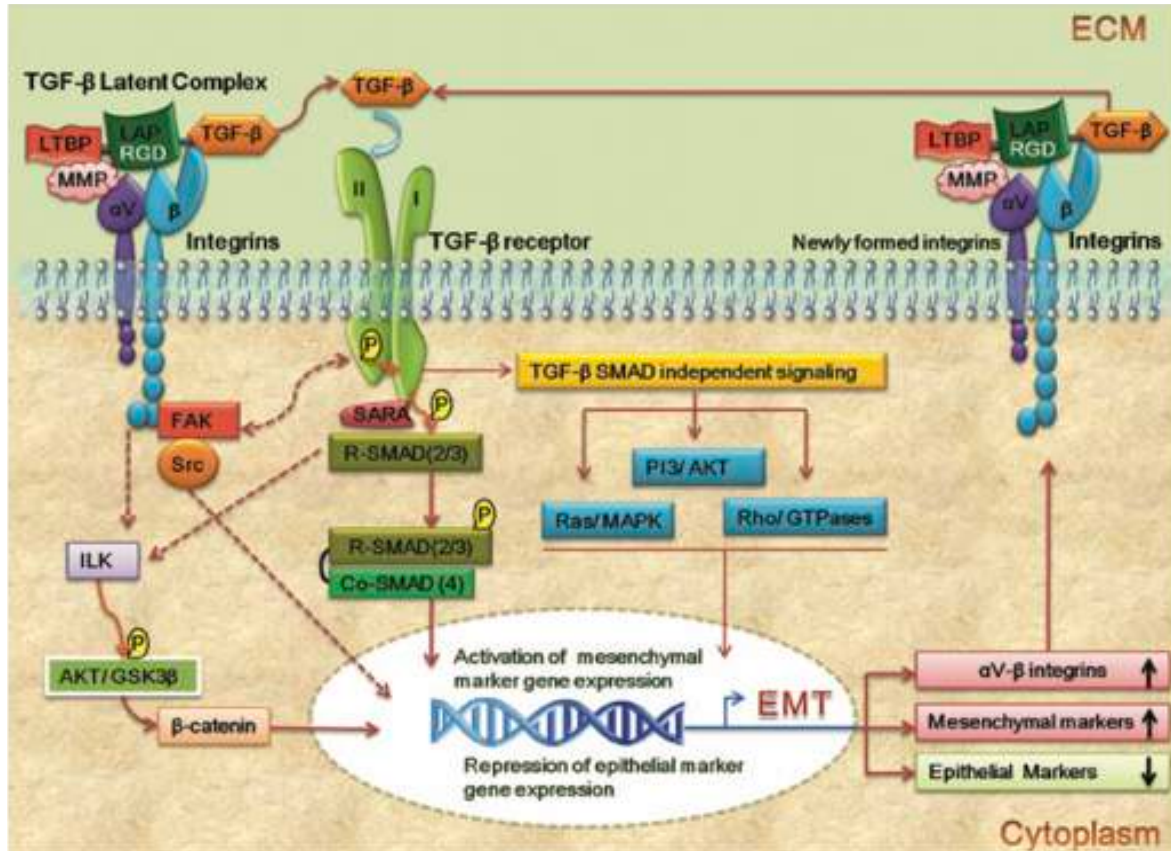


Abb. 3: Visualisierung des ITGAV-TGF- β -SMAD-Signalwegs. ITGAV aktiviert latentes TGF- β in der extrazellulären Matrix und führt zur Aktivierung des SMAD abhängigen *canonical Signaling* und SMAD unabhängigen *non-canonical Signaling*. Fahey et al., 2012, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.

Der TGF- β -SMAD-Signalweg reguliert Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Migration von Tumorzellen. Weiterhin sind immunmodulatorische Eigenschaften von TGF- β beschrieben. Zudem sind Integrine selbst transkriptionale Ziele des TGF- β -Signalweges (Massagué 2008, Munger et al. 1999). Vielfältige hemmende und fördernde funktionelle Einflüsse auf das Tumorwachstum in Abhängigkeit von Zelltyp und Kontext sind bekannt und sollen im nachfolgenden Kapitel erläutert werden (Hezel et al. 2006).

2.4 Funktionelle Einflüsse von ITGAV und TGF- β auf Primärtumorwachstum und Metastasierungskaskade

Sun et al. konnten 2011 zeigen, dass der für die EMT typische Phänotyp der Tumorzellen mit ITGAV und der Aktivierung des TGF- β -SMAD-Signalweg einhergeht. TGF- β gilt als zentraler Induktor der EMT. Hierbei werden epitheliale Marker der Zelloberfläche wie z. B. E-Cadherin oder Desmoplakin herunter reguliert und mesenchymale Marker wie z. B. N-Cadherin, Integrine, Fibronectin und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) vermehrt exprimiert (Mamuya & Duncan 2012).

Zusammenfassend wird durch die initiierte EMT das invasive Potential der Tumorzelle gesteigert (Yilmaz & Christofori 2009). Für Plattenepithelkarzinome der Zervix, Haut, Ösophagus und Kopf-Hals-Tumore konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Heterodimer $\alpha\beta 6$ TGF- β in vivo aktiviert und zu einer Zunahme des Tumorwachstums führt (Koopman et al. 2008). Eine Überexpression von Integrin $\alpha\beta 6$ im Kolonkarzinom ist assoziiert mit der EMT, TGF $\beta 1$ -Aktivierung und zunehmendem Migrationsvermögen (Bates et al. 2005).

Integrin $\alpha\beta 6$ führt im Kolonkarzinom zu einer vermehrten Sekretion von MMP-9 und so zu einer MMP-9 vermittelten Invasion der Tumorzellen (Thomas et al. 2001).

Im Mammakarzinom geht die Expression von $\alpha\beta 3$ mit zunehmender EMT einher (Gallier & Schiemann 2006). *In vitro*- und *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass $\alpha\beta 3$ die Aktivität und so das onkogene Potential des Protoonkogens c-Src beeinflusst. Dieses ist an der Steuerung von Adhäsion- und Invasionsverhalten, Überleben, Proliferation und Tumorwachstum beteiligt (Huveneers et al. 2007). Die Expression von $\alpha\beta 3$ wird weiterhin mit der transendothelialen Migration bei der Genese von Lebermetastasen in Verbindung gebracht (Kikkawa et al. 2002). Für $\alpha\beta 3$ konnte zudem gezeigt werden, dass es mit der Expression von MMP-2 im Mammakarzinom assoziiert ist (Baum et al. 2007).

Bei Melanomzellen konnte nachgewiesen werden, dass $\alpha\beta 3$ an Thrombozyten bindet. Es kann angenommen, dass dieser Mechanismus die Adhäsion der Tumorzelle am Endothel und so die Extravasation begünstigt (Felding-Habermann et al. 1996). Zudem sind Wechselwirkungen zwischen Integrinen und angiogenen Wachstumsfaktoren beschrieben. Beispielsweise interagiert nicht nur $\alpha\beta 3$ mit dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGFR) und trägt so zur Tumorangiogenese bei,

sondern auch $\alpha\beta 5$ assoziiert mit dem *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, welcher die Proliferation und Migration von Endothelzellen steuert (Desgrosellier & Cheresh 2010). Das Heterodimer $\alpha\beta 5$ vermittelt weiterhin im Pankreaskarzinom Invasions- und Migrationsverhalten, wobei bisher kein Einfluss auf das Primärtumorstadium nachgewiesen werden konnte. Der im Pankreaskarzinom häufig aktivierte EGF-Signalweg steuert Integrin $\alpha\beta 5$ und wird daher auch *EGF-integrin-crosstalk* bezeichnet (Ricono et al. 2009).

Bindet ein Integrin-Heterodimer keinen Liganden, besteht also kein Kontakt zur extrazellulären Matrix, wird über die Rekrutierung der Caspase-8 eine Apoptose induziert und so der *integrin-mediated-death* (IMD) ausgelöst. Der Verlust von Caspase-8 in der Tumorgenese führt folglich zur Zunahme invasiver Eigenschaften und begünstigt die Disseminierung der Tumorzellen (Desgrosellier et al. 2009).

2.5 Pharmakologische Inhibition von ITGAV

ITGAV wurde im Rahmen von fibrotischen Prozessen der Leber als therapeutisches Zielmolekül identifiziert. Hier wurde der niedermolekulare Inhibitor CWHM-12, welcher alle Heterodimere der ITGAV-Untereinheit $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ und $\alpha\beta 8$ hemmt, effizient eingesetzt. Klinische Studien zu CWHM-12 stehen zum aktuellen Zeitpunkt aus (Henderson et al. 2013).

Der niedermolekulare ITGAV-Antagonist GLPG0187 bindet und blockiert fünf RGD-Sequenz-bindende Integrinheterodimere $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, und $\alpha 5\beta 1$. Eine von Cirkel et al. (2016) publizierte Phase-I-Studie zu GLPG0187 untersuchte Pharmakokinetik, Verträglichkeit und Sicherheit des Präparates an freiwilligen Probanden. Es wurde keine dosis abhängige Toxizität nachgewiesen.

Intetumumab (CANTO 95) ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen ITGAV und wurde bereits in einer klinischen randomisierten multizentrischen Phase-II-Studie für das fortgeschrittene maligne Melanom evaluiert. Zwar wurde hier kein therapeutischer Benefit für das maligne Melanom gesehen, allerdings erwies sich das Spektrum der Nebenwirkungen überschaubar. In 22-30 % entwickelten die Patienten eine Uveitis, welche mit lokalen Steroiden beherrscht werden konnte. Es traten keine von Intetumab ausgehende Myelonsuppression, EKG-Veränderungen oder Todesfälle auf (O'Day et al. 2011).

Weiterhin werden Trägersubstanzen erprobt, bei denen Chemotherapeutika mit Polyethylenglycol (PEG) zunächst maskiert, sekundär mit der RGD-Sequenz markiert werden und sich so als Liganden von ITGAV präsentieren. Hier konnte eine Mehranreicherung im Pankreaskarzinom in vivo gezeigt werden (Ding et al. 2011). Auch komplexe gentherapeutische Ansätze zur Suppression von ITGAV sind Gegenstand aktueller Forschung (Marelli et al. 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Tissue-Microarray

Bei dem verwendeten Tissue-Microarray (TMA) handelt es sich um einen Paraffinblock, welcher aus ausgestanzten formalinfixierten Gewebezyllindern zusammengesetzt wird. Jeder Gewebezylinder repräsentiert ein Primärtumorsektat. So kann mit nur einmaliger Applikation eines Antikörpers eine hohe Stichprobenanzahl immunhistochemisch untersucht werden. Hier wurden Proben bei 203 Patienten gewonnen, die sich wegen eines PDAC am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zwischen Februar 1994 und Mai 2005 einer Operation unterzogen haben. Kein Patient erhielt eine neoadjuvante Therapie. Es wird geprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den histologischen Resultaten mit den klinisch und pathologisch erhobenen Parametern hergestellt werden kann. Dazu gehörten Geschlecht, Primärtumorgröße, Lymphknotenstatus, Metastasierung sowie Erkrankungsstadium nach UICC.

3.2 Immunhistochemische und histologische Analysen

Die unmittelbar nach Präparation in 4 %igem Formaldehyd fixierten Primärtumore aus dem Mausmodell sowie der TMA wurden mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Paraffinschnitte auf Silan-beschichtete Adhäsivobjektträger (HistoBond, Marienfeld, Deutschland) aufbereitet und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet, anschließend in Xylol (XEM-200, Vogel, Gießen, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

3.2.1 Immunhistochemie

Nach der in Tab. 1 angegebenen durchgeführten Vorbehandlung zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in TBS-T (pH 7,6; 0,1% Tween 20) dreimal für je fünf Minuten gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit dem in *Antibody Diluent* (Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA) verdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreifachem Spülen in TBS-T erfolgte die Benetzung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 30 min. Zur enzymatischen Farbstoffentwicklung wurde zum einen die ABC-Entwicklungsmethode (Avidin-Biotin-Komplex; ABC kit, Vector, Burlingame, USA) gewählt. Der Komplex ist mit

alkalischer Phosphatase gekoppelt und wurde entsprechend den Instruktionen des Herstellers eingesetzt.

Die Kontrolle der Spezifität der Hyaluronanmarkierung erfolgte unter Ausnutzen der enzymatischen Aktivität der Hyaluronidase. Hierzu wurde Hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*, 389561-100U, Merck) in 1 ml 0.02 M Natriumacetatpuffer (pH = 6,0) gelöst und erneut 1:10 verdünnt. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 4 h bei einer Temperatur von 37°C in 10 U/ml Hyaluronidase, dann erneut für 20 h mit Hyaluronidase vorbehandelt.

Des Weiteren wurde für die S1P1-Färbung mit einem auf der *Labeled (Strept) Avidin-Biotin* Methode (LSAB-Methode) basierenden Kit (K5005, Dako) entwickelt. Hierbei führt der im Vergleich zur ABC-Methode kleiner Reaktionskomplex zu weniger sterischen Beeinträchtigungen und ist so spezifischer. Abschließend wurden die Schnitte in frisch gefiltertem Mayers Hämalaun (1:1 in dest. Wasser) 10 s kerngegegenfärbt, in Leitungswasser gespült, erneut in dest. Wasser gewaschen und eingedeckelt.

Spezifischer Bindungspartner	Zielstruktur	Verdünnung	Hersteller	Vorbehandlung	Entwicklung
Polyklonaler Schafantikörper	Hyaluronan	1:200	ab 53842, ABCAM	Citrat-Puffer (pH = 6), Mikrowelle	ABC
Biotinylated hyaluronic acid binding protein	Hyaluronan	1:75	385911 Calbiochem, Merck	Retrievalösung S1699 (Dako), 60°C	ABC
Monoklonaler Mausantikörper	ITGAV	1:100	sc-376156, Santa Cruz	EDTA (10x), pH 8, Mikrowelle	ABC
Monoklonaler Mausantikörper	Ki67	1:75	M 7240, Dako	Retrievalösung S1699 (Dako), 85°C	ABC
Monoklonaler Mausantikörper	Humanes Fibronectin	1:100	NCL-FIB, Leica Biosystems	TBS (pH 7,8) + 0,1 % CaCl ₂ + 0,1 % Trypsin 37°C	ABC
Polyklonaler Kaninchenantikörper	Fibronectin	1:8000	A 0245, Dako	Retrievalösung S1699 (Dako), 85°C	ABC
Polyklonaler Kaninchenantikörper	S1P receptor 1	1:125	sc-25489, Santa Cruz	Retrievalösung S1699 (Dako), 85°C	LSAB
Polyklonaler Kaninchenantikörper	P-SMAD 2	1:200	AB3849, Chemicon	Fast Enzyme (Zytomed Systems)	ABC
Polyklonaler Kaninchenantikörper	Twist	1:100	ab50581 abcam	121°C, Steamer	ABC

Tab. 1: Verwendete Detektionsmethode sowie Angabe von Vorbehandlung und Entwicklungsmethode

Die gefärbten Schnitte wurden mittels Mirax-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) gescannt und die entsprechende Software Mirax Viewer (Zeiss) zur zufälligen Auswahl der Gesichtsfelder herangezogen. Die Signalquantifizierung der Färbung erfolgte mit Hilfe der Java-basierten ImageJ Software (NIH, MD, USA).

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach abgeschlossener Rehydrierung wurden die Schnitte zunächst in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) für eine Minute in Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland), positiv geladener Kernfarbstoff, inkubiert, dann für 2 min in destilliertes Wasser und für 5 min in Leitungswasser getaucht. Es folgte die Inkubation in Eosin (Merck), einem negativ geladener Cytoplasmafarbstoff für 3 min und erneut in dest. Wasser für 30 Sekunden. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol erfolgte die Eindeckelung mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland).

3.2.3 Masson-Goldner-Färbung

Entparaffinierte Schnitte werden zunächst mit Weigerts Eisenhämatoxylin (Waldeck, Münster, Deutschland) für 4 Min kerngefärbt. Nach Spülung unter fließendem Leitungswasser folgte die Inkubation mit Poceau-Säurefuchsin (Croma, Korneuburg, Österreich) für 5 Min und anschließendem Spülen in 1 %iger Essigsäure. Nach Beizen mit Phosphorwolframsäure-Orange G (Merck), Spülen mit 1 %iger Essigsäure (Merck) folgt die Inkubation mit dem Plasmafarbstoff Lichtgrün (Croma). Es wurde erneut mit 1 %iger Essigsäure gespült, dehydriert und eingedeckelt (Welsch et al. 2010).

3.2.4 Mallory-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst in 0,1 %igem Säurefuchsin (Croma) inkubiert und mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte die dreiminütige Fixierung in 2 %iger Phosphormolybdänsäure (Merck) und Spülung. Die Inkubation in Mallory-Lösung (Anilinblau (Croma), Orange G (Croma), Oxalsäure (Merck)) wurde für 5 Min aufrechterhalten und anschließend mit dest. Wasser gespült. Nach Bad in 96%igen Alkohol wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckelt.

3.2.5 Feulgen-Reaktion

Bei der Quantifizierung der Apoptose nutzen wir die dabei entstehenden morphologischen Veränderungen des Zellkerns, welche von Kernkondensierung,

Kernfragmentierung bis zur Ausbildung charakteristischer Apoptosekörperchen reichen. Die in den Apoptosekörperchen enthalten DNA wird mit der Feulgen-Reaktion purpurrot angefärbt. Die dazu entparaffinierten Schnitte wurden mit dest. Wasser gespült, zunächst in 1M HCl bei Raumtemperatur und zur Hydrolyse in vorgewärmte 1M HCl für 4 Min eingesetzt. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgte die Zugabe der Schiff'schen Reagenz (Merck) für 30 min im Dunkeln. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckelt. Zur Auswertung werden pro Schnitt die Zellkerne in 5 Gesichtsfeldern lichtmikroskopisch betrachtet und der Anteil der Zellkerne mit Apoptosekörperchen bestimmt (Welsch et al. 2010).

3.3 Die Pankreaskarzinomzelllinien und der Knockdown von ITGAV

3.3.1 Zelllinien und Charakteristika

Bei den Untersuchungen wurden zwei humane Zelllinien, repräsentativ für das duktales Adenokarzinom des Pankreas, verwendet. Die Eigenschaften der eingesetzten Zelllinien BxPC3 und PaCa 5061 werden in Tab. 2 zusammengefasst. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen (DSMZ).

Zelllinie	Eigenschaften	Literatur
BxPC3	Histologisch gesichertes Adenokarzinom des Pankreaskörpers Gewonnen aus der Feinnadelbiopsie des Primärtumors einer 61-jährigen Patientin KRAS-Wildtyp und somit nicht RAS-aktiviert Homozygote Deletion des Tumorsuppressors SMAD 4	(Tan et al. 1986) (Deer et al. 2010)
PaCa 5061	Gewonnen aus dem Operationsresektat einer totalen Pankreatikoduodenektomie eines 63-jährigen Patienten Aktivierende Mutation im KRAS Keine Mutation von SMAD 4 beschrieben Hohes pulmonales Metastasierungspotential	(Kalinina et al. 2010)

Tab. 2: Zusammenfassende Charakterisierung der verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien

3.3.2 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) in RPMI 1640 medium (Gibco, Darmstadt, Deutschland) mit 10 % fetalem Kalbserum (FCS, Gibco), 50 U/ml Penicillin und 50 mg/ml Streptomycin kultiviert. Eine Kontamination der eingesetzten Zellkulturen mit Mykoplasmen wurde wiederholt mit Hilfe des VenorGeM®Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin) ausgeschlossen. Das PCR-basierte Testverfahren ist zum Nachweis der typischerweise in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen-Spezies geeignet.

3.3.3 Herstellung des ITGAV Knockdowns und Selektion mittels FACS

Die spezifische Genexpressionshemmung erfolgte durch die Transfizierung mit *small hairpin RNA* (shRNA) Sequenzen in einem Genexpressionsvektor. Transfizierte Klone mit stabil niedriger Restexpression wurden nachfolgend zum einen durch die Chemoresistenz gegenüber Puromycin (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und weiterhin durch die Sortierung mittels Durchflusszytometrie selektiert (Wicklein 2012). Die Quantifizierung einzelner Oberflächenmoleküle erfolgt unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper. Hierzu wurden die unter Standardbedingungen expandierten Zellen suspendiert und zentrifugiert (5min, 1500 U/min). Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Resuspension in 2 ml FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Mausantikörper gegen ITGAV (FITC anti-human ITGAV; Mouse igG2a, κ ; Cat. 327907, Biolegend, USA) für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Während der Präparationszeit wurden die Zellen bei 4° C auf Eis gehalten. Eine Differenzierung von lebenden und toten Zellen erforderte die Zugabe von 2 μ l Propidium Iodid (PI) (BD Bioscience). Analyse und Auswertung erfolgten unter Verwendung eines Durchflusszytometers (FACS-LSR Fortessa, BD Bioscience, San Jose, USA) sowie der geeigneten Software (FCS Express 4 Flow Cytometry, DeNovoSoftware). Nur Zellen mit einem Knockdown von mehr als 75 % wurden für die *in vivo* und *in vitro* Experimente verwendet.

3.3.4 Western Blot

Die Herstellung des Proteinlysates erfolgte auf Eis bzw. 4 °C. Zunächst wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) von dem Flaschenboden abgeschoben und in PBS gelöst. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten wurde das Zellpellet in RIPA-Puffer (50mM Tris HCl, pH 7.4; 150mM NaCl; 2mM EDTA; 1% NP-40; 0.1% SDS) homogenisiert, Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100) hinzugegeben und bei 20 000 g für 30 min bei 4 °C ultrazentrifugiert (Tischzentrifuge Universal 320 Cat. No. 1689-A, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels *Bicinchoninic-Acid-Assay* bestimmt. Prinzipiell reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen, wobei der dabei entstehende violette Farbkomplex bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm photometrisch erfasst werden kann (Smith et al.

1985, Reinard 2010). Zunächst wurde eine BSA (*bovine serum albumin*) - Standardreihe mit 1,5/ 1/ 0,75/ 0,5/ 0,25/ 0,125 mg/ml hergestellt. Zu 0,1 ml der Standards und 0,1 ml der Probe wird jeweils 2 ml des Working Reagent (Reagent A+B, Thermo Scientific) hinzugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C und Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Extensionsmessung durchgeführt und so die Proteinkonzentration bestimmt.

Für den Western Blot wurde ein Trenngel mit 6-%iger Acrylamid-Konzentration und ein 3-%iges Sammelgel eingesetzt. Zunächst wurde eine Proteinmenge mit einem Gewicht von 20 µg in die zuvor mit einem Kamm angelegten Probenfächer pipettiert. Anschließend wurde zur Elektrophorese eine Spannung von 55 V für 18 h angelegt. Der verwendete Längenstandard (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) markiert die Laufweite der Proteine. Für den Proteintransfer wurde das Wet-Blot-Verfahren auf Grund des Molekulargewichtes des ITGAV von 116 kDa ausgewählt. Zum Proteintransfer wird der Stapel aus Filterpapieren, Gel und der methanolaktivierten Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) (Immobilon P, Millipore, Eschborn, Deutschland) in einen mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt und die Proteine durch Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes mit einer anliegenden Stromstärke von 400 mA überführt. Nach dem Transfer werden die Membranen mit einer Blocklösung über Nacht abgesättigt, um anschließend mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen den C-Terminus der humanen ITGAV inkubiert zu werden (1:500, sc-376156, Santa Cruz, Dallas, USA). Als intrinsische Kontrolle der äquivalenten Proteinverteilung pro Probenfächer wurde β -Aktin (Sigma, St. Louis, USA) verwendet. Der entsprechenden Sekundärantikörper goat-anti-mouse IgG-HRP (1:8000, sc-2055, Santa Cruz) wurde mittels chemilumineszenter Reagenz (Super Signal Weste Pico Kit, Pierce, Rockford) auf Hyperfilm ECL films (GE-Healthcare, Freiburg, Deutschland) entwickelt. Die densitometrische Auswertung der sich abbildenden Banden erfolgte mit Hilfe der Java-basierten Software ImageJ (NIH, USA).

3.4 *In vitro* Charakterisierung

In den nachfolgenden *in vitro* Experimenten wurde die Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt. 10 µl der 10-fach verdünnten Zellsuspension wurden in die Zählkammer eingebracht und unter dem Lichtmikroskop gezählt. Da ein Volumen von 0,1 mm³ aufgefüllt wurde, muss zur Bestimmung der Zellzahl pro ml mit dem Faktor 10 000 sowie dem eingesetzten Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

3.4.1 Zellproliferationsassay

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatten wurden 3×10^3 Zellen je Napf ausgesät, da bei dieser Zellanzahl in Vorversuchen ein optimales Wachstum für die Versuchsdauer von 72 h ermittelt werden konnte. Nach 72 h unter Standardbedingungen wurden *XTT Labeling Reagent* und *Electron Coupling Reagent* in einem Verhältnis von 50:1 gemischt und jedem Napf hinzugefügt. Nach 5 Stunden erfolgte die Messung im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ (MR5000 Multiplate Reader, Dynatech, Denkendorf, Deutschland).

3.4.2 Colony-Forming-Assay

Zur Charakterisierung von Überleben und Zellproliferation wurde ein Colony-Forming-Assay durchgeführt. Eine Einzelzellsuspension mit 200 Zellen / ml wurde in einer 1:1 Mischung aus Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel (BD Biosciences) und Standardmedium in einer 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Mikrotiterplatte wurde 14 d bis zum Ausbilden einer Kolonie unter Standardbedingungen inkubiert. Zellansammlungen mit einer Größe von mehr als 50 Zellen wurden mikroskopisch ausgewertet (Franken et al. 2006, Benton et al. 2011, Yeung et al. 2010).

3.4.3 Zelladhäsion

Das Adhäsionsverhalten wurde unter statischen Bedingungen auf Matrigel und Fibronektin sowie bei physiologischen laminaren Flussbedingungen charakterisiert.

3.4.3.1 Statischer Zelladhäsionsassay auf Matrigel

Für die Untersuchung der statischen Zelladhäsion beschichtet man 96-Well-Mikrotiterplatten mit 5 mg / ml Matrigel (BD Matrigel, BD Biosciences). Nach initialer Aussaat von 3×10^4 Zellen pro Napf und einstündiger Inkubation wurde mit PBS gespült und im Anschluss die adhärennten Zellen mittels oben beschriebenem Zellproliferationsassay quantifiziert.

3.4.3.2 Statischer Zelladhäsionsassay auf Fibronectin

Zur Quantifizierung der Adhäsionsunterschiede unter statischen Bedingungen auf Fibronectin wurde ein entsprechend beschichteter μ -Slide eingesetzt (Fibronectin coated μ -Slide, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland). 1×10^5 Zellen wurden in einem Suspensionsvolumen von 60 μ l aufgebracht. Nach 1 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden positionsmarkierte Gesichtsfelder mit Hilfe eines inversen Mikroskops (Axiocam Farbkamera, Carl Zeiss, Jena, Germany) ausgezählt. Nach Waschen mit PBS wurde die Anzahl der verbliebenen adhärenen Zellen in den zuvor markierten Gesichtsfeldern bestimmt.

3.4.3.3 Zelladhäsion auf HPMEC unter physiologischen Flussbedingungen

Die Simulierung der Zelladhäsion unter physiologischen Scherstressbedingungen gelang wie von Richter et al. (2014) beschrieben. Hierzu wurde eine konfluente Einzelzellschicht humaner pulmonaler Endothelzellen (HPMEC) hergestellt und mittels Lichtmikroskopie verifiziert. Tumorzellen wurden in Standardmedium suspendiert (20 ml, 200 000 Zellen/ml) und mit einer Schärrate von 0,25 dyn/cm² in einem laminaren Fluss appliziert (Koutsiaris et al. 2007). Die Adhäsion einer Tumorzelle und dem Gefäßendothel wurde unter Zuhilfenahme eines inversen Mikroskops und der Software CapImage 8.5 program (Dr. Heinrich Zeintl, Heidelberg, Deutschland) erfasst.

3.4.4 Migrationsassay

Unterschiede in Migrationsverhalten der Zellen wurden mittels *FluoroBlok Migration Assay* (24-well 8 micron pore size inserts, BD Bioscience) ermittelt. Den Instruktionen des Herstellers folgend wurden die Tumorzellen trypsinisiert, zentrifugiert und in Standardmedium ohne fetalem Kalbserum resuspendiert. Nachdem die Zellkonzentration auf 300 000 Zellen / ml eingestellt wurde, wurde in die obere Kammer 400 μ l der Tumorzellsuspension pipettiert. Die untere Kammer wurde mit 1200 μ l Medium gefüllt, welches zu 10 % fetales Kalbserum als Chemoattraktanz enthielt (vgl. Abb. 6). Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Chemoattraktanz durch HBSS-Puffer ersetzt, welcher den Fluoreszenzfarbstoff Calcein AM 4 μ g/ml (Invitrogen, Carlsbad, USA) enthielt. Dieser wurde nach 1 h Inkubation bei einer Wellenlänge von $\lambda = 535$ nm im *Genios bottom-reading fluorescence plate reader* (Tecan, Männedorf, Schweiz) detektiert.

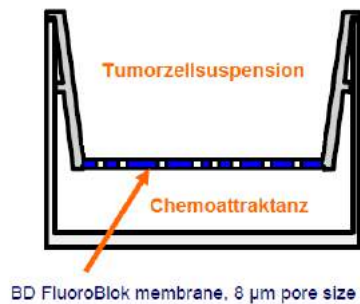


Abb.: 6 Schematische Darstellung des Migrationsassays (mod. n. Partridge 2010)

3.4.5 Invasionsassay

Um das invasive Potential zu vergleichen, verwendeten wir eine *24-Multiwell-insert-plate*, welche gleichmäßig mit Matrigel bedeckt ist, wie in Abb. 7 zur Darstellung kommt (BD BioCoat™ FluoroBlok™ Invasion System, BD Biosciences). Die im Vergleich zum Migrationsassay zusätzliche Schicht aus Matrigel stellt ein Migrationshindernis dar, dessen Überwindung Rückschluss auf das invasive Potential der Tumorzelle zulässt. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem des

Migrationsassays.

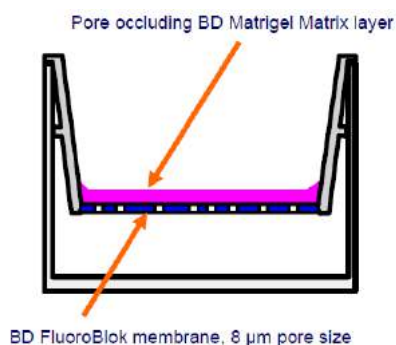


Abb.: 7 Schematische Darstellung des Invasionsassays (mod. n. Partridge 2010)

3.5 Xenograft-Mausmodelle

Zur Züchtung von homozygoten immun- sowie E- und P-Selektin-defizienten Mäusen wurde in der Forschungstierhaltung des UKE E- und P-Selektin-defiziente Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA, stock 002916) mit $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen auf einem C57Bl6 Hintergrund verpaart (Köhler et al. 2010, Gebauer et al. 2013). Das Gewicht aller im Experiment verwendeter Mäuse lag zwischen 21-29 g. Die pathogenfreien Tiere wurden bei Futter und Wasser ad libidum unter sterilen Bedingungen gehalten. Die Tötung der Mäuse erfolgte nach Injektion von Ketamin/Rompun-Narkoselösung mittels zervikaler Dislokation. Alle Tierversuche wurden in Einklang im den *UKCCR guidelines for the welfare of animal in experimental neoplasia* (Box & Fields 1998) durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit erforderlichen Tierexperimente wurde genehmigt und überwacht durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit, Verbraucherschutz (Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz; Billstraße 80, D-20539 Hamburg, Deutschland; Projektnummer G09/88 & G10/55).

3.5.1 Intraperitoneale Injektion

Für das intraperitoneale Modell wurden zunächst eine Kohorte aus 15 C57BL/6 $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen und zwei Kohorten aus jeweils 15 E- und P-Selektin-defizienten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen zusammengestellt. In einem zweiten Versuch wurden zur Untersuchung des additiven Effekts von ITGAV auf die Selektindefizienz 2 Kohorten aus E- und P-Selektin-defizienten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Versuchstieren gebildet. E- und P-Selektin-defizienten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen oder Kontrolltiere wurden mit den PaCa 5061 ITGAV kd Zellen oder Kontrollzelllinie inokuliert. 1×10^6 der wie im subkutanen Modell vorbereiteten Zellen wurden durch Punktion des linken Unterbauches in die Peritonealhöhle eingebracht. Nach Tötung an Tag 62 bzw. 77 erhoben wir zur Quantifizierung der Peritonealkarzinose den nach Sugarbaker et al. modifizierten Peritonealkarzinoseindex (*peritoneal carcinomatosis index*, PCI). Hierbei wird die Peritonealhöhle in 9 Areale unterteilt und für jeden Abschnitt in Abhängigkeit der Größe der peritoneales Aussaat 0-3 Punkte (*Lesion size score*, vgl. Abb. 8) vergeben. Der maximale PCI beträgt so 27 Punkte (Gebauer et al. 2013).

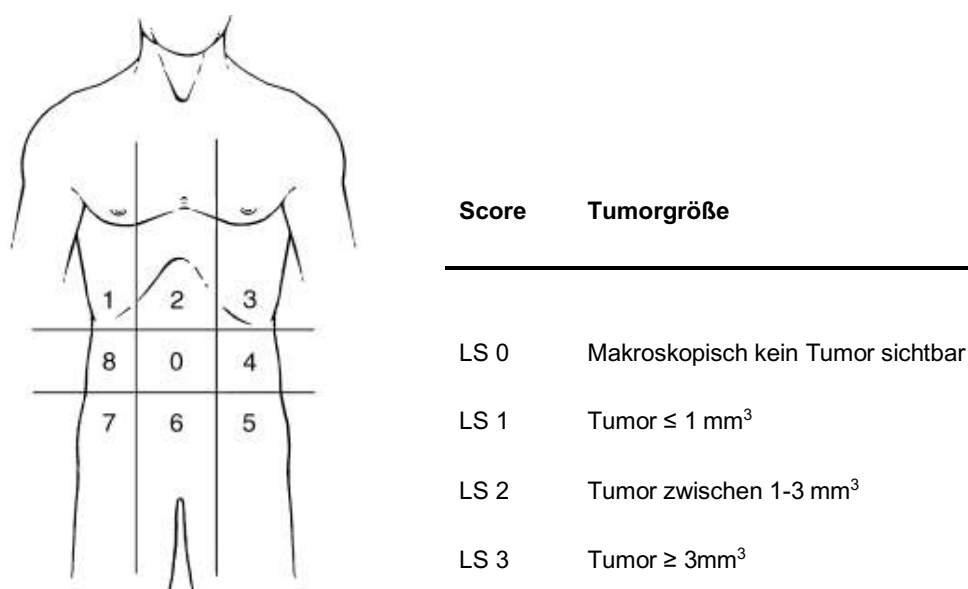


Abb. 8: Schematische Darstellung der Aufteilung der Peritonealhöhle und tabellarische Übersicht des *Lesion size score* (mod. n. Sugarbaker et al. 1999)

3.5.2 Subkutane Injektion

Im subkutanen Tiermodell wurden 40 C57BL/6 pfp^{-/-}/rag2^{-/-} Mäuse entsprechend der vier untersuchten Zellkulturen zufällig in vier Kohorten eingeteilt. Pro Tier wurden 1×10^6 mykoplasmenfreie Tumorzellen in einem Injektionsvolumen von 200 μl (RPMI 1640, Gibco) unter CO₂ Narkose subkutan injiziert. Sobald ein Primärtumorzellvolumen von mehr als 2 cm³ oder eine Hautulzeration festgestellt wurde, folgten Tötung des betroffenen Tieres, Entnahme von Blut und Knochenmark sowie Präparation von Lunge und Primärtumor. Das Primärtumorgewicht wurde mittels Feinwaage bestimmt.

3.5.3 Quantifizierung humaner Tumorzellen mittels ALU-PCR in Blut, Knochenmark und Lunge

Die zuvor kryokonservierten linken Lungenhälften wurden separat in der Kugelmühle (TissueLyser II, Qiagen, Venlo, Niederlande) homogenisiert und die DNA mittels *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben isoliert. Das Knochenmark wurde durch Spülen des rechten Femurs und der Tibia mit 1 ml NaCl 0.9% gewonnen. 200 µl dieser Suspension wurden der DNA-Isolation zugeführt. Nach selbigem Protokoll isolierten wir die DNA aus 200 µl Blut, welche zuvor durch eine kardiale Punktion gewonnen wurde. Die DNA-Konzentrationen aller Proben wurden mit dem NanoDrop Spektrophotometer (Peglab, Erlangen, Deutschland) bestimmt, welche anschließend auf 30 ng / µl mit AE buffer (Qiagen) genormt wurde. Eine Normierung der DNA aus Blutproben war nicht notwendig, da sich diese bei etwa 10 ng/µl konstant verhält (Gebauer et al. 2014).

Zwei µl der standardisierten DNA-Proben wurden als *Template-DNA* für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) (LightCycler 2.0 System) eingesetzt. Dem insgesamt 10 µl messende Reaktionsvolumen wurden Taq-DNA-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, Taq-PCR-Puffer, der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, Desoxynukleotide (dNTP) und 1 mmol/l MgCl₂, welches die Aktivität der DNA Polymerase erhöht, zugeführt (LightCycler Fast Start DNA MasterPLUS SYBR- Green I kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Abschließend erfolgte die Zugabe von 10 pmol humanspezifische Primer (Forward Alu Primer: TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA; Reverse Alu Primer: GCC ACTACG CCC GGC TAA TTT, BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland). Die eingesetzten ALU-Primer binden humanspezifische Alu-Sequenzen und kommen in Nagern nicht vor. Die Thermozyklen, für Denaturierung (95°C), Anlagerung der Primer (67°C), Elongation (72°C) entsprachen den etablierten Darstellung in Nehmann et al. (2010) und wurden 50-mal wiederholt. Die photometrische Quantifizierung erfolgt am Ende jedes Zyklus in Echtzeit. Zur Bestimmung der Anzahl disseminierter Tumorzellen im Probergewebe wurde eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde DNA aus BxPC3 bzw. PaCa 5061 isoliert und in definierten Verdünnungen amplifiziert (Nehmann et al. 2010, Reinard 2010).

3.6 Genexpressionsanalyse der Primärtumore

Um die Veränderungen der ITGAV kd Primärtumore im Vergleich zur Kontrolle auf Ebene der Genexpression zu untersuchen, wurde zunächst die RNA aus den kryokonservierten Primärtumorproben mit einem Extraktionskit, gemäß den Angaben des Herstellers (miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Deutschland), extrahiert. Die RNA-Konzentrationen wurde mit dem Nanodrop-Photometer (NanoDrop, Wilmington, USA) bestimmt und die Qualität mittels Bioanalyser 2100 System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) beurteilt. Für die Genexpressionsanalyse wurden nur Proben verwendet, deren *RNA integrity number* (RIN) größer als 7 war. Anschließend wurde die Genexpression in Relation zur korrespondierenden Kontrolle beurteilt. Prinzipiell wird hierzu die isolierte mRNA der zu vergleichenden Gewebeproben mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dazu wurde das *Ambion® WT Expression Kit (Applied Biosystems for Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) Expression Arrays)*, der Anleitung des Herstellers folgend, mit 500 ng RNA Ausgangsmaterial verwendet. Die synthetisierte cDNA wurde nun vollautomatisch auf den DNA-Microarray (Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array, Affymetrix, Santa Clara, USA) aufgebracht, das resultierende Fluoreszenzverhältnis mit einem Microarray-Scanner detektiert und mittels *Bioconductor package limma* (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet (Reinard 2010). Die Genexpressionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit dem National Medical Research Radiological Center in Moskau, Russland durchgeführt. Die so ermittelten Regulationen einzelner Gene wurden anschließend softwaregestützt mit "ReactomeFIViz" hinsichtlich ihres funktionelles Kontextes analysiert (Tsui et al. 2007, Wu et al. 2014).

3.7 Statistik

Unter Zuhilfenahme von SPSS Statistics for Mac OS (Version 20, SPSS Inc., Chicago, IL USA) wurde zur Auswertung des TMA der Chi-Quadrat- und der Exakte Fisher-Test eingesetzt. So wurde eine Korrelation zwischen immunologischer Markierung und den Parametern der eingeschlossenen Patienten geprüft. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Wenn nicht anders angegeben wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test berechnet und als signifikant betrachtet, wenn sich p -Werte $< 0,05$ ergaben. Bedingung für den T-Test ist, dass für die zu vergleichenden Parameter eine Normalverteilung angenommen werden kann. War dies nicht der Fall, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Dieser beurteilt, ob sich die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben unterscheiden. P -Werte $< 0,05$ wurden auch hier als statistisch signifikant bewertet. Zur Überlebenszeitanalyse wurde das Kaplan-Meier-Verfahren eingesetzt. Hiermit können Überlebensraten und die mediane Überlebenszeit deskriptiv bestimmt werden. Ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Kaplan-Meier-Kurven vorliegt, beantwortet der Log-rank-Test, welcher die Überlebensraten vergleicht und bei einem p -Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied nachweist (Zwiener et al. 2011).

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Färbung von Hyaluronan

Als Positivkontrolle und Verifizierung der Färbung von Hyaluronan ist humane Concha Nasalis geeignet (Fuhrmann et al. 2015). Schnitte dieser wurden mit dem von Cheng et al. (2013) verwendeten polyklonalen Antikörper (vgl. Abb. 9 A) und dem *Hyaluronan Bindig Protein* (HABP) angefärbt. Unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers werden intra- und extrazelluläre Bestandteile angefärbt. Trotz Vorbehandlung mit Hyaluronidase bleibt das Anfärbemuster unverändert (vgl. Abb. 9 B). Setzt man zur Färbung HABP ein, so ist das resultierende Anfärbemuster streng auf extrazelluläre Anteile begrenzt (vgl. Abb. 9 C) und nach Vorbehandlung mit Hyaluronidase aufgehoben (vgl. Abb. 9 D). Hyaluronan lässt sich durch HABP hochspezifisch anfärben.

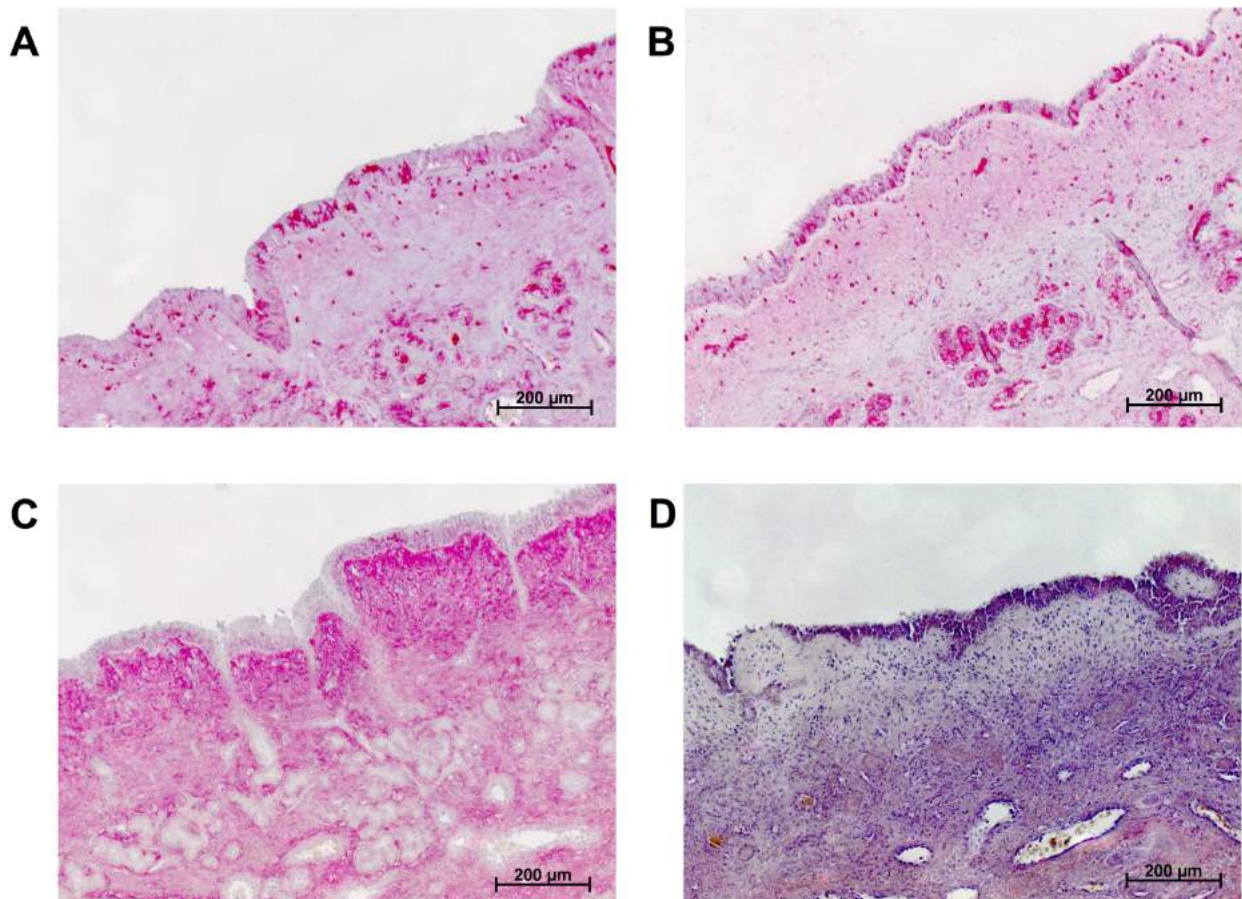


Abb. 9: Färbung von Hyaluronan in der humanen concha nasalis mittels polyklonalem Antikörper (A) und nach Hyaluronidase Vorverdauung (B), worunter das Anfärbemuster unverändert bleibt. Die Färbung mit HABP ist streng extrazellulär (C) und nach Hyaluronidase Vorbehandlung aufgehoben (D).

4.2 Spezifische Färbung von Hyaluronan auf Tissue-Microarray und Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern

Die Expression von Hyaluronan wurde in 184 Tumorproben untersucht (vgl. Abb. 10). 19 (9,4%) der Gewebeproben waren nicht auswertbar, da die Gewebestanze nur unvollständig übertragen wurde oder kein Tumorgewebe enthielt. Fünf Patienten verstarben an frühpostoperativen Komplikationen und wurden daher aus der Analyse ausgeschlossen (2,7 %). Das mediane Alter der untersuchten Population betrug 63,4 Jahre. 103 Patienten waren männlich (56,0 %), 81 Patienten weiblich. Bei allen Patienten wurden eine Duodenopankreatektomie durchgeführt. Hierbei konnte bei 140 Patienten (72,2 %) eine R0-Resektion durchgeführt werden. Bei 44 Patienten (27,8 %) verblieb eine R1-Situation. 162 Patienten (88,8 %) erhielten eine adjuvante Chemotherapie. Ein neoadjuvantes Therapiekonzept wurde nicht eingesetzt. Von den eingeschlossenen 184 Tumoren, exprimierten 162 Tumore (86, 4%) Hyaluronan im Tumorstroma.

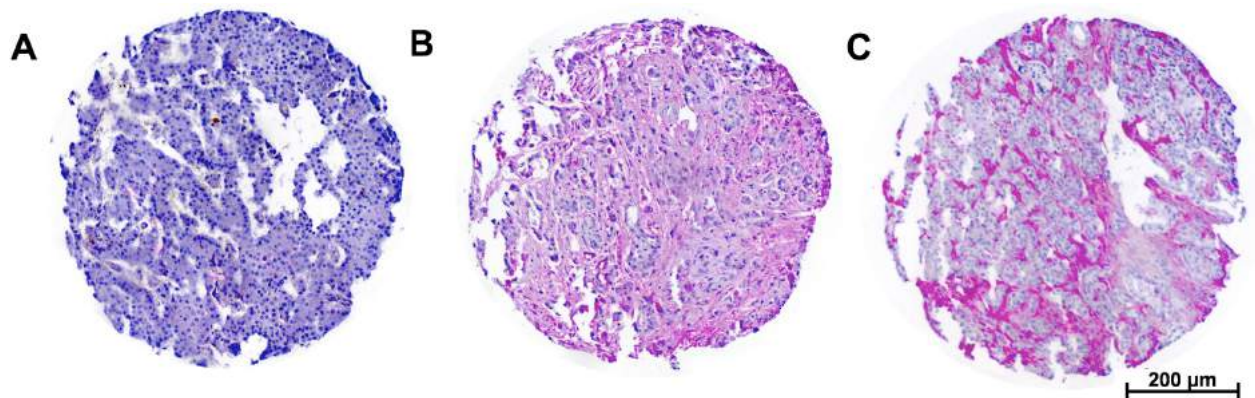


Abb. 10: Exemplarisch abgebildete Tumorproben ohne Expression von Hyaluronan (A) sowie Proben mit moderater (B) und starker Anfärbung (C). Das Anfärbemuster ist streng extrazellulär. Die Tumorzellen selbst zeigen keine Anfärbung.

Die Expression von Hyaluronan korreliert mit der Primärtumorgröße. So exprimieren die Tumore häufiger Hyaluronan, desto größer sie sind ($P = 0,046$). Das mediane Überleben aller Patienten betrug 14,0 Monate (95%CI 11.7 – 16.3 Monate). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Kohorten, wie in Abb. 11 dargestellt. So erreichten Patienten mit Hyaluronan positiven Tumoren ein medianes Überleben von 16,0 Monaten (95%CI 12.9 – 19.2 Monate). Für Patienten mit Hyaluronan negativen Tumoren betrug das mediane Überleben 14,0 Monate (95%CI 11.5 – 16.5 Monate, $P = .549$). Zu den weiteren erhobenen klinischen und pathologischen Parametern besteht keine Korrelation.

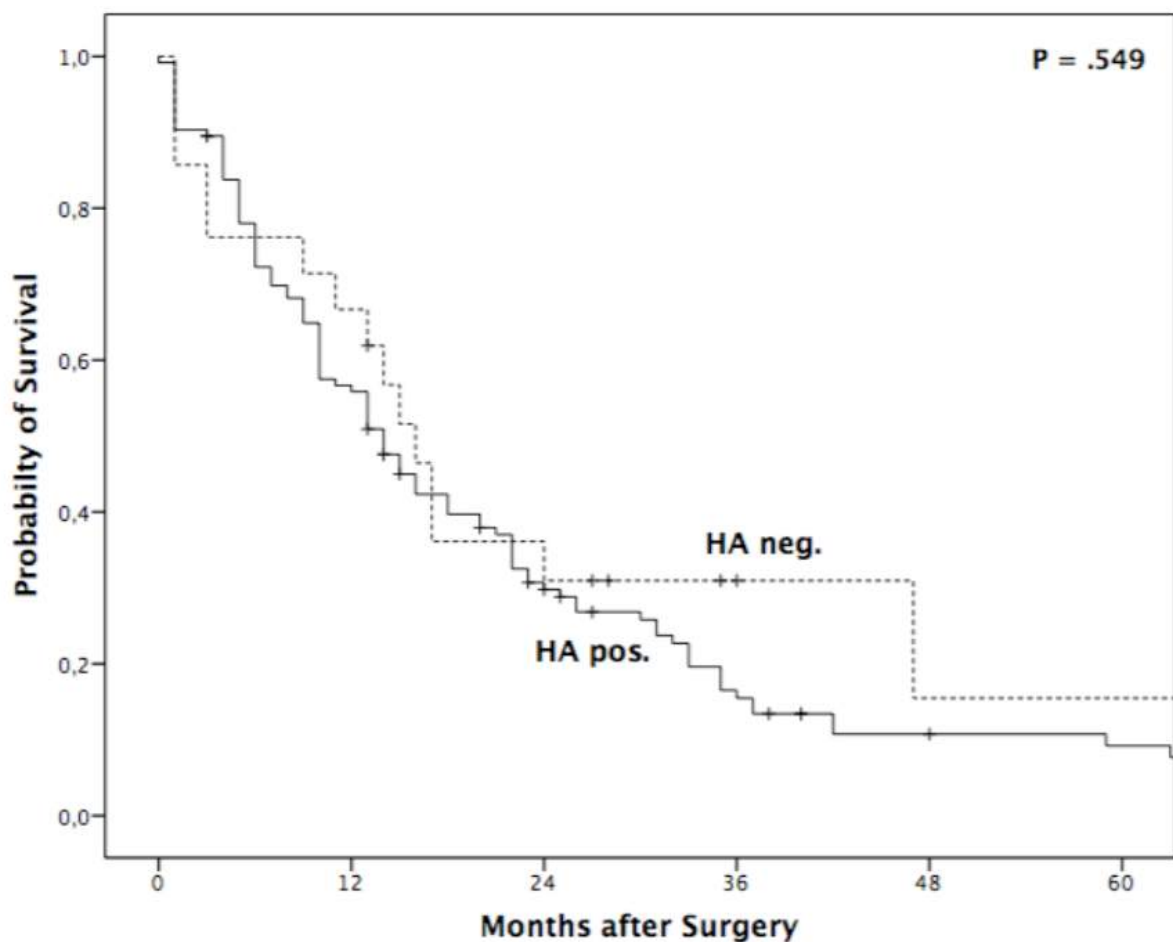


Abb. 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patienten mit Hyaluronan positiven und negativen Primärtumoren. Das mediane Überleben aller Patienten betrug 14,0 Monate (95%CI 11.7 – 16.3 Monate). Zwischen den Kohorten besteht kein signifikanter Unterschied ($P = 0,549$).

4.3 Färbung von ITGAV auf Tissue-Microarray und Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern

Die Expression von ITGAV wurde in 161 Fällen untersucht. Hierbei konnte eine positive Korrelation zum Tumorstadiums des Primärtumors nachgewiesen werden ($P = 0,048$), wie in Abb. 12 zur Darstellung kommt.

Kreuztabelle

			pT				Gesamt
			1	2	3	4	
ITGAV	,00	Anzahl	0	22	64	5	91
		% innerhalb von pT	0,0%	52,4%	59,8%	71,4%	56,5%
		% der Gesamtzahl	0,0%	13,7%	39,8%	3,1%	56,5%
	1,00	Anzahl	5	20	43	2	70
		% innerhalb von pT	100,0%	47,6%	40,2%	28,6%	43,5%
		% der Gesamtzahl	3,1%	12,4%	26,7%	1,2%	43,5%
Gesamt		Anzahl	5	42	107	7	161
		% innerhalb von pT	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	3,1%	26,1%	66,5%	4,3%	100,0%

Abb. 12: Die Expression von ITGAV korreliert positiv mit dem Primärtumorstadium ($P = 0,48$).

Die in Abhängigkeit von der Expression von ITGAV erstellten Kaplan-Meier-Überlebenskurven sind in Abb. 13 dargestellt. Das mediane Überleben der ITGAV positiven Kohorte ist mit 11 Monaten gegenüber der ITGAV negativen Kohorte mit 18 Monate signifikant verkürzt ($P = 0,046$). Patienten mit ITGAV positiven Tumoren weisen somit ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben auf. Darüber hinaus konnte keine weitere Korrelation der Expression mit klinisch und pathologisch erhobenen Parametern nachgewiesen werden.

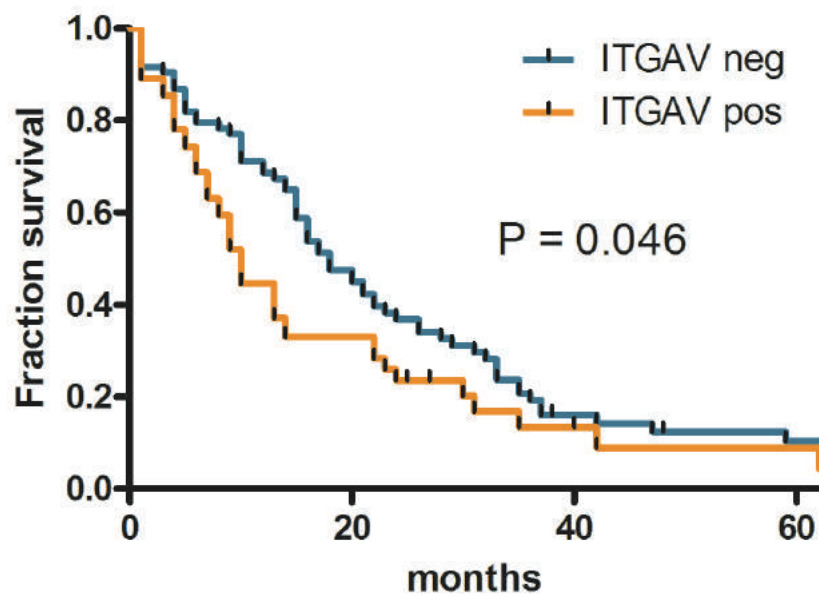


Abb. 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patienten mit ITGAV positiven und negativen Primärtumoren. Das mediane Überleben von Patienten mit ITGAV positiven Tumoren ist signifikant verkürzt.

4.4 Verifizierung des ITGAV-Knockdowns in BxPC3 und PaCa 5061 Zellen

Die shRNA-Transfizierung zum Knockdown von ITGAV wurde zunächst durchflusszytometrisch *in vitro* mittels FACS verifiziert. Zelltrümmer und tote Zellen wurden in einem Gatingverfahren mittels PI-Markierung aus der nachfolgenden Untersuchung ausgeschlossen. Der in Abb. 14 A und B zu erkennende Fluoreszenzshift, der auf der X-Achse aufgetragenen Fluoreszenzaktivität, visualisiert die verminderte Expression von ITGAV an der Zelloberfläche. Der Knockdown lässt sich nach Subtraktion der entsprechenden Isotypenkontrolle aus dem Quotienten der medianen Fluoreszenzaktivität der Knockdownzelllinie und Kontrollzelllinie bestimmen. Folglich ergibt sich für BxPC3 ITGAV kd Zellen eine Restexpression 21 % und für PaCa 5061 ITGAV kd Zellen eine Restexpression von 24 %.

Im Western Blot wird ITGAV entsprechend seines Molekulargewichts bei 116 kDa lokalisiert und markiert, wie in Abb. 14 C dargestellt. Als Maß der äquivalenten Proteinverteilung bzw. als Referenz zur Normalisierung bei der nachfolgenden Quantifizierung wurde β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa verwendet. Bestimmt man aus den normalisierten Werten die prozentuale Reduktion von ITGAV mittels ImageJ ergibt sich für BxPC3 eine Restaktivität von 4,39 % und für PaCa5061 1,58 %.

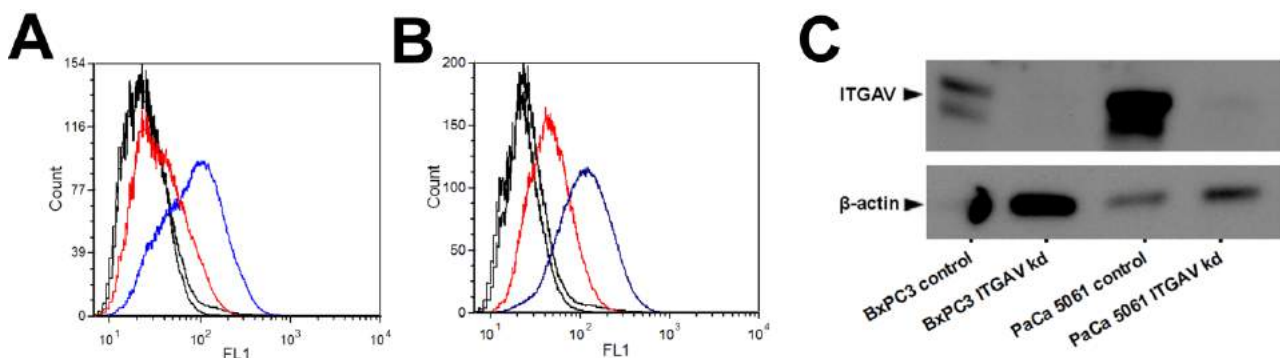


Abb.: 14 Verifizierung und Quantifizierung des ITGAV-Knockdowns auf Zellkulturebene mittels FACS und Western Blot. Die blau dargestellte Fluoreszenzaktivität von BxPC3 ITGAV kd Zellen (rot, $\hat{x} = 32$) zeigt gegenüber BxPC3 Kontrollzellen (blau, $\hat{x} = 87$) einen ausgeprägten Fluoreszenzshift in der FACS-Analyse (A). Ebenso ließ sich für PaCa 5061 ITGAV kd Zellen und PaCa 5061 Kontrollzellen ein Fluoreszenzshift nachgewiesen (B, blau: PaCa 5061 Kontrollzellen, $\hat{x} = 87$; rot: BxPC3 ITGAV kd, $\hat{x} = 37$) Die Isotypenkontrollen kommen schwarz zur Darstellung. Im Western Blot zeigte sich für die Knockdownzelllinien eine minimale Restexpression von ITGAV (C).

Die immunhistochemische Darstellung von ITGAV in vitalem Gewebe der Primärtumore, welche durch mindestens zwei erfahrene Betrachter beurteilt wurde, zeigt für die Kontrollgruppe die für ITGAV typische cytoplasmatisch membranöse Verteilung bei moderater bis hoher Intensität. Der Zellkern bleibt dabei ausgespart (vgl. Abb. 15 A, C). In den Knockdowntumoren zeigt sich ebenfalls eine cytoplasmatische membranöse Anfärbung, wobei nur eine schwache Intensität vorliegt (vgl. Abb. 15 B, D). Die Isotypenkontrolle zeigt keine Bindung. Folglich kann angenommen werden, dass der Knockdown von ITGAV nach Implantation und Terminierung des Tierversuches im Primärtumor auf einem stabil niedrigen Niveau *in vivo* verbleibt.

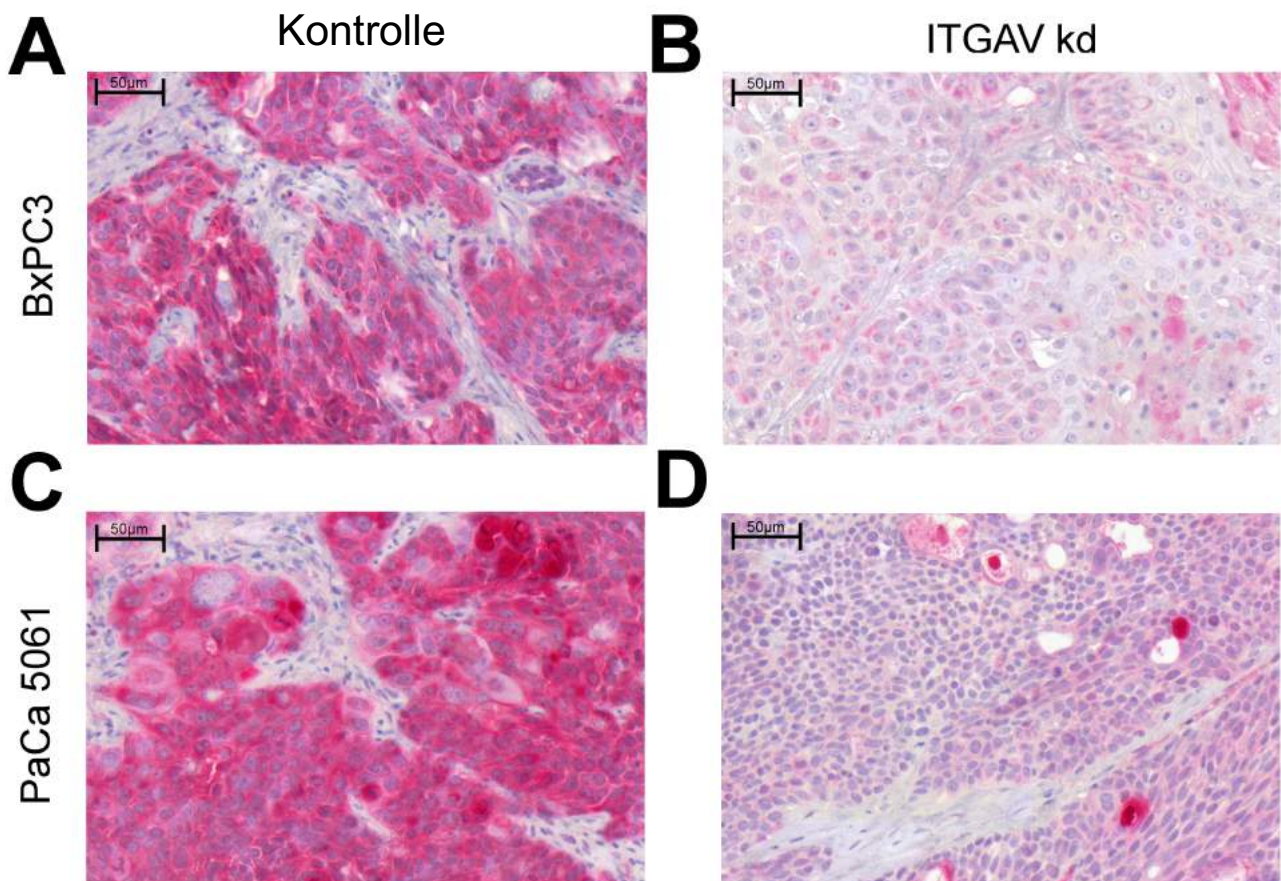


Abb. 15: Immunhistochemische Färbung von ITGAV der in der Maus subkutan gewachsenen Primärtumoren. BxPC3 Kontrolltumore (A) und PaCa 5061 Kontrolltumore (C) zeigen im Gegensatz zu BxPC3 ITGAV kd Tumore (B) und PaCa 5061 ITGAV kd Tumore (D) die für ITGAV typische cytoplasmatisch membranöse Verteilung bei moderater bis hoher Intensität.

4.5 *In Vitro* Charakterisierung des ITGAV Knockdowns in BxPC3 und PaCa 5061

Zunächst wurden die Auswirkungen des ITGAV Knockdowns auf das Proliferationsverhalten der PDAC-Zelllinien im XTT-Assay untersucht. Für BxPC3 Kontrollzellen ergaben sich, mittels Standardreihe berechnet, für die relative Fluoreszenzintensität ein arithmetisches Mittel von 0,499 mit einer Standardabweichung (SEM, standard error of the mean) von 0,008. Im Vergleich ließen sich für BxPC3 ITGAV kd Zellen ein Mittelwert von 0,481 (SEM = 0,009) erfassen. Für PaCa5061 Kontrollzellen ergab sich im Mittel 0,562 (SEM = 0,014). Korrespondierend bestimmten wir für PaCa 5061 ITGAV kd Zellen einen Mittelwert von 0,535 (SEM = 0,010). Im ungepaarten T-Test ergab sich weder eine Signifikanz für BxPC3 noch für PaCa5061, so dass sich im Proliferationsassay keinen Hinweis auf eine veränderte Proliferation finden lässt. Die Ergebnisse des Zellproliferationsversuchs für Knockdown- und Kontrollgruppen sind in Abb. 16 A graphisch dargestellt.

Im Colony-Forming-Assay konnte gezeigt werden, dass die ITGAV Knockdown Zellen pro Napf signifikant mehr Kolonien induzieren als die korrespondierende Kontrolle ($P < 0,001$). Dies gilt für das diskoide Wachstum als auch für das kugelförmige, wobei die Zellen trotz ausgeprägter Kontaktinhibition proliferieren. Der Knockdown von ITGAV steigert das Potential der Zellen Kolonien in Matrigel auszubilden, bzw. befähigt sie im Falle von PaCa 5061 dazu, wie in Abbildung 16 B zur Darstellung kommt.

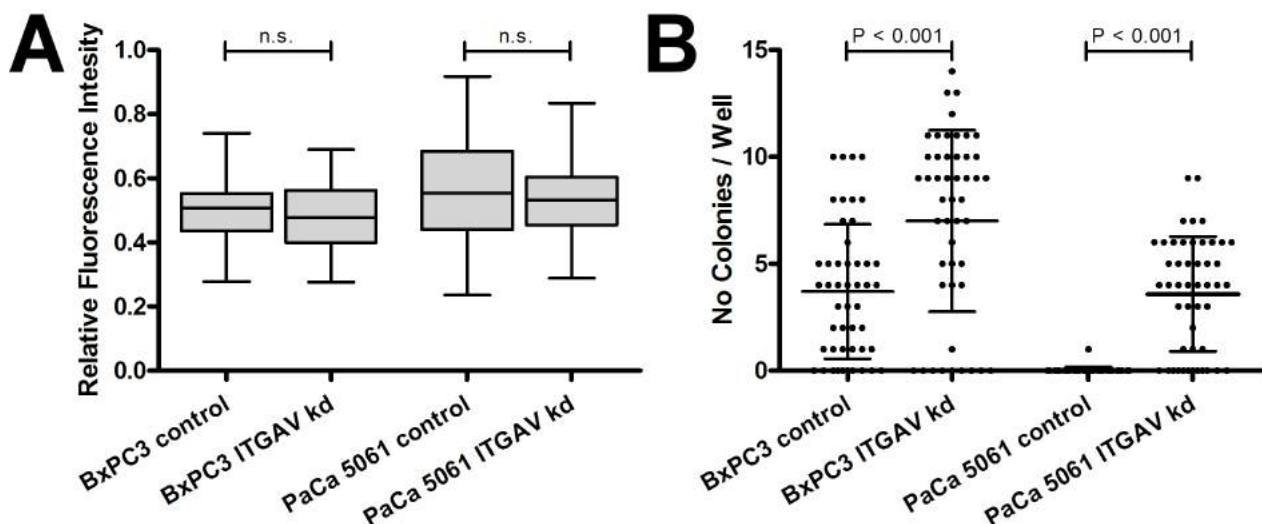


Abb. 16 A Proliferationsassay: Der Proliferationsassay zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den ITGAV Knockdowngruppen und der jeweiligen Kontrollgruppe. **B Colony-Forming-Assay:** Der Knockdown von ITGAV steigert das Potential der Zellen Kolonien in Matrigel auszubilden.

Das Adhäsionsverhalten der vier Zelllinien wurde unter statischen und dynamischen Bedingungen analysiert. Der Zellumsatz der nach einstündiger Inkubation auf Matrigel adhären Zellen wurde in Analogie zum XTT-Proliferationstest ermittelt und als indirektes Maß für die Anzahl an adhäsiven Zellen gewertet. Hierbei ergab sich für BxPC3 ITGAV kd Zellen für die relative Fluoreszenzintensität ein arithmetisches Mittel von 1,09 (SEM = 0,02) welche im Vergleich zur BxPC3 Kontrollzellen mit einem Mittelwert von 1,18 (SEM = 0,02) bei $P < 0,001$ signifikant reduziert ist. Es lässt sich folgern, dass die Adhäsion für BxPC3 durch den Verlust von ITGAV vermindert ist. Für PaCa 5061 Zellen bildet sich hier kein signifikanter Unterschied ab, wie in Abbildung 17 A dargestellt wird.

Bei der Untersuchung der statischen Adhäsion auf Fibronektin konnte in der mikroskopischen Darstellung nach Ablauf der Inkubation eine Adhärenz beobachtet werden. Positionsmarkierte Gesichtsfelder wurden vor und nach dem Spülen ausgezählt. Für BxPC3 ITGAV kd Zellen ergab sich mit durchschnittlich 6,36 % (SEM = 0,88 %) ein mit $P = 0,025$ signifikant geringeren Anteil adhären Zellen als für die Kontrolle mit 10,95 % (SEM = 1,39 %). Der Anteil an adhären PaCa 5061 Kontrollzellen betrug durchschnittlich 39 % (SEM = 8 %). Die Zellen der Knockdownzelllinie adhären mit 12 % im Mittel (SEM = 3 %) signifikant seltener ($P = 0,025$) (vgl. Abb. 17 B). Somit ist die Adhäsion der Knockdownzelllinien auf Fibronektin ebenfalls reduziert.

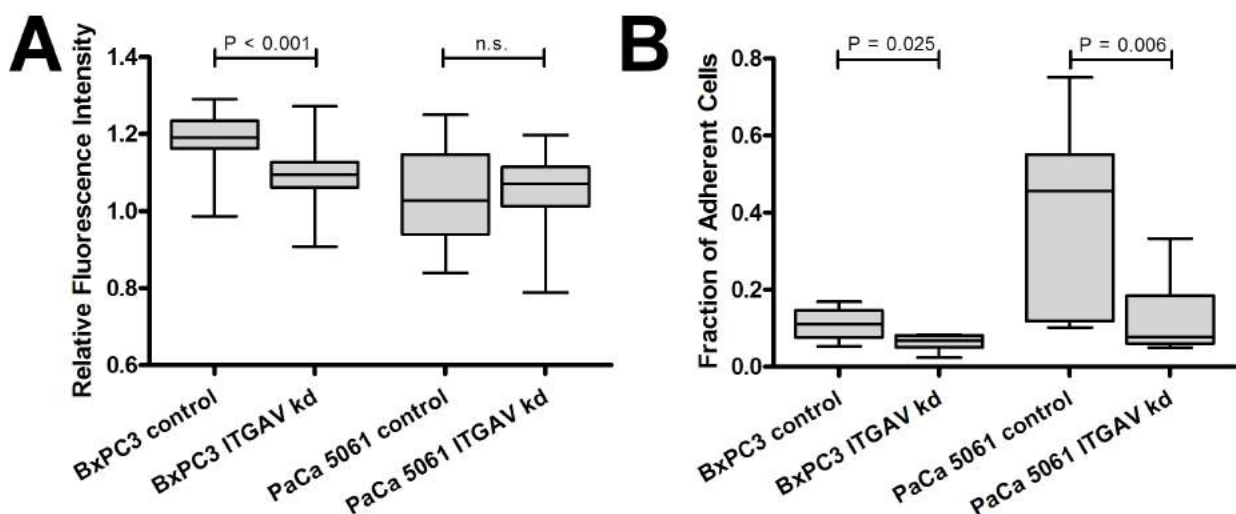


Abb. 17: Vergleichende Untersuchung der Adhäsion auf Fibronektin und Matrigel unter statischen Bedingungen. A: Die Adhäsion von BxPC3 Zellen auf Matrigel ist durch den Verlust von ITGAV reduziert. Für PaCa 5061 Zellen bildet sich kein signifikanter Unterschied ab. **B:** Die statische Adhäsion der Knockdownzellen auf Fibronektin ist im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert.

Bei der Adhäsion unter Flussbedingungen wurde die Summe der unterschiedlichen Adhäsionsphänomene, *Adhesion*, *Rolling* und *Tethering* gebildet. Hierbei zeigte sich selbst bei geringer Scherrate von $0,25 \text{ dyn/cm}^2$ kein quantitativ zu erfassender signifikanter Unterschied.

Im Migrationsassay wurde das Potential der Tumorzellen zur Tumorzellmigration verglichen. Hierbei ergab sich, wie in Abb. 18 A dargestellt für BxPC3 Kontrollzellen eine mittlere relative Fluoreszenzintensität, der in den unteren Napf migrierten Zellen, von 36962 RFU (SEM = 2984) und für die entsprechende ITGAV Knockdownzelllinie ein Mittelwert von 7001 RFU (SEM = 259), welche sich mit $P < 0,001$ signifikant unterschied. PaCa 5061 Kontrollzellen wiesen im Mittel eine Fluoreszenzintensität von 14954 RFU (SEM = 518) auf und zeigten so eine mit $P < 0,001$ signifikant höhere Fluoreszenz als die PaCa5061 Knockdownzellen mit 7681 RFU (SEM = 583). Folglich wurde das Potential zur Tumorzellmigration für BxPC3 und PaCa 6061 Zellen durch den Knockdown von ITGAV vermindert.

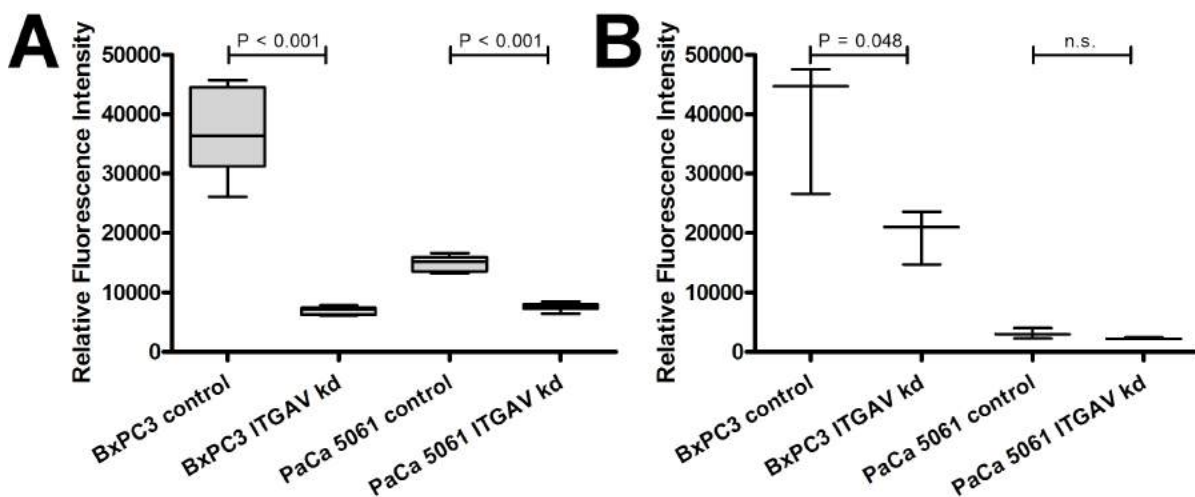


Abb. 18 A: Das im Migrationsassay erfasste Potential zur Tumorzellmigration für die untersuchten PDAC-Zelllinien ist durch den Knockdown von ITGAV vermindert. **B** Der Invasionsassay ergibt, dass das invasive Potential für BxPC3 Zellen durch die verminderte Expression von ITGAV reduziert ist. Aus der im Vergleich deutlich niedrigeren relativen Fluoreszenzintensität für PaCa 5061 lässt sich folgern, dass PaCa 5061 Zellen die Schicht aus Matrigel nicht überwinden können.

Im Invasionsassay, welcher mit der Evaluierung des invasiven Potentials Rückschlüsse auf das zu erwartende Metastasierungsverhalten zulässt, bilden sich die untersuchten Zelllinien wie folgt ab. Für BxPC3 Kontrollzellen wurde eine mittlere relative Fluoreszenzintensität von 39623 RFU (SEM = 6558) gemessen. Bei BxPC3 ITGAV kd Zellen lag diese bei 19762 RFU (SEM=2636) und ist mit $P = 0,048$

signifikant vermindert. Daraus kann geschlossen werden, dass das invasive Potential von PaCa 5061 Zellen durch die verminderte Expression von ITGAV reduziert ist. Eine im Vergleich zu BxPC3 Zellen deutlich geringere Fluoreszenz zeigte sich für PaCa 5061 Zellen. Hier ist anzunehmen, dass sowohl die Zellen der Knockdownzelllinie als auch die Zellen der Referenzzelllinien die Barriere aus Matrigel nicht überwinden können.

4.6 Xenograft-Tiermodelle

4.6.1 Intraperitoneales Xenograft-Mausmodell

Um den funktionellen Einfluss von ITGAV auf die peritoneale Metastasierung des PDAC zu untersuchen, verwendeten wir ein intraperitoneales Xenograft Tiermodell mit PaCa 5061 Zellen, wie in Kap. 3.5.1 beschrieben. Hierbei kamen selektindefiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ Mäuse zum Einsatz, um einen möglichen additiven Effekt des vermindert exprimierten ITGAV zu dem Verlust der Selektine nachzuweisen. Der Endpunktversuch wurde beendet, sobald ein Tier die Abschlusskriterien erfüllte. Es folgte die Sektion der Tiere und Bewertung der Peritonealkarzinose.

Zunächst wurden PaCa 5061 Knockdown- und Kontrollzellen in $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ bzw. selektindefiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ Versuchstiere intraperitoneal injiziert. Das Experiment wurde nach 61 Tagen beendet und anschließend der modifizierte Peritonealkarzinoseindex (PCI) erhoben. In diese Auswertung eingeschlossen wurden Versuchstiere mit peritonealer Karzinose oder ausgebildetem Einstichtumor, so dass sicher von einem Anwachsen der Tumorzellen im Wirtstier ausgegangen werden kann.

Hier ergibt sich für die mit PaCa 5061 Kontrollzellen inokulierten selektindefiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ Mäuse im Mittel ein PCI von 12,92 (SEM = 1,672). Für die PaCa 5061 ITGAV kd Zellen auf $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ ergibt sich ein mit $P < 0,001$ im Vergleich zur ersten Gruppe signifikant reduzierter PCI mit einem Mittelwert 0,07 (SEM = 0,07), wie in Abb. 19 A zur Darstellung kommt. Selektindefiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ Mäuse, die mit PaCa 5061 ITGAV kd Zellen inokuliert wurden, bildeten nach 62 Tagen keine intraperitoneale Karzinose aus. Zusammenfassend führt der Knockdown von ITGAV zur einer signifikanten Abnahme der peritonealen Metastasierung. Ein additiver Effekt durch die verminderte Expression von ITGAV und der Selektindefizienz konnte nach 62 Tagen nicht nachgewiesen werden.

Daher wurde ein zweiter intraperitonealer Versuch durchgeführt, wobei PaCa 5061 ITGAV kd Zellen in $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ und selektindefiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ injiziert wurden. Die Abbruchkriterien dieses Endpunktversuches wurden erst nach 77 d erreicht. Die Auswertung des PCI zeigt eine zusätzliche Reduktion der intraperitonealen Aussaat

in selektindefizienten Tieren von 3,125 (SEM = 1,043) auf 0,07 (SEM 0,03), wie in Abb. 19 B zur Darstellung kommt ($P < 0,017$).

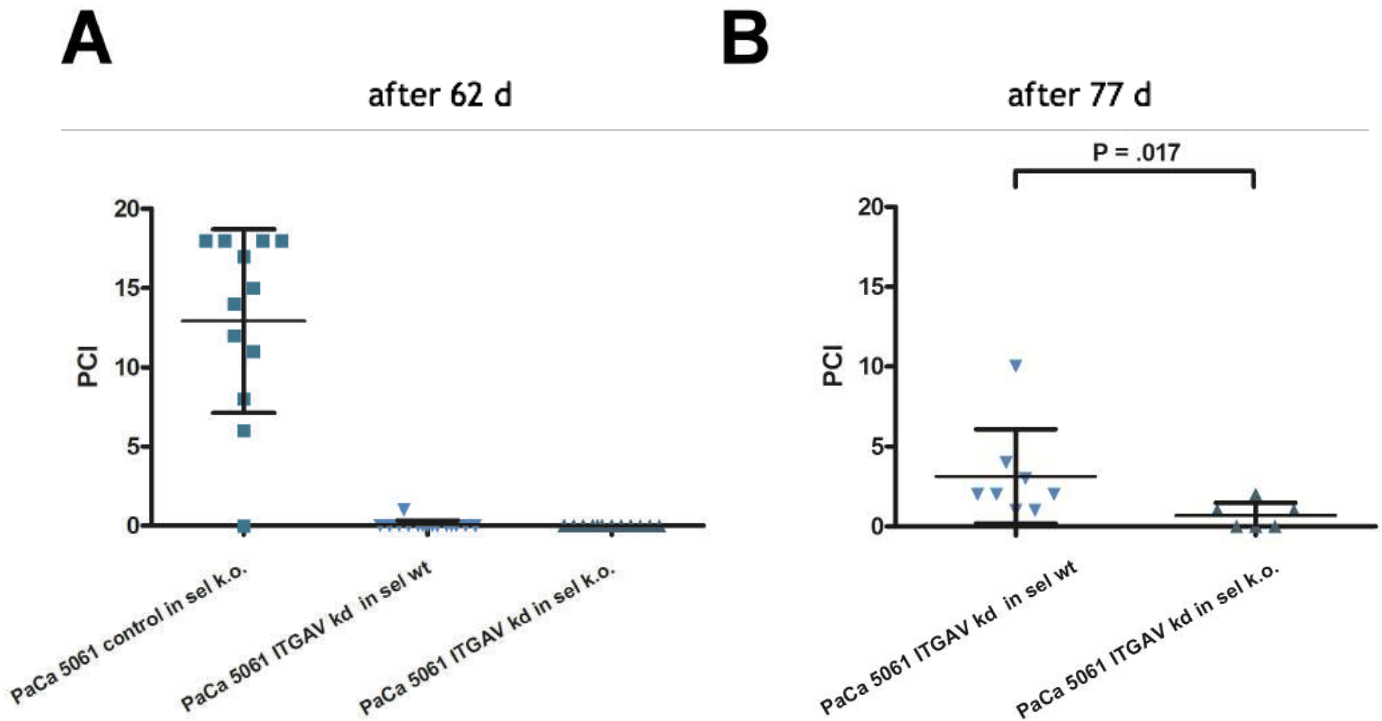


Abb. 19: Auswertung der peritonealen Metastasierung von PaCa 5061 Kontrollzellen und ITGAV kd Zellen auf *pfp*^{-/-}/*rag2*^{-/-} und selektindefizienten *pfp*^{-/-}/*rag2*^{-/-}. **A:** Der Knockdown von ITGAV in den Tumorzellen führt nach 62 Tagen zu einer signifikanten Abnahme der peritonealen Metastasierung. **B:** Additiver Effekt des ITGAV Knockdowns zur Selektindefizienz auf die Peritonealkarzinose nach 77 Tagen.

4.6.2 Subkutanes Xenograft-Tiermodell

4.6.2.1 Überlebenszeitanalyse und Primärtumorwachstum

Die funktionelle Analyse von ITGAV im PDAC hinsichtlich des Primärtumorwachstums und Fernmetastasierung erfolgte im subkutanen Tiermodell auf $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ Mäusen. Sobald ein Tier die Abbruchkriterien erreichte, folgten Tötung und Aufbereitung der Organe.

Für die funktionelle Analyse von ITGAV in den BxPC3 Zellen ergaben sich folgende Ergebnisse. Innerhalb der ITGAV kd Gruppe musste ein Tier vorzeitig ausgeschlossen werden (ohne Tumornachweis spontan verstorben). Alle verbleibenden mit BxPC3 Zellen inokulierten Tiere entwickelten einen Primärtumor, so dass sich für BxPC3 Zellen eine Anwachsrate von 100% ergibt. Die mit BxPC3 ITGAV kd Zellen inokulierte Kohorte zeigte mit einem medianen Überleben von 74 Tagen gegenüber der Referenzkohorte mit 99 Tagen ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($P < 0,001$). Die Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier ist in Abb. 20 A abgebildet. Die Hazard Ratio, ein deskriptives Maß für das Ereignisrisiko, beträgt hier 13,51. Das Sterberisiko für Mäuse mit ITGAV Knockdown ist konsekutiv um das 13,51-fache reduziert.

Bei der Untersuchung der PaCa 5061 Kontroll- und Knockdownzelllinien lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen. Innerhalb der mit PaCa 5061 Kontrollzellen inokulierten Referenzkohorte entwickelte ein Tier keinen Tumor. In der mit PaCa 5061 kd Zellen inokulierten Kohorte hingegen war bei drei Mäusen kein Primärtumor palpabel. Die mediane Überlebenszeit der ITGAV Knockdownkohorte ist mit 198 Tagen gegenüber der Referenzkohorte mit 99 Tagen signifikant verlängert, wie in Abb. 20 B dargestellt ($P = 0,002$). Die Berechnung der Hazard Ratio ergibt, dass das Sterberisiko für Versuchstiere mit ITGAV Knockdown um das 7,73-fache reduziert ist.

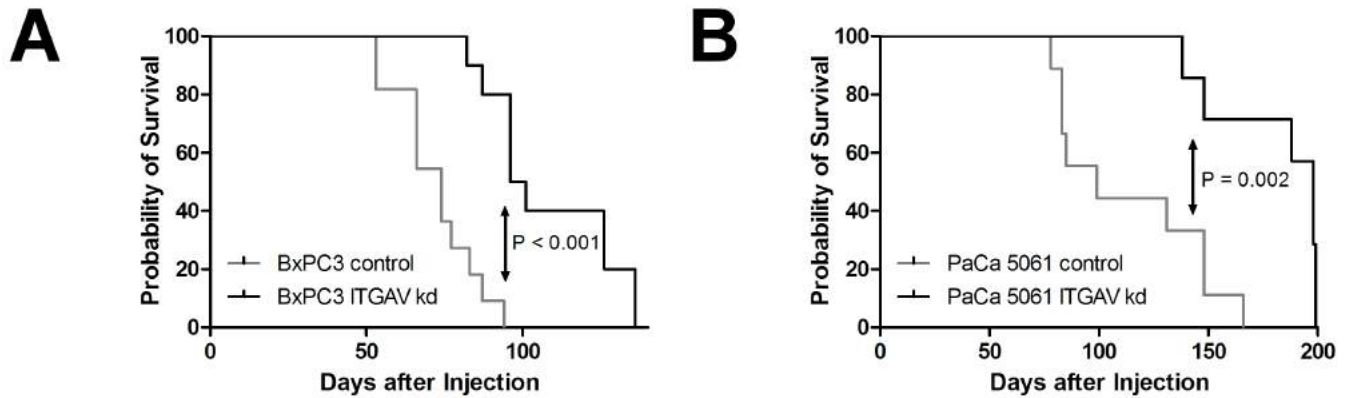


Abb. 20 A, B: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier von ITGAV kd Tumoren im Vergleich zu Kontrolltumoren. Auf der Y-Achse ist die Überlebenswahrscheinlichkeit gegen die Überlebenszeit der Versuchstiere auf der X-Achse aufgetragen. Das mediane Überleben der BxPC3 und PaCa 5061 Knockdownkohorten ist signifikant verlängert.

Für die BxPC3 Referenzkohorte wurde ein mittleres Primärtumorgewicht von 1,13 (SEM = 0,13) bestimmt. Dieses verhält sich im Vergleich zur BxPC3 Knockdownkohorte, welche ein mittleres Primärtumorgewicht von 0,68 (SEM = 0,08) hat, signifikant vergrößert ($P = 0,013$). Innerhalb der mit PaCa 5061 inokulierten Versuchstiere besteht kein signifikanter Unterschied, wie in Abb. 21 zur Darstellung kommt.

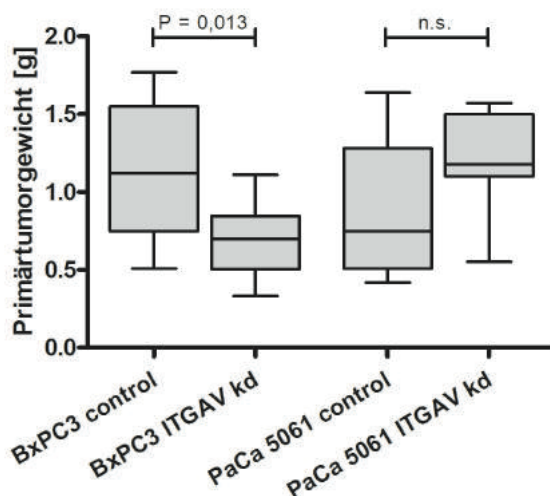


Abb. 21: Übersicht des Primärtumorgewichtes in den ITGAV Knockdown und Kontrollkohorten. Es zeigt sich ein signifikant geringeres Primärtumorgewicht von BxPC3 ITGAV kd Zellen gegenüber der Kontrolle.

4.6.2.2 Metastasierungsverhalten in Blut, Knochenmark und Lunge

Die Alu-Sequenzen der humanen Tumorzellen in Blut, Knochenmark und Lunge der Versuchstiere wurden, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, quantitativ nachgewiesen. So lassen sich Rückschlüsse auf die Auswirkungen des ITGAV Knockdowns hinsichtlich des Metastasierungsverhaltens schließen.

Bei allen mit BxPC3 Kontrollzellen und BxPC3 ITGAV kd Zellen inokulierten Versuchstieren waren Tumorzellen im Blut nachweisbar. Bei lediglich 14 % der mit PaCa 5061 ITGAV kd Zellen injizierten Versuchstiere waren disseminierte Tumorzellen im Blut nachweisbar, während in der Referenzgruppe bei 63 % der Mäuse DNA humaner Zellen amplifiziert werden konnte. Diese Tendenz erreichte im Mann-Whitney-Test keine Signifikanz, wie in Abb. 22 A graphisch abgebildet wird.

Bei der Quantifizierung des Metastasierungsverhaltens in die Lunge zeigte sich, dass bei 100 % der Mäuse innerhalb der BxPC3 Referenzgruppe disseminierte Zellen nachweisbar waren. In der korrespondierenden BxPC3 Knockdownkohorte hingegen lag die Metastasierungsquote bei lediglich 78 %. Die in Abbildung 22 B aufgetragene Anzahl disseminierter Tumorzellen pro 20 ng DNA ist in der Knockdowngruppe signifikant geringer als in der Kontrolle ($P = 0,023$). Innerhalb der PaCa 5061 Kontrollgruppe waren in 50 % der Versuchstiere humane Zellen in der Lunge nachweisbar. In der PaCa 5061 Knockdowngruppe wurden keine Zellen nachgewiesen. Vergleicht man hier die Anzahl der disseminierten Tumorzellen pro 20 ng DNA ist ein signifikanter Unterschied nachweisbar ($P = 0,045$). Somit führt der Verlust von ITGAV zu einer Reduktion der pulmonalen Metastasierung im subkutanen Mausmodell.

Im Knochenmark wurden keine humanen Tumorzellen detektiert.

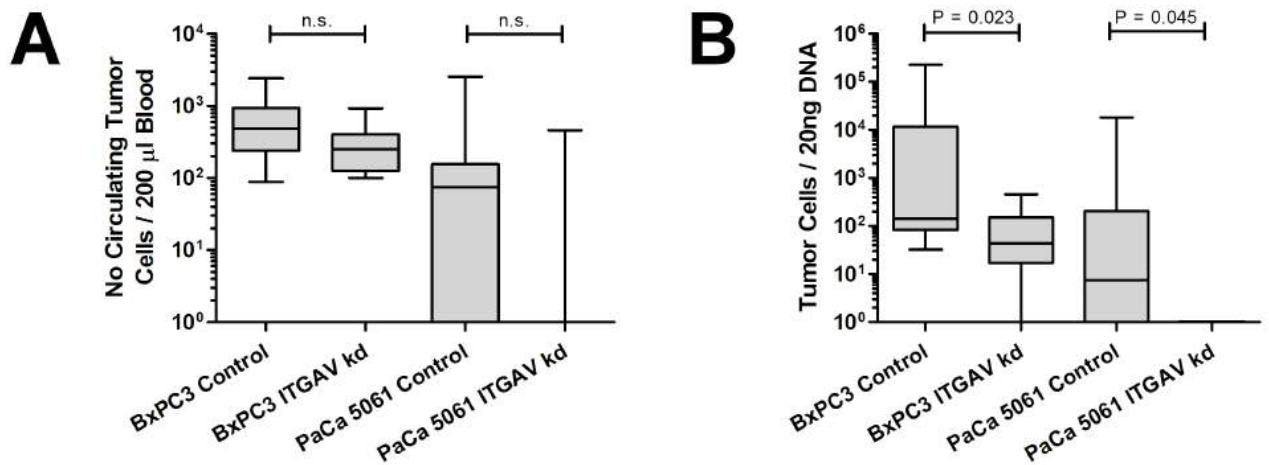


Abb. 22: Ergebnisse der qRT-PCR. **A** Für die zirkulierende Tumorzellen im Blut zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ITGAV Knockdown- und Kontrollkohorten. **B** Die Anzahl der detektierten Tumorzellen in der Lunge pro 20 ng DNA ist in den ITGAV Knockdownzellen im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollzellen signifikant reduziert.

4.7 Immunhistochemie

4.7.1 Beurteilung der Aktivität der SMAD abhängigen TGF- β -Signalkaskade

Zur Evaluierung der Aktivität des SMAD abhängigen *canonical TGF- β -Signaling* wurde phospho-smad2, gefärbt. Liegt smad2 in seiner phosphorylierten Form phospho-smad2 vor, ist der SMAD abhängige TGF- β Signalweg aktiviert (vgl. Kap. 2.3). In Abb. 23 zeigt sich das spezifische nukleär-zytoplasmatische Färbeergebnis.

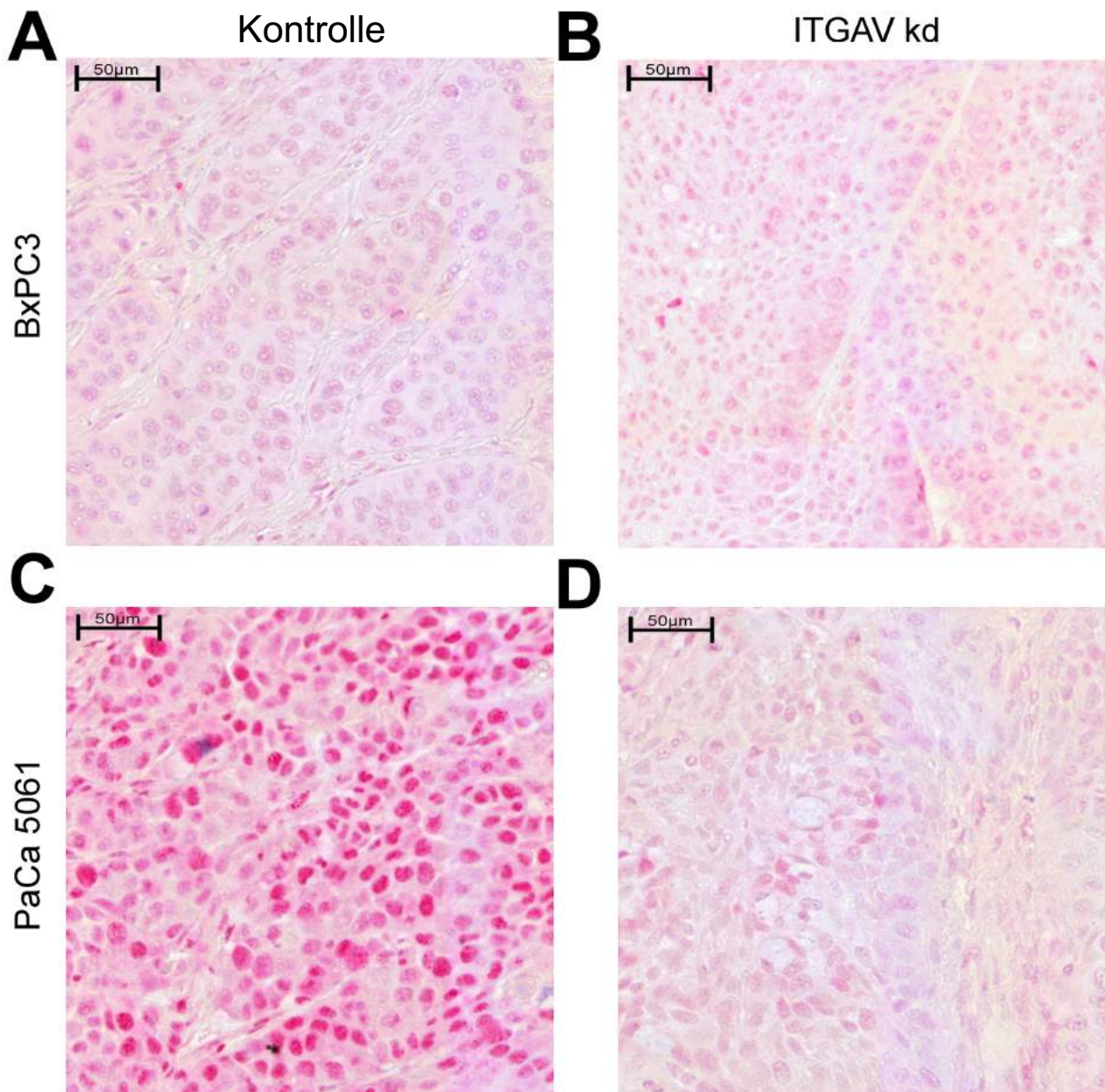


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis von phospho-Smad2 auf repräsentativ ausgewählten Primärtumorschnitten. Bei PaCa 5061 ITGAV Knockdowntumoren ist die Intensität deutlich verringert. Für die BxPC3 Tumore zeigt sich kein Unterschied. **A:** BxPC3 Kontrollzellen **B:** BxPC3 ITGAV kd Zellen **C:** PaCa5061 Kontrollzellen **D:** PaCa5061 ITGAV kd Zellen

Innerhalb der BxPC3 Primärtumore bilden sich hinsichtlich der Intensität der immunhistochemischen Markierung von phospho-smad2 kein signifikanter Unterschied ab. Allerdings zeigen sich für PaCa 5061 Kontrolltumore ein im Mittel 11,30 % (SEM = 2,25 %) großer Anteil phospho-Smad2 positiver Tumorzellen, welcher gegenüber der Knockdownkohorte mit im Mittel 5,42 % signifikant größer ist ($P = 0,03$), wie in Abb. 24 zur Darstellung kommt.

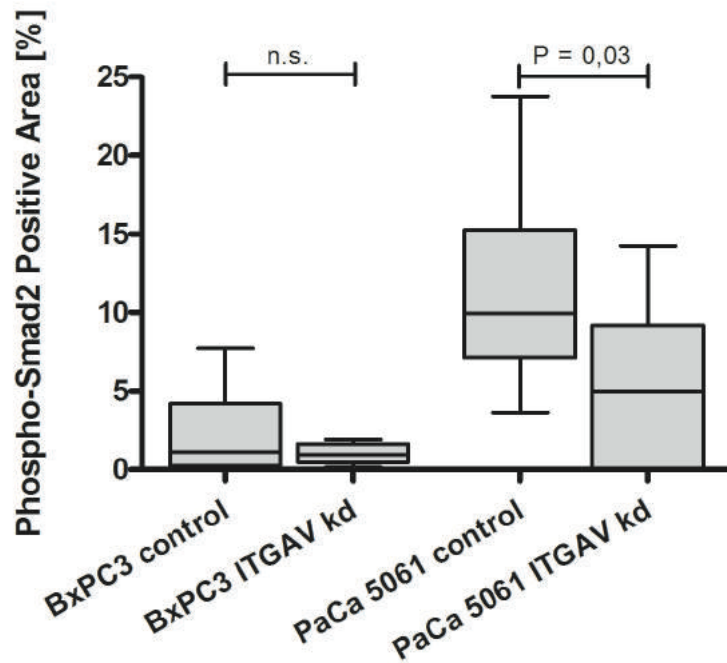


Abb. 24: Vergleichende Darstellung des phospho-Smad2 positiven Anteils: In PaCa 5061 sind signifikant mehr Zellkerne phospho-Smad2 positiv. Für BxPC3 Zellen wurde keine Unterschiede in der phospho-Smad2 Expression festgestellt.

4.7.2 Generelle Morphologie, Proliferationsverhalten, Apoptoserate und Vaskularisierung

Makroskopisch präsentieren sich die Primärtumore als weiß graue, derbe Tumore unscharfer Begrenzung mit teils zystischen Anteilen, welche zudem die Haut ulzerierend infiltrieren. Um den für das verminderte Primärtumorwachstum und reduzierte Metastasierungsverhalten verantwortlichen Mechanismus näher zu charakterisieren, wurde eine H.E.- und Masson-Goldner-Färbung der Primärtumore angefertigt. Die in Abb. 25 dargestellte H.E.-Färbung zeigt repräsentative Primärtumore aller Kohorten in duktaler Differenzierung. Diese Formationen atypischer Epithelien sind als solche nur inkomplett bis schemenhaft erkennbar. Anisokaryose und Pleomorphie prägen die Morphologie der Tumorzellkerne. Die form- und größenvariablen Tumorzellen sind von desmoplastischem Stroma, in der Masson-Goldner-Färbung grün angefärbt, in Septen eingeschidet (vgl. Abb. 26).

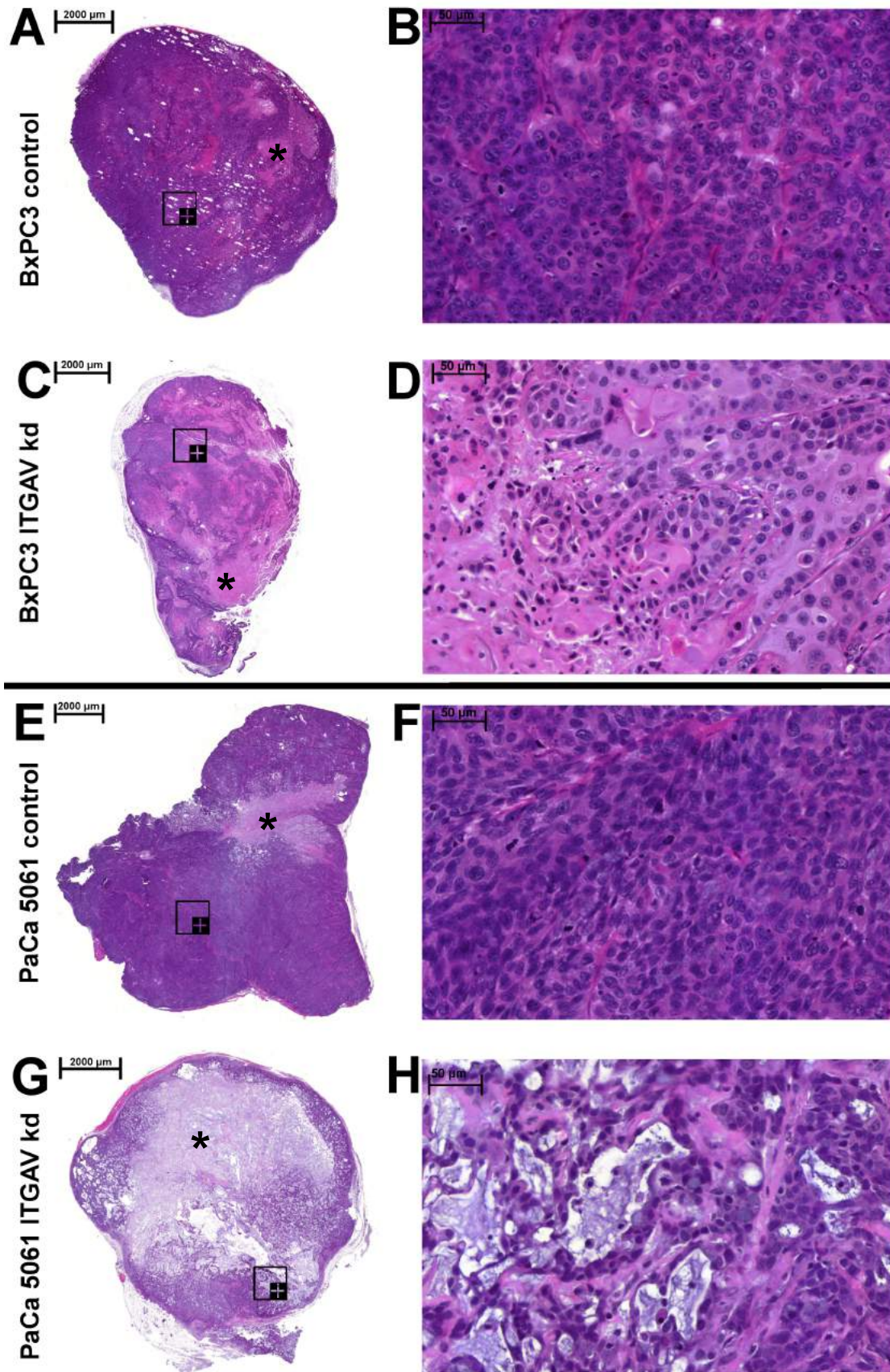


Abb. 25: H.E. Färbung: In den Knockdowntumoren fällt ein deutlich höherer Anteil an Nekrose (*) auf.
A: Übersicht BxPC3 Kontrollprimärtumor **B:** BxPC3 Kontrollprimärtumor **C:** Übersicht BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **D:** BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **E:** Übersicht PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **F:** PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **G:** Übersicht PaCa 5061 kd Tumor **H:** PaCa 5061 ITGAV kd Kontrollprimärtumor

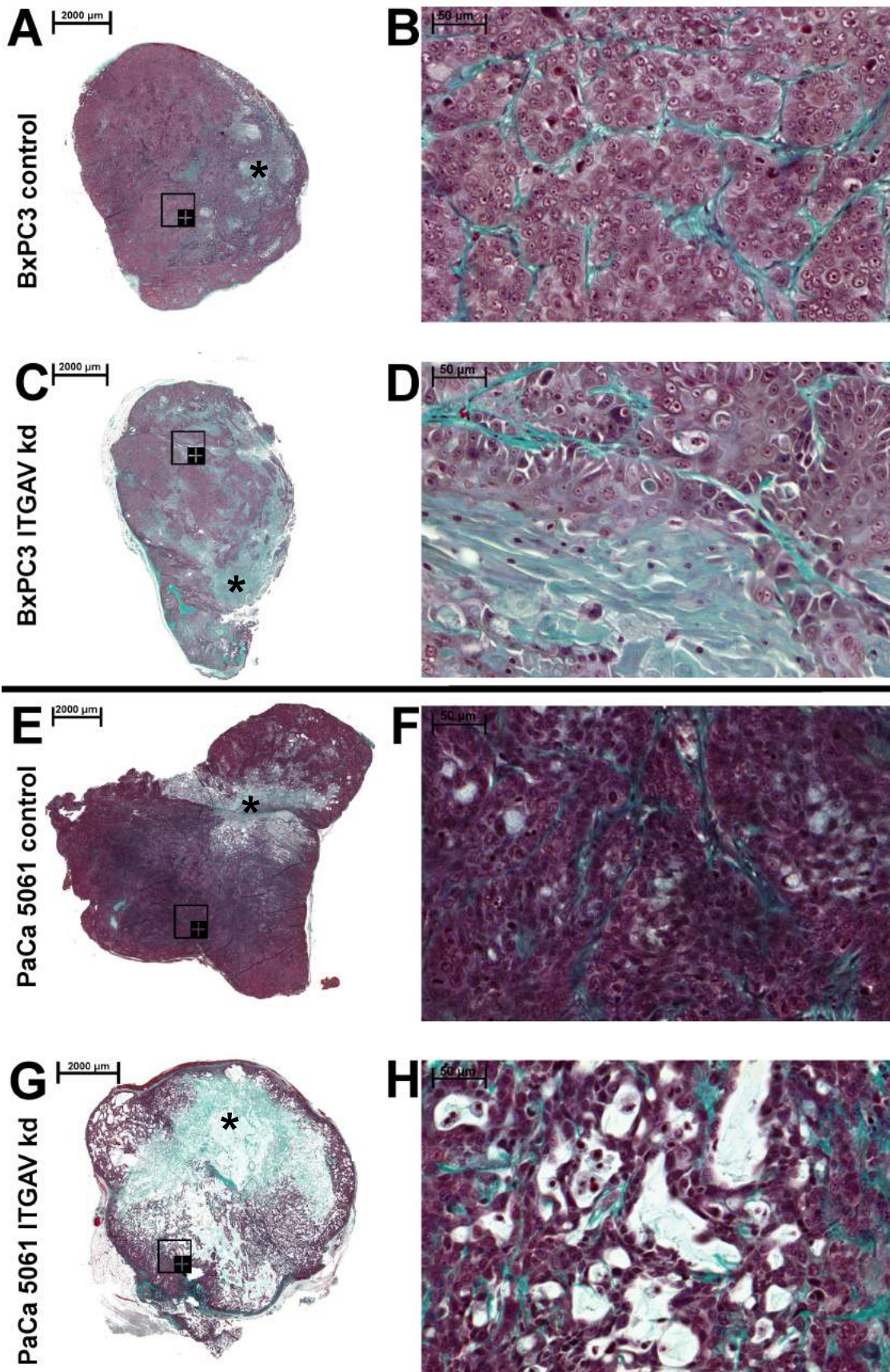


Abb. 26: Masson-Goldner-Färbung: In den Knockdowntumore fällt ein deutlich höherer Anteil an Nekrose auf. **A:** Übersicht BxPC3 Kontrollprimärtumor **B:** BxPC3 Kontrollprimärtumor **C:** Übersicht BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **D:** BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **E:** Übersicht PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **F:** PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **G:** Übersicht PaCa 5061 kd Primärtumor **H:** PaCa 5061 ITGAV kd Primärtumor

Bereits in der Übersicht imponiert die zentrale Nekrose in den ITGAV Knockdowntumoren. Bestimmt man den Flächeninhalt der nekrotischen gegenüber den vitalen Arealen anteilig, zeigt sich für die BxPC3 Kontrolltumore ein mittleres Nekroseareal von 5,0 % (SEM = 5%) gegenüber 37 % (SEM = 5 %) bei der ITGAV-Knockdowngruppe ($P = 0,010$), was in Abb. 27 zur Darstellung kommt. Die mit PaCa 5061 inokulierten Versuchstiere zeigten mit $P = 0,034$ ebenfalls eine signifikante Zunahme der Nekrose. Im Mittel wies hier die Kontrollgruppe einen Nekroseanteil von 20 % (SEM = 12,5 %) gegenüber 65 % in der Knockdownkohorte auf (SEM = 7 %) auf.

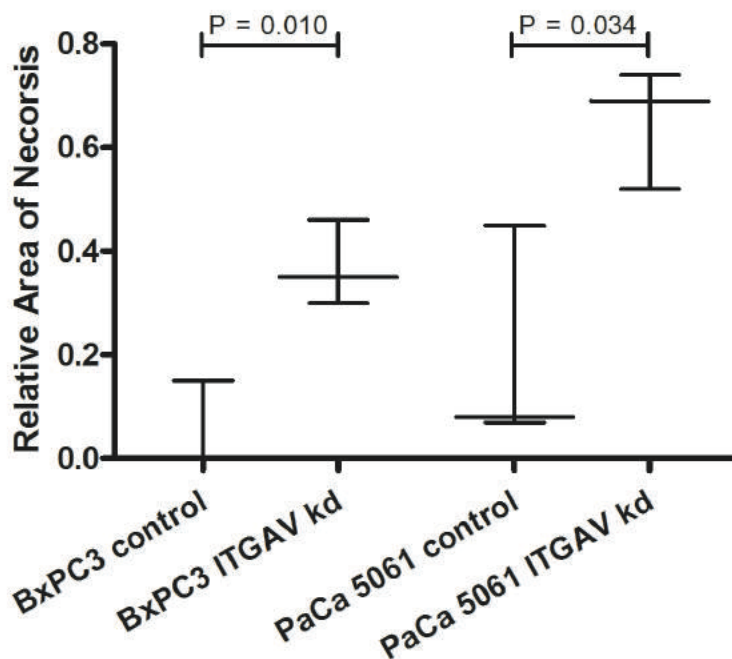


Abb. 27: Vergleichende Darstellung der nekrotischen Areale: Der Knockdown von ITGAV führt zu einer signifikanten Zunahme der Nekrose.

Um Unterschiede hinsichtlich des Apoptoseverhaltens zu erfassen, führten wir die Feulgen-Färbung durch. Der Quotient aus der Anzahl der Zellkerne mit Apoptosekörperchen und der Gesamtheit aller betrachteten Zellkerne ergibt die in Abb. 28 dargestellte Apoptoserate, welche für die zu vergleichenden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Knockdown Tumoren ergibt. Die Spannweite der Resultate reicht von Gesichtsfeldern nicht nachweisbarer Apoptose bis hin zu einer Apoptoserate von 4,3 %, wobei höhere Apoptoseraten selten waren.

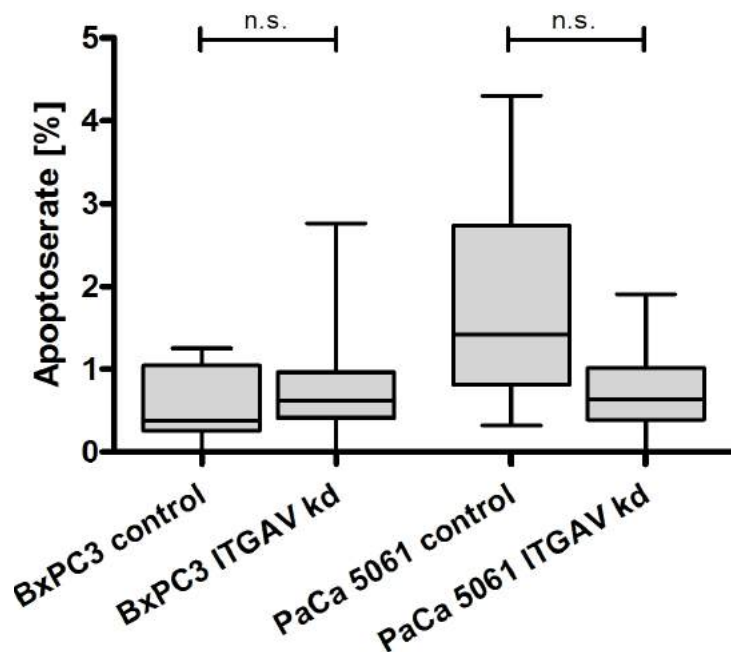


Abb. 28: Die Apoptoserate der Knockdown Tumore unterscheiden sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle nicht signifikant.

Zur Quantifizierung der Zellteilung *in vivo* wurde das nukleäre Antigen Ki-67, welches in proliferierenden Tumorzellen exprimiert und für diese kennzeichnend ist, angefärbt. Inaktive Zellen werden nicht angefärbt. Ein exemplarischer Ausschnitt dieser Färbung ist in Abb. 29 A dargestellt. Der Anteil der Zellen mit Ki-67 positiver nukleärer Immunofärbung wurde gegenüber der Gesamtheit aller Zellen erhoben und ergibt den *Ki 67 Labeling Index*. Hierbei zeigt sich für BxPC3 Kontrollzellen ein Mittelwert von 48 % (SEM 3 %) gegenüber BxPC3 ITGAV kd Zellen mit im Mittel 41 % (SEM = 3 %) proliferierender Zellen. Für PaCa 5061 Kontrolltumore ergab sich als Referenz ein Mittelwert von 48 % (SEM = 2 %) gegenüber 44 % (SEM = 5 %). Zwar ist die Proliferationsrate in den ITGAV-Knockdowntumoren tendenziell geringer, dennoch bildet sich kein statistisch signifikanter Unterschied ab, so dass von einem ITGAV Knockdown unabhängigen Proliferationsverhalten ausgegangen werden kann, wie in Abbildung 29 B dargestellt.

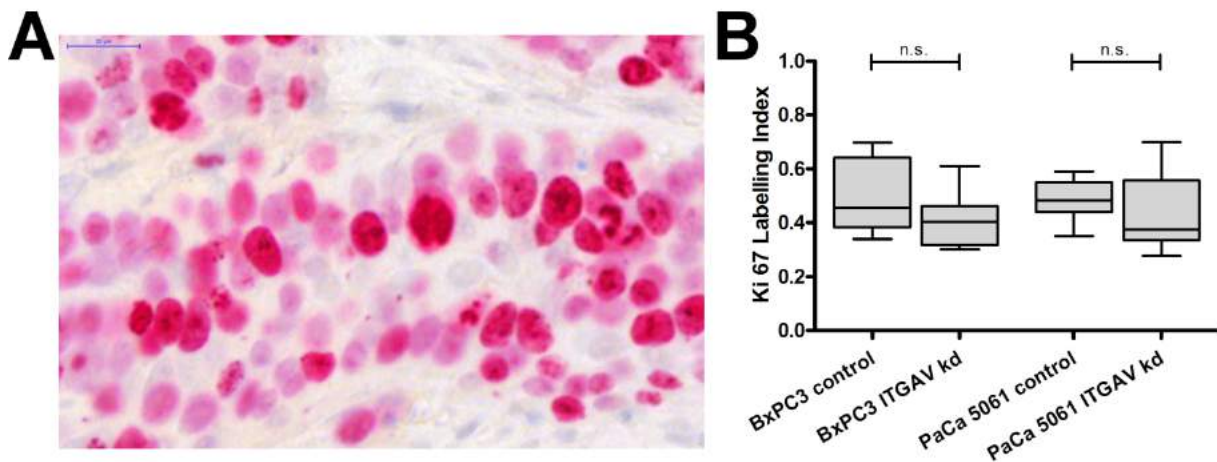


Abb. 29 A: Repräsentative immunhistochemische Anfärbung von Ki-67: Zellen mit positiver nukleärer Immunofärbung proliferieren. **B** Mitoserate: Es bildet sich kein signifikanter Unterschied des *Ki 67 Labeling Index* zwischen den Tumoren der Knockdown- und der Referenzkohorte ab. Die Mitoserate der Knockdownkohorten ist tendenziell geringer.

Um den Einfluss von ITGAV auf die Tumervaskularisierung zu untersuchen, färbten wir den S1P-Rezeptor 1 als Gefäßmarker auf Endothel an, um so die Dichte der Blutgefäße zu beurteilen (vgl. Abb. 30) (Lüders & Schumacher 2017). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

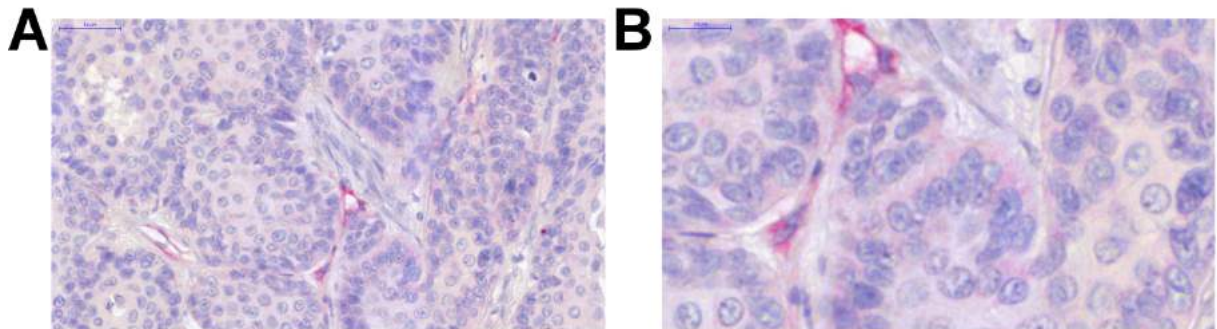


Abb. 30: Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Anfärbung des S1P-Rezeptor 1 an transversal angeschnittenen Tumorgefäßen an einem BxPC3 Kontrolltumor. Der auf Endothel exprimierte S1P-Rezeptor 1 wird so markiert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockdown- und Kontrolltumoren festgestellt.

4.7.3 Extrazelluläre Matrix

Zur Beurteilung des Tumorstromas hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Formation und Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (ECM) wurde weitergehend eine Mallory-Färbung angefertigt (vgl. Abb. 32). Die sich hier blau darstellenden kollagenen Fasern wurden mittels ImageJ anteilig erfasst. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Knockdown- und Kontrolltumoren, wie in Abb. 31 dargestellt.

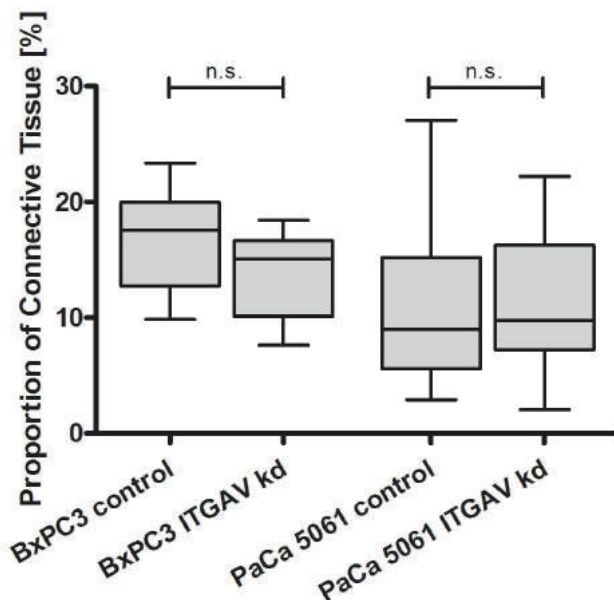


Abb. 31: Quantitativer Vergleich des Anteils der kollagenen Fasern. Zwischen den Knockdown und Kontrolltumoren besteht kein signifikanter Unterschied.

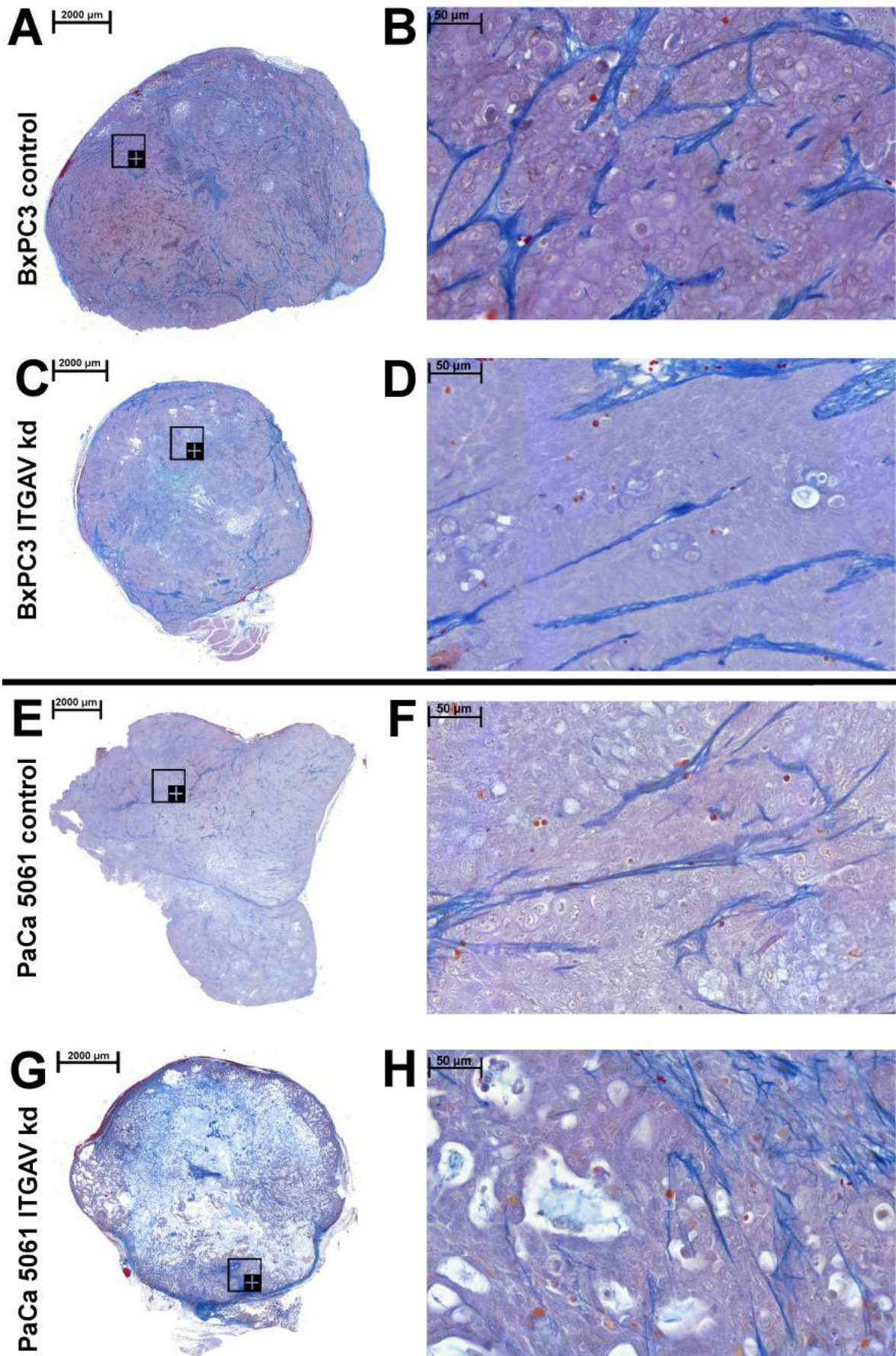


Abb. 32: Mallory-Färbung: Der Anteil der Verteilung an kollagenen Fasern (blau) unterscheidet sich nicht signifikant in den vitalen Tumorarealen. **A:** Übersicht BxPC3 Kontrollprimärtumor **B:** BxPC3 Kontrollprimärtumor **C:** Übersicht BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **D:** BxPC3 ITGAV kd Primärtumor **E:**

Übersicht PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **F**: PaCa 5061 Kontrollprimärtumor **G**: Übersicht PaCa 5061 ITGAV kd Primärtumor **H**: PaCa 5061 ITGAV kd Primärtumor

Die immunhistochemische Markierung von dem ITGAV-Liganden und extrazellulären Matrixprotein Fibronectin ergab für den zuerst verwendeten polyklonalen Primärantikörper, welcher humanes und murines Fibronectin anfärbt, das in Abb. 33 dargestellte Signal. Das markierte Fibronectin hebt sich vom übrigen Tumorstroma rot ab. Zellkerne wurden mit Hämalaun blau gefärbt. Die Isotypenkontrolle präsentiert sich ohne Anfärbung.

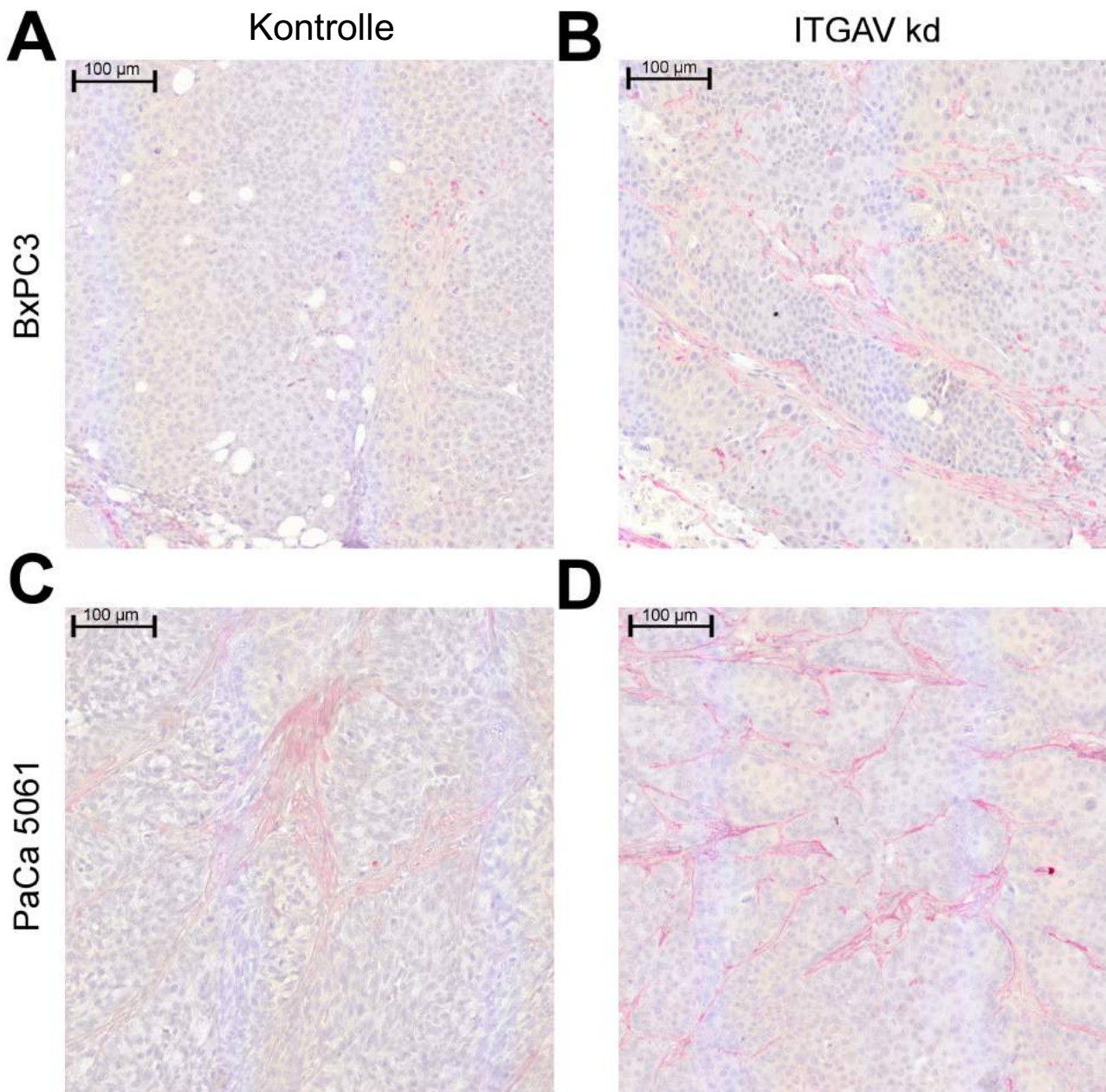


Abb. 33: Der Anteil des mit dem polyklonalen Antikörper angefärbten extrazellulären Matrixproteins Fibronectin ist in der extrazellulären Matrix der ITGAV Knockdowntumoren erhöht **A:** BxPC3 Kontrolltumore **B:** BxPC3 ITGAV kd Tumore **C:** PaCa5061 Kontrolltumore **D:** PaCa5061 ITGAV kd Tumore

In der quantitativen Auswertung mit ImageJ zeigte sich für BxPC3 Kontrollzellen ein mittlerer Fibronektinanteil von 2,21 % (SEM = 0,48 %) gegenüber 4,25 % (SEM = 0,40 %), welcher sich mit $P = 0,002$ signifikant unterschied. PaCa 5061 Kontrolltumore haben mit durchschnittlich 0,05 % (SEM = 0,03) im Vergleich zu 3,33 % (SEM = 0,62 %) in der korrespondierenden Knockdownkohorte mit $P < 0,001$ einen signifikant niedrigeren Fibronektinanteil (vgl. Abb. 34)

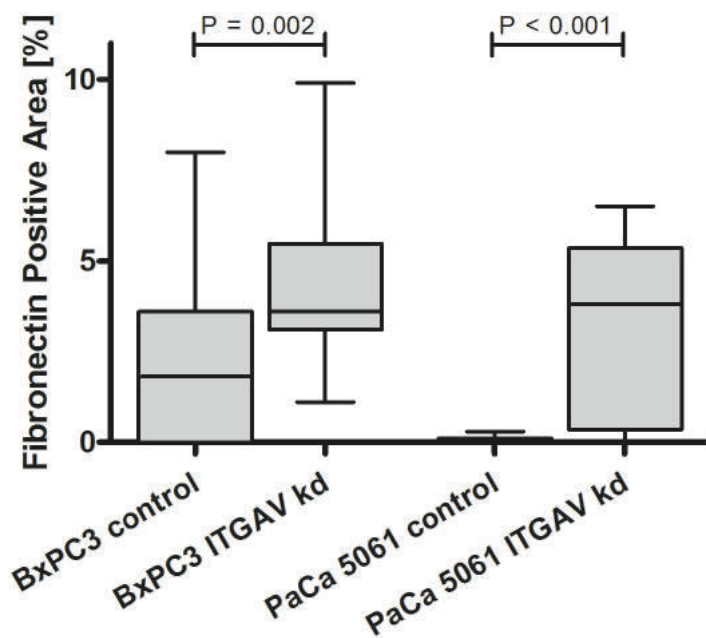


Abb. 34: Vergleichende Darstellung der Fibronektin positiven Fläche: Der Knockdown von ITGAV führt zu einer vermehrten Expression von Fibronektin in der extrazellulären Matrix.

Die zusätzliche Anti-Fibronektinfärbung des human-spezifischen monoklonalen Antikörpers wurde durchgeführt, um zu klären, ob das im ITGAV Knockdown vermehrt sezernierte Fibronektin humanen oder murinen Ursprungs ist. Hierbei zeigt sich eine spezifische Anfärbung von humanem Fibronektin durch den Primärantikörper bei blander Isotypenkontrolle. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Kohorten. In Zusammenschau beider Fibronektinfärbungen lässt sich folgern, dass die vermehrte Sekretion von murinen Stromazellen ausgeht.

4.7.4 Beurteilung der EMT

Um zu überprüfen ob eine Regulation der EMT vorliegt, wurde der Transkriptionsfaktor Twist1, welcher als zentraler Regulator für die EMT gilt (Mamuya & Duncan 2012), immunhistochemisch in den Tumoren dargestellt und mittels ImageJ ausgewertet. In der Isotypenkontrolle konnte eine unspezifische Reaktion ausgeschlossen werden. Für die Auswertung wurde die Fläche der Twist-positiven Zellen ins Verhältnis zum Gesichtsfeld gesetzt. Für die BxPC3 Kontroll- und ITGAV Knockdowntumore zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Für PaCa 5061 Kontrolltumore konnte mit im Mittel 0,76 % eine signifikante Verminderung des Signals mit $P = 0,036$ gegenüber 2,21 % in PaCa 5061 Knockdowntumoren ermittelt werden (vgl. Abb. 35)

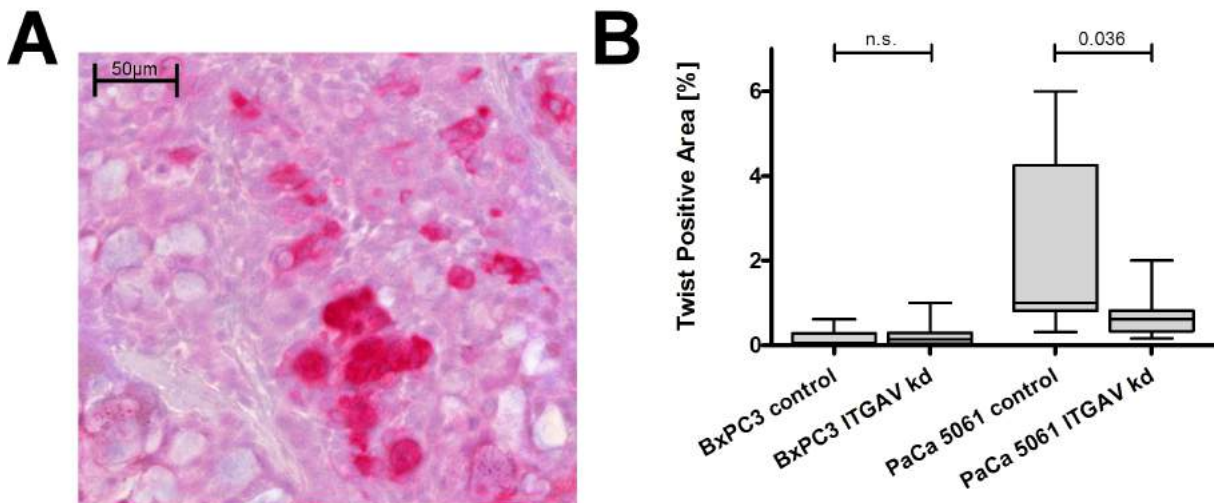


Abb. 35: **A** Exemplarische immunhistochemische Markierung von Twist1 in PaCa5061 Kontrollzellen **B** Vergleichende Darstellung des Anteils der Fläche von Twist1 positiven Zellen am Gesichtsfeld BxPC3 Kontrollzellen. Der Knockdown von ITGAV für PaCa 5061 Tumoren zu einer Verminderten Aktivität von Twist1. Zwischen BxPC3 Knockdown- und Kontrolltumore zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

4.8 Genexpressionsanalyse

4.8.1 Übersicht der in PaCa 5061 und BxPC3 signifikant regulierten Gene

Die Regulation eines Genes wird dann als signifikant bewertet, wenn der *Fold Change* größer als $\pm 1,5$ ist und zusätzlich ein ANOVA p-Wert $< 0,05$ vorliegt. Der *Fold Change* (FC) ist linear skaliert und ergibt sich aus den zur Basis 2 logarithmierten Expressionslevel. Ein positiver *Fold Change* bedeutet, dass dieses Gen in der Knockdownkohorte im Vergleich zur Kontrolle stärker exprimiert ist. Im Umkehrschluss wurde ein Gen vermindert exprimiert, wenn der Wert negativ ist. In der Übersichtstabelle 3 werden die in beiden Zelllinien hochregulierten Gene hinsichtlich ihrer Funktion kurz erläutert und gegebenenfalls tumorbiologisch relevante Aspekte angeführt. Entsprechend werden in der Übersichtstabelle 4 herunterregulierte Gene betrachtet.

Gen-Name	Name und Funktion entnommen aus der NCBA Datenbank*	BxPC3				PaCa 5061			
		Expressionslevel (log2)		Fold Change (linear)	ANOVA p-value	Expressionslevel (log2)		Fold Change (linear)	ANOVA p-value
		Kontrolle	ITGAV kd			Kontrolle	ITGAV kd		
CALB1	"calbindin 1" ist ein Transport- und Pufferprotein für Calcium	7,6	13,62	64,72	0,03	8,6	12,03	10,82	0,02
CEACAM7	" <i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 7</i> " gehört zu einer Familie verwandter Glykoproteine, der carcinoembryonalen Antigene.	7,04	9,96	7,56	0,02	5,98	9,26	9,71	0,01
FLG	Filaggrin trägt zur Vernetzung von Keratin-Filamenten in der Epidermis bei.	3,97	5,99	4,06	0,03	4,76	12,82	265,82	0,003
A2ML1	" <i>alpha-2-macroglobulin like 1</i> " gehört zur Gruppe Alpha-2-Makroglobuline, Proteaseinhibitoren, welche zu den Akute-Phase-Proteinen zählen.	5,71	8,17	5,51	0,02	8,2	9,84	3,12	0,04
GCNT3	" <i>glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type</i> " gehört zur Gruppe der Glycosyltransferasen, welche im Rahmen der posttranslationalen Modifikation die Glykolisierung katalysieren.	7,35	9,1	3,37	0,02	9,92	13,63	13,07	0,003
ERVH-6	" <i>endogenous retrovirus group H member 6</i> "	4,68	6,25	2,97	0,02	5,88	7,42	2,92	0,01
AK4	Adenylat-Kinase 4 gehört zur Gruppe Adenylat-Kinase der mitochondrialen Matrix1.	9,32	9,98	1,57	0,02	8,7	9,32	1,54	0,03
ERO1L	Mitglied der Gruppe " <i>endoplasmic reticulum oxidoreductin family</i> ", welches bei der Zellantwort auf Hypoxie im HIF-1-Signalweg sowie bei der Sekretion von VEGF involviert ist (May et al. 2005).	14,14	15,52	2,59	0,03	16,31	17,93	3,06	0,0002
GAN	Gigaxonin spielt eine Rolle in der Architektur von Neurofilamenten (NF)	8,45	9,8	2,54	0,02	8,64	9,82	2,27	0,03
VLDLR	<i>Very-low-density-lipoprotein-receptor</i> , welcher als Rezeptor Teil der Reelin-Signalkaskade ist.	6,14	7,29	2,22	0,03	6,62	7,24	1,53	0,03
KLK13	" <i>kallikrein related peptidase 13</i> ", eine Serinprotease deren Expression mit einer günstigen Prognose beim Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom assoziiert ist (Gueugnon et al. 2015).	8,02	9,13	2,16	0,002	6,6	7,64	2,06	0,04

VSNL1	"Visinin like 1" fungiert als neuronaler Calciumsensor, wobei die Expression negativ mit dem Überleben beim kolorektalen Karzinom korreliert (Akagi et al. 2012).	6,21	7,14	1,9	0,03	5,78	6,77	1,98	0,48
CD55	Das Glykoprotein CD55 (<i>Decay-accelerating-factor</i>) bindet Komplementfaktor C5 und schützt die Zellen so vor einer Lyse durch das Komplementsystem. Weiterhin begünstigt CD55 das Metastasierungsverhalten beim Pankreaskarzinom (He et al. 2015).	7,86	8,71	1,18	0,03	9,58	10,39	1,75	0,02
DENND2C	" <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> (GEF)"	8,59	9,42	1,78	0,02	8,14	8,76	1,54	0,02
CD46	" <i>Membrane Cofaktor Protein</i> ", welches durch binden der Komplementfaktoren C3b und C4b die Zelle vor der Lyse durch das Komplementsystem schützt.	11,14	11,97	1,78	0,01	12,1	13,63	2,88	0,03
F3	Das Glykoprotein "Gewebefaktor" der Zelloberfläche ist an der extrinsischen Gerinnung beteiligt.	10,92	11,72	1,74	0,03	11,64	13,21	2,97	0,0003
MALT1	" <i>Malt1 paracaspase</i> " ist an der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges beteiligt (Jaworski & Thome 2016).	9,2	9,96	1,7	0,04	8,12	8,9	1,74	0,005
SSFA2	" <i>sperm specific antigen 2</i> "	10,75	11,48	1,67	0,04	12,58	14	2,67	0,01
LMO7	" <i>Lim domain 7</i> " fungiert als Tumorsuppressorgen für das murine Adenokarzinom der Lunge (Nakamura et al. 2011)	9,87	10,58	1,67	0,03	10,26	12,64	5,19	0,006
DAPK1	" <i>death associated protein kinase 1</i> " vermittelt den durch γ -Interferon induzierten Zelltod. Dessen Überexpression vermindert Proliferation, Migration und Invasion in BxPC3 (Qin et al. 2014).	6,69	7,39	1,62	0,01	7,42	9,26	3,58	0,03
TPM4	Tropomyosin 4 ist an der Strukturgebung des Zytoskeletts beteiligt.	12,27	12,95	1,6	0,03	13,68	14,54	1,82	0,008
TARBP1	Die Expression des " TAR (HIV-1) RNA binding protein 1" hat prognostische Relevanz beim Hepatozellulären Karzinom (Yang et al. 2015)	7,95	8,53	1,5	0,01	7,37	8,06	1,61	0,02

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der in BxPC3 und PaCa 5061 Knockdowntumore hochregulierten Gene. *falls nicht anderweitig zitiert, basiert die funktionelle Beschreibung auf GenBank®, NCBI, USA.

Gen-Name	Name und Funktion entnommen aus der NCBA Datenbank*	BxPC3				PaCa 5061			
		Expressionslevel (log2)		Fold Change (linear)	ANOVA p-value	Expressionslevel (log2)		Fold Change (linear)	ANOVA p-value
		Kontrolle	ITGAV kd			Kontrolle	ITGAV kd		
MMP10	"matrix metalloproteinase 10" baut u.a. Fibronectin, Laminin, Elastin und verschiedene Kollagentypen ab. Die verminderte Expression von MMP10 führt im Pankreaskarzinom zu reduzierter Invasion und Metastasierung (Zhang et al. 2014).	8,47	7,59	-1,84	0,01	13,68	10,7	-7,92	0,002
ABCC4	"ATP binding cassette subfamily C member 4" gehört zu den Multidrug-Resistance-Proteinen, eine Untergruppe der ABC-Transporter.	7,5	7,03	-1,38	0,03	10,2	7,9	-4,93	0,02
LRIG1	"Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1" ist an der Regulation der EGFR-Signalkaskade beteiligt (Zhang et al. 2015).	10,35	8,8	-2,93	0,02	9,53	7,56	-3,9	0,0006
APOD	Apolipoprotein D gehört zu den Lipoproteinen hoher Dichte	8,5	7,36	-2,21	0,04	9,36	7,43	-3,8	0,02
TPGS2	"tubulin polyglutamylase complex subunit 2"	11	10,29	-1,64	0,03	10,3	8,4	-3,73	0,004
DCAKD	"dephospho-CoA kinase domain containing"	8,54	7,8	-1,68	0,05	8,77	7,18	-3,02	0,02
SLCO4C1	"solute carrier organic anion transporter family member 4C1"	7,54	6,25	-2,44	0,04	8,66	7,1	-2,93	0,02
ZNF462	"zinc finger protein 462"	8,91	8,28	-1,54	0,049	11,01	9,78	-2,35	0,01
RAB1B	"RAB1B, member RAS oncogene family" beeinflusst die Metastasierung über den TGF-beta Signalweg im Mammakarzinom (Jiang et al. 2015).	13,08	12,44	-1,56	0,02	12,98	11,82	-2,22	0,02
APOBEC3C	"apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3C" ist an der Regulation von Zellwachstum und Zellzykluskontrolle beteiligt.	10,7	9,96	-1,67	0,01	11,9	10,89	-2,01	0,38
CNN2	"Calponin 2" ist bei der Strukturierung der Aktinfilamente beteiligt spielt möglicherweise bei der Zelladhäsion eine Rolle.	11,75	11,07	-1,61	0,04	111,14	10,45	-1,62	0,31

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der in BxPC3 und PaCa 5061 Knockdown-tumoren herunterregulierten Gene. *falls nicht anderweitig zitiert, basiert die funktionelle Beschreibung auf GenBank®, NCBI, USA.

4.9 Funktionelle Analyse der signifikant regulierten Gene

Für die nachfolgende Analyse wurden die signifikant regulierten Gene innerhalb der ITGAV-Knockdowntumore im Vergleich zur Kontrolle verwendet. Diese Gene wurden softwaregestützt mit "ReactomeFIViz" auf die in der *Reactome*-Datenbank enthaltenen Signalwege projiziert (Tsui et al. 2007, Wu et al. 2014). Mit $P < 0,05$ bewertete Signalwege, die im tumorbiologischen Kontext relevant sind, werden als signifikant reguliert betrachtet und nachfolgend zunächst für die BxPC3 Knockdowntumore aufgeführt.

Der aus *Reactome* entnommene Signalweg "Integrin cell surface interaction" ist mit $P = 0,013$ signifikant reguliert, wenn ein ITGAV Knockdown besteht. Zwischen der eigenen Genliste und der Genliste des Signalwegs stimmten ITGB1 (FC = +1,55), ITGB8 (FC = +1,56), ITGB6 (FC = +1,54), ITGA6 (FC = +1,92), ITGA5 (FC = +2,69) und LUM (FC = +1,66) überein. Der Signalweg *Fibronectin matrix formation* ist durch die darin enthaltenen Übereinstimmungen ITGB1 und ITGA5 mit $P = 0,03$ ebenfalls signifikant reguliert. Das in der ECM vorkommende Fibronektin enthält die RGD-Sequenz, welche vor allem von den Integrinen $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ gebunden und so die Zell-Matrix-Interaktion und Adhäsion vermittelt (vgl. Kap. 2.3.4). Es ist anzunehmen, dass die Expression des Heterodimers $\alpha 5\beta 1$ durch den funktionellen Verlust der mit ITGAV gekoppelten Untereinheiten kompensatorisch gesteigert wird.

Nachfolgend sollen die signifikant regulierten Signalwege der PaCa5061 Knockdowntumore im Vergleich zu den Kontrolltumoren dargestellt werden (vgl. Tab. 5). Das *mTOR signaling* ist im Vergleich der PaCa5061 Zelllinien mit $P = 0,001$ signifikant reguliert.

Die Proteinkomplexe *Laminin Interaction* und *Degradation of the extracellular matrix* sind ebenfalls signifikant beeinflusst. Laminine sind Teil der extrazellulären Matrix und elementarer Bestandteil der Basallamina. Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktionen erlauben es der Tumorzelle das umgebende Tumorstroma zu infiltrieren (Sawai et al. 2008). Hierzu ist der Abbau von Molekülen der extrazellulären Matrix und der Basallamina notwendig (Martin et al. 2013). Der Knockdown von ITGAV führt zu einer signifikanten Modulation der extrazellulären Matrix und Basallamina.

Signalweg	p-Wert	Mit dem Signalweg übereinstimmende regulierte Gene
<i>mTOR signaling</i>	0,001	MLST8 -2,08, RPS6KB1 +1,98, TSC2 -1,52, PPM1A +2,42, CAB39L +2,09, CAB39 +1,63, EEF2K -1,72, PRKAA2 -1,62, PRKAB2 -1,78, EIF4B -1,77
<i>Laminin interactions</i>	0,002	HSPG2 -1,78, ITGAV -6,13, ITGA3 -1,91, NID1 -2,3, LAMC1 -1,99, LAMB1 -4,02, LAMA2 -1,61, LAMA3 -6,57, LAMA5 -1,88
<i>Degradation of the extracellular matrix</i>	0,0034	BSG -2,65, MMP10 -7,92, CD44 -5,42, MMP7 +2,95, CAPN1 -1,93, COL17A1 -3,6, ADAM10 +2,26, ADAM17 +2,33, FURIN +1,79, CASP3 +2,96, KLK7 +3,17, HSPG2 -1,78, NID1 -2,3, TIMP2 +4,83, LAMC1 -1,99, LAMB1 -4,02, LAMA3 -6,57, LAMA5 -1,88, CTSS +3,59

Tab. 5: Übersicht der in PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren signifikant regulierten Signalwege. Der Knockdown von ITGAV führt zu einer signifikanten Modulation der extrazellulären Matrix und Basallamina in PaCa 5061 Tumoren.

Da der TGF- β Signalweg in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnimmt, soll dessen Aktivität detailliert betrachtet werden.

Bei der Projektion der in PaCa 5061 ITGAV kd regulierten Gene auf den Signalweg *Signaling by TGF-beta Receptor complex* aus *Reactome* stimmen die Gene TGFBR1(+1,68), PPP1CA (-1,55), E2F4 (-2,3), PARD3 (-2,43), UBE2D1 (+2,26), CDK8 (+1,8), PPM1A (+2,24), SERPINE1(-2,83), FURIN (+1,77), STUB1(-1,84), NEDD4L (-1,61), PPP1CB (+2,59) und SKIL (+2,92) überein. Der Abgleich der in PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren regulierten Genen mit dem *Signaling by TGF-beta Receptor complex* ist in Abb. 35 graphisch dargestellt (P = 0,066).

BxPC3 Tumorzellen weisen eine SMAD4-Deletion auf und verfügen somit über kein physiologisches TGF- β -Signaling (Deer et al. 2010). In der Genexpressionsanalyse zeigt sich im Vergleich der BxPC3 ITGAV kd Tumoren zu den BxPC3 Kontrolltumoren keine signifikante Regulation. Der Verlust von ITGAV hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die TGF- β Signalkaskade in den SMAD4 deletierten BxPC3 Zellen.

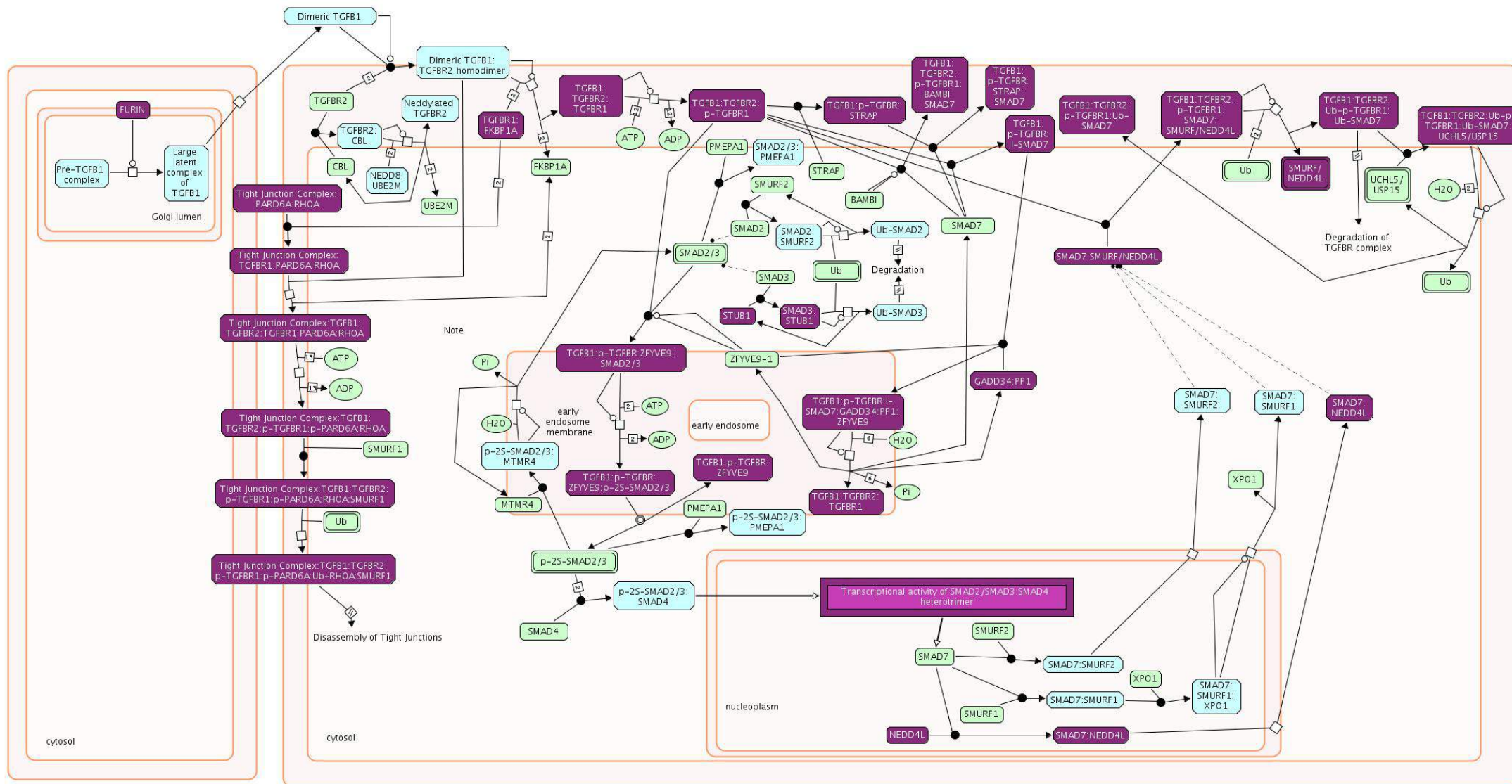


Abb. 35: Projektion von in PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren signifikant regulierten Gene auf *Signaling by TGF-beta Receptor complex*, entnommen aus der Datenbank *Reactome*. Violette markiert sind Einheiten, die in PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren signifikant reguliert sind oder signifikant regulierte Gene enthalten.

5 Diskussion

Im Zuge der Fernmetastasierung von Tumorzellen des Pankreaskarzinoms lösen sich Tumorzellen von dem Primärtumor ab und infiltrieren das umliegenden Gewebe. Hierzu sind neben der Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten Tumor-Stroma-Interaktionen notwendig, welche die Invasion der Tumorzelle in das umliegende Gewebe ermöglichen. Für die Tumor-Stroma-Interaktion sind Integrine und die Bestandteile der extrazellulären Matrix von zentraler Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von dem im Stroma vorhandenen Hyaluronan und dem Integrin αV (ITGAV) der Tumorzelle auf die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Hyaluronan im Tumorstroma keine prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben der Patienten besitzt. 88 % der untersuchten Tumore wiesen ein moderates oder hohes Hyaluronanexpressionslevel auf und 100 % der pT3/T4 Tumore waren Hyaluronan positiv.

Hyaluronan wurde als potentiell Zielmolekül in der Therapie des Pankreaskarzinoms evaluiert und die Therapie mit intravenös verabreichter Hyaluronidase in Kombination mit Gemcitabin erprobt (Shepard 2015, Hingorani et al. 2016). Diese klinische Studie (Phase Ib, Hingorani et al. 2016) zeigte ein verlängertes Überleben von Patienten, die mit pegylierter Hyaluronidase und Gemcitabin behandelt wurden (Hingorani et al. 2016). Patienten mit viel Hyaluronan profitieren vermehrt von der Therapie, wobei das untersuchte Kollektiv mit 17 eingeschlossenen Patienten klein war. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an einem Kollektiv von 184 Patienten erhobenen Daten zeigen zwar, dass Hyaluronan eine zentrale Funktion in der Tumorgenese hat, aber der Anteil an Hyaluronan im Tumorstroma keine prognostische Relevanz besitzt. Das verlängerte Überleben der mit pegylierter Hyaluronidase und Gemcitabin behandelten Patienten ist somit als Behandlungserfolg der kombinierten Therapie zu werten, da das Verteilungsmuster von Hyaluronan alleine nicht von prognostischer Bedeutung ist.

Cheng et al. (2013) zeigten eine positive Korrelation zwischen dem medianen Überleben und der Expression von Hyaluronan. Methodisch unterscheidet sich die Arbeit von Cheng et al. (2013) von der hier vorliegenden in der immunhistochemischen Markierung von Hyaluronan. So setzen Cheng et al. (2013) einen polyklonalen Antikörper ein, wohingegen in dieser Arbeit HAPB zur spezifischen Markierung verwendet wurde. Die zur Validierung eingesetzte Vorbehandlung mit Hyaluronidase ergab eine nicht reduzierte und somit unspezifische Markierung durch den polyklonalen Antikörper im Gegensatz zur Markierung mit HAPB, dessen Reaktivität nach Hyaluronidasevorverdau nicht mehr vorhanden war. Der von Cheng et al. (2013) eingesetzte Antikörper ist unspezifisch und nicht zur Detektion von Hyaluronan geeignet (Gebauer et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Bedeutung von ITGAV mittels Tissue-Microarray untersucht. Hier zeigte sich das mediane Überleben der ITGAV positiven Kohorte mit 11 Monaten gegenüber der ITGAV negativen Kohorte mit 18 Monate signifikant verkürzt (vgl. Abb. 13). ITGAV eignet sich daher als prognostischer Marker für das Pankreaskarzinom. Zusätzlich gelang der Nachweis, dass ein fortgeschrittenes Primärtumorstadium mit einer vermehrten Expression von ITGAV einhergeht (vgl. Abb. 12).

Eine positive Korrelation von ITGAV mit dem Nodalstatus konnte am untersuchten Kollektiv nicht gezeigt werden. Hosotani et al. (2002) wiesen mit einem Integrin $\alpha\beta 3$ spezifischen Antikörper nach, dass Integrin $\alpha\beta 3$ positiv mit der lymphatischen Metastasierung im PDAC korreliert. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Gesamtheit der ITGAV-Untereinheiten jedoch nicht mit dem Nodalstatus korrelieren. Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Integrin $\alpha\beta 3$ für die lymphatische Metastasierung von besonderer Bedeutung ist, während das ITGAV eher für die hämatogene und peritoneale Metastasierung von Bedeutung sein dürfte.

Eine häufige Kontraindikation für ein kuratives Therapiekonzept beim PDAC in der klinischen Routine ist das Einwachsen des Primärtumors in vitale Strukturen wie den Truncus coeliacus oder die A. mesenterica superior und die intraperitoneale Aussaat. Für letztere gilt, dass E- und P-Selektine die peritoneale Metastasierung

im PDAC vermitteln. So führt der Knockout von E- und P-Selektinen im Xenograft-Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der peritonealen Metastasierung. Die Genexpressionsanalyse der verbliebenen Peritonealkarzinose zeigte, dass ITGAV gesteigert exprimiert wird. Der Verlust von E- und P-Selektinen führt somit zu einer vermehrten Expression von ITGAV (Gebauer et al. 2013).

Anknüpfend an die Arbeit von Gebauer et al. (2013) wurde in den vorliegenden *in vivo* Studien zunächst untersucht, ob der Verlust von ITGAV in PaCa 5061 Zellen die peritoneale Metastasierung beeinflusst. Weiterhin wurde geprüft, ob sich die bereits durch die Selektindefizienz reduzierte intraperitoneale Metastasierung durch die Suppression von ITGAV weiter limitieren lässt. Hierzu wurde in der Zelllinie PaCa 5061 mittels shRNA ein Knockdown von ITGAV hergestellt. Die Validierung mit FACS und Western Blot ergaben eine Restexpression von ITGAV < 25 % gegenüber der Kontrolle.

In dem durchgeführten Endpunktversuch im intraperitonealen Xenograft-Mausmodell konnte eine signifikante Abnahme der peritonealen Metastasierung durch die verminderte Expression von ITGAV in PaCa 5061 Zellen nachgewiesen werden. Der PCI von der Kontrollgruppe, PaCa 5061 Kontrollzellen auf selektindefizienten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen, ergab nach 62 Tagen 12,92, während PaCa 5061 ITGAV kd Zellen in selektinkompetenten Zellen lediglich einen PCI von 0,07 erreichten. Zum Zeitpunkt der Terminierung des Endpunktversuchs war die Tumorlast in den mit PaCa 5061 ITGAV Zellen inokulierten selektindefizienten Tieren zu gering, um einen additiven Effekt aus ITGAV Suppression und Selektindefizienz erfassen zu können (vgl. Abb. 19 A).

Daher wurde der Versuch mit den PaCa 5061 ITGAV kd Zellen inokulierten Kohorten wiederholt. Die Abbruchkriterien dieses Endpunktversuches wurden nun erst nach 77 Tagen erreicht. Hier konnte eine signifikante Reduktion der Peritonealkarzinose in selektinkompetenten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen gegenüber selektindefizienten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen nachgewiesen werden. Der PCI reduzierte sich von 3,125 auf 0,07 ($P = 0,017$). Demnach besteht ein additiver Effekt aus ITGAV Suppression und Selektindefizienz auf die intraperitoneale Karzinose (vgl. Abb. 19 B).

Es ist bekannt, dass sich die mechanistischen Grundlagen der Adhäsion und Extravasation von Leukozyten (Leukozytenadhäsionskaskade) und zirkulierenden Tumorzellen ähneln. So wird beispielsweise die Expression von E-Selektinen durch inflammatorische Stimuli auf dem Endothel induziert, was zur Extravasation von Leukozyten führt (Wagner 2010). Gebauer et al. (2013) zeigten, dass der Verlust von E- und P-Selektinen die intraperitoneale Metastasierung des PDAC supprimiert. Die Genexpressionsanalyse der verbleibenden Peritonealkarzinose in selektindefizienten Mäusen ergab eine Hochregulation von ITGAV. Für Integrine ist bekannt, dass sie an der festen Adhäsion von Leukozyten bzw. zirkulierenden Tumorzellen beteiligt sind (vgl. Kap. 2.2). Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass ITGAV selbst eine zentrale Rolle in der Metastasierung einnimmt, da der Verlust von ITGAV bei intakten E- und P-Selektinen zu einer ausgeprägten Reduktion der Peritonealkarzinose führt. Zudem führt der Knockdown und ITGAV in Kombination mit dem Verlust von E- und P-Selektinen zu einer zusätzlichen Reduktion der Peritonealkarzinose im Vergleich zum Knockdown von ITGAV bzw. Knockout der E- und P-Selektine alleine.

Das genaue Verständnis der molekularen Funktionsweise von ITGAV im PDAC ist daher zur Entwicklung neuartiger Therapiestrategien von zentraler Bedeutung. Zieht man hierzu Erkenntnisse für die Funktion von ITGAV in anderen Tumorentitäten hinzu, so ist hervorzuheben, dass ITGAV im Mammakarzinom TGF- β aktiviert und so die Metastasierung fördert (Li et al. 2015). Ebenso ist für das Plattenepithelkarzinom des Pharynx bekannt, dass das Heterodimer $\alpha v \beta 6$ TGF- β *in vivo* aktiviert und somit zu einer Zunahme des Tumorwachstums führt (Koopman et al. 2008). Hinz et al. (2013) zeigten, dass ITGAV enthaltende Heterodimere latente TGF- $\beta 1$ -Komplexe in der Extrazellulärmatrix binden und aktivieren können. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben gehört der TGF- β -Signalweg zu den Schlüsselkaskaden im PDAC (Yachida & Iacobuzio-Donahue 2013). Der TGF- β -Signalweg reguliert Proliferation, Apoptose, Epithelial-mesenchymale-Transition und besitzt immunmodulatorische Eigenschaften. Die Aktivierung der TGF- β -Signalkaskade führt letztlich zur Tumorprogression (Massagué 2008, Munger et al. 1999). SMAD4, welches essentiell für das physiologische *canonical signaling* der komplexen TGF- β -Signalkaskade ist (vgl. Kapitel 2.3), stellt mit 48-55 % eine häufige Deletion im PDAC dar. Um die Relevanz der SMAD4-Deletion in den nachfolgenden

Experimenten zu untersuchen, wurde zusätzlich die PDAC-Zelllinie BxPC3, welche eine SMAD4-Deletion aufweist, verwendet (Deer et al. 2010).

Um die Funktion von ITGAV nun weitergehend zu charakterisieren, wurden umfangreiche *in vitro* Studien begonnen. Hierzu wurde auch in der Zelllinie BxPC3, welche eine SMAD4-Deletion aufweist, mittels shRNA ein Knockdown von ITGAV hergestellt. Die Validierung mit FACS und Western Blot ergaben eine Restexpression von ITGAV < 25 % gegenüber der Kontrolle (vgl. Abb. 14 A).

Die *in vitro* Untersuchungen zum Migrationsverhalten ergaben für die beiden eingesetzten ITGAV-Knockdownzelllinien ein signifikant vermindertes Migrationsvermögen. Im Invasionsassay konnte gezeigt werden, dass das invasive Potential der BxPC3 ITGAV kd Zellen vermindert ist. PaCa 5061 Zellen konnten die Matrigel-Schicht im Invasionsassay nicht überwinden. Diese Resultate stimmen mit einer Arbeit von Ricono et al. (2009) überein, in der gezeigt wurde, dass der *Epidermal Growth Factor* zur Aktivierung des Heterodimers $\alpha\beta 5$ führt und so Invasion und Metastasierung *in vivo* fördert. Ricono et al. (2009) setzten hierzu ein Antagonist von Integrin $\alpha\beta 5$ ein.

Das Proliferationsverhalten wurde *in vitro* mittels XTT-Proliferationsassay quantifiziert, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen Knockdownzellen und Kontrollzellen gefunden wurden (vgl. Abb. 16 A). ITGAV hat somit keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation von PDAC-Zellen *in vitro*. Der Colony-Forming-Assay ergab, dass die Knockdown Zelllinien signifikant häufiger Kolonien ausbilden (vgl. Abb. 16 B). Der Knockdown von ITGAV erhöht die Fähigkeit der Tumorzelle Kolonien *in vitro* in Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel auszubilden.

Die Zelladhäsion *in vitro* wurde unter statischen und dynamischen Bedingungen untersucht. Unter statischen Bedingungen auf Matrigel zeigt sich das adhäsive Potential für BxPC3 ITGAV kd Zellen signifikant vermindert. Die Zelllinie PaCa 5061 ITGAV kd wies auf Fibronektin eine signifikant reduzierte Adhäsion auf (vgl. Abb. 17). Für die Extravasation der Tumorzelle ist im Rahmen der Metastasierung und

der Analogie zur Leukozytenadhäsionskaskade (vgl. Kap. 2.2) bekannt, dass die Integrin abhängige Adhäsion zur Anheftung der Tumorzellen auf dem Endothel führt und so die Fernmetastasierung fördert (Reymond et al. 2013). Das adhäsive Potential von ITGAV bildet sich im Unterschied zwischen den ITGAV Knockdown- und Kontrollzellen unter statischen Bedingungen ab.

Bei der Simulation der Tumorzelladhäsion bei physiologischen intravasalen laminaren Strömungsverhältnisse auf Lungenendothel wurde kein signifikanter Unterschied zwischen ITGAV Knockdown- und Kontrollzellen erfasst. Es adhärten insgesamt zu wenige Tumorzellen auf dem Endothel, um den ITGAV bedingten Unterschied des adhäsiven Potentials zwischen den Knockdown- und Kontrolltumorzellen zu erfassen.

Zusammenfassend geht der Verlust von ITGAV in PaCa 5061 Zellen und in SMAD4-deletierten BxPC3 Zellen *in vitro* mit einem signifikant vermindertem Migrations-, Invasions- und Adhäsionspotential einher.

Das subkutane Xenograft-Mausmodell in selektinkompetenten $\text{pfp}^{-/-}/\text{rag2}^{-/-}$ Mäusen wurde durchgeführt, um den Einfluss von ITGAV auf das Primärtumorstadium sowie die Fernmetastasierung und weiterhin den zugrundeliegenden Mechanismus zu untersuchen.

Es zeigte sich für die ITGAV Knockdownzelllinien PaCa 5061 und BxPC3 ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben gegenüber der Kontrolle, wobei sich das Primärtumorgewicht für die PaCa 5061 Kohorten nicht unterscheidet und das Gewicht der Primärtumore in der BxPC3 Kontrolltumorgruppe signifikant größer ist als in der ITGAV Knockdowngruppe. Der Unterschied beim Primärtumorgewicht erklärt sich durch die Abbruchkriterien, die zur Tötung des Versuchstieres führten. Diese waren entweder ein Tumolvolumen von mehr als 2 cm³ oder eine Hautulzeration des Tumors. Eine Ulzeration der Haut führte innerhalb der PaCa 5061 Kontrolltiere häufiger zur Tötung, obwohl das Primärtumorstadium nicht erreicht wurde. Hätte keine Ulzeration der Haut vorgelegen, wäre zu erwarten, dass sich das Überleben der PaCa 5061 Kontrollgruppe verlängert und die Diskrepanz

zur PaCa 5061 Knockdowngruppe noch verstärkt hätte. Vergleicht man die vorliegenden Resultate mit der Arbeit von Ricono et al. (2009), in der gezeigt werden konnte, dass die spezifische Blockade von Integrin $\alpha\beta 5$ Invasion und Metastasierung reduziert, ohne das Primärtumorwachstum zu beeinflussen, führt ein Knockdown der gesamten α -Untereinheit V zusätzlich zu einer Suppression des Primärtumorwachstums.

Die Disseminierung der Tumorzellen im Blut zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Folglich hat der Knockdown von ITGAV keinen Einfluss auf die Anzahl bzw. Vorhandensein von zirkulierender Tumorzellen (CTC). Dieser Befund entspricht klinischen Studien, bei denen an kleinen Kollektiven gezeigt wurde, dass sich bei an PDAC erkrankten Patienten unabhängig vom Stadium zirkulierende Tumorzellen nachweisen lassen (Kulemann et al. 2015). Untersuchungen an einem großen Kollektiv zur klinischen Bedeutung von CTCs beim PDAC stehen jedoch noch aus (Tjensvoll et al. 2014).

Hinsichtlich der Fernmetastasierung konnte eine signifikant verminderte Spontanmetastasierung der Tumorzellen in die Lunge nachgewiesen werden. Alle der mit BxPC3 Kontrollzellen inokulierten Tiere wiesen humane Zellen im Lungenparenchym auf, während in der ITGAV Knockdowngruppe humane Zellen bei lediglich 78 % nachweisbar waren. In den mit PaCa 5061 Kontrollzellen inokulierten Mäuse, waren bei 50 % humane Zellen in der Lunge nachweisbar während in der ITGAV Knockdownkohorte keine humanen Zellen nachgewiesen wurden. Ebenfalls war die mittlere Tumorzelllast in den ITGAV Knockdowntumoren vermindert. Hier muss einschränkend angeführt werden, dass die Tumorzelllast mathematisch aus den Resultaten der ALU-PCR ermittelt wurde und keine Rückschlüsse auf die Morphologie der Lungenmetastasen zulässt.

Im untersuchten Knochenmark waren keine humanen Tumorzellen nachweisbar. Eine Metastasierung in das Knochenmark ist beim PDAC extrem selten (Namikawa et al. 2016). Somit korrelieren die erhobenen Befunde mit der Klinik.

Um zu prüfen, ob der Knockdown von ITGAV *in vivo* stabil ist, wurde ITGAV immunhistochemisch auf den Primärtumoren angefärbt. Es zeigt sich eine stark verminderte Expression von ITGAV in den Knockdowntumoren, welches beweist, dass der Knockdown von ITGAV auch nach Implantation *in vivo* stabil ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Verlust von ITGAV im subkutanen Xenograft-Mausmodell nicht nur zu einer Verlängerung des medianen Überlebens, sondern auch zu einer Verminderung der spontanen pulmonalen Fernmetastasierung führt.

Zur Evaluierung der Aktivität der TGF- β -Signalkaskade in den Primärtumoren wurde in der vorliegenden Arbeit phospho-smad2 immunhistochemisch gefärbt. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil phospho-smad2 einen Hinweis auf die Aktivierung des TGF- β Signalwegs darstellt (vgl. Kap. 2.3). Der Anteil phospho-Smad2 positiver Zellkerne der PaCa 5061 ITGAV kd Primärtumore ist mit 5,42 % gegenüber der Kontrolle mit 11,30 % im Mittel signifikant vermindert. Folglich führt der Knockdown von ITGAV zu einer verminderten Aktivität des SMAD-abhängigen *canonical pathway* von TGF- β in PaCa 5061 Tumoren. Die Regulation der TGF- β -Signalkaskade in PaCa 5061 konnte durch die datenbankbasierte Genexpressionsanalyse der Primärtumore bestätigt werden.

Für BxPC3 ITGAV kd Tumore konnten gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der TGF- β -Signalkaskade nachgewiesen werden, welches sich durch die bestehende SMAD4-Deletion in den Zellen dieser Zelllinie erklären lässt. Auch finden sich in der Genexpressionsanalyse keine Hinweise für eine Regulation der TGF- β -Signalkaskade BxPC3. Hieraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Patienten ohne SMAD4-Deletion vermehrt von einer gegen ITGAV gerichtete Therapie profitieren könnten.

Nachfolgend wurden die Primärtumore des subkutanen Modells in selektinkompetenten *pfp^{-/-}/rag2^{-/-}* Mäusen hinsichtlich des Einflusses von ITGAV auf ihre generelle Morphologie, Apoptose- und Mitoserate, Vaskularisierung,

Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und Epitheliale-Mesenchymale-Transition immunhistochemisch weiter charakterisiert.

Bezüglich der generellen Morphologie fiel in den Übersichtsfärbungen ein massiver Anteil an nekrotischen Arealen zentral in den Primärtumoren der PaCa 5061 ITGAV kd und BxPC3 ITGAV kd Kohorten auf. Unterschiede hinsichtlich des Apoptoseverhaltens konnten mittels Feulgen-Färbung zwischen Kontrolltumoren und ITGAV Knockdowntumoren nicht gezeigt werden (vgl. Abb. 28). Die beobachtete Spannweite der Apoptoserate kann als Zeichen der intratumoralen Heterogenität gewertet werden. Somit kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass das verringerte Primärtumorwachstum eher durch Tumornekrose und nicht durch gesteuerte Apoptose entsteht.

Der erhobene *Ki 67 Labeling Index* bestätigte, dass der Knockdown von ITGAV keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation hat und steht in Einklang mit den *in vitro* Ergebnissen des Proliferationsassays. Hieraus lässt sich folgern, dass weder ITGAV selbst, noch die ITGAV-TGF- β -SMAD-Signalkaskade die Mitose- und Apoptoserate der PaCa 5061 und BxPC3 Zellen beeinflussen. Von Mamuya und Duncan (2012) beschriebene antiproliferative Effekte von TGF- β , konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der statischen Adhäsionsassays ist das verlangsamte Wachstum der Primärtumor in der PaCa 5061 und BxPC3 ITGAV Knockdowngruppe darin begründet, dass initial weniger Zellen angeheftet sind, daher weniger Foci proliferieren können und der Anteil der Nekrose größer ist (vgl. Abb. 27).

Eine mögliche Ursache für die massive Nekrose in den Primärtumoren der Knockdownkohorte ist eine eingeschränkte Oxygenierung. Für eine gesteigerte Hypoxie spricht ebenfalls die vermehrte Expression von ERO1L in den ITGAV Knockdowntumoren, welche in der Genexpressionsanalyse aufgefallen ist. May et al. (2005) wiesen nach, dass ERO1L bei Hypoxie im hepatozellulären Karzinom und Glioblastom zunimmt. Sie zeigten weiterhin, dass die Suppression von ERO1L zu einer verringerten Sekretion vom *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), und funktionell zu einer eingeschränkten Proliferation und gesteigerten Apoptose führen (May et al. 2005). Integrin $\alpha\beta 5$ assoziiert mit VEGF und steuert so die Proliferation

und Migration von Endothelzellen (Desgrosellier & Cheresh 2010, Weis & Cheresh 2011). Um zu überprüfen, ob Veränderungen der Gefäßdichte in den vitalen Tumorarealen, möglicherweise VEGF assoziiert vorliegen, wurde der auf Endothel exprimierte S1P-Rezeptor 1 immunhistochemisch in vitalem Gewebe der Primärtumore markiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen ITGAV Knockdown- und Kontrolltumoren erfasst werden (vgl. Abb. 30). Da bekannt ist, dass ITGAV Einfluss auf Endothelzellen hat (Desgrosellier & Cheresh 2010, Weis & Cheresh 2011), die vorliegenden Daten aber keinen Unterschied in der Dichte der Vaskularisierung zeigen, kann die Hypothese formuliert werden, dass der Einfluss von ITGAV auf die Tumolvaskularisierung in erster Linie von ITGAV des murinen Endothels ausgeht, auf das im vorliegenden Experiment keinen Einfluss genommen wurde. Die Gefäßdichte bleibt vom ITGAV Knockdown in den PaCa 5061 und BxPC3 Zellen unbeeinträchtigt.

In der Extrazellulärmatrix der Primärtumore der ITGAV-Knockdownkohorten ist eine Zunahme von murinem Fibronektin ermittelt worden, während das in einer weiteren Färbung erfasste humane Fibronektin keinen Unterschied zwischen ITGAV-Knockdownkohorten und der Kontrolle aufweist. Zudem wurden die Kollagenfasern der Extrazellulärmatrix des Primärtumors mittels Mallory-Färbung spezifisch angefärbt und quantifiziert. Hierbei war kein signifikanter Unterschied zwischen ITGAV Knockdown- und Kontrolltumoren nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass sich der Anteil von murinem Fibronektin in der Extrazellulärmatrix der Primärtumore erhöht. Honda et al. (2010) zeigten, dass TGF- β die Expression von Fibronektin, Integrin $\alpha\beta 3$ und $\alpha 11\beta 1$ in MRC-5 Zellen, einer myofibroblastischen Zelllinie, steigert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Knockdown von ITGAV zu einer geringeren Aktivität der TGF- β Signalkaskade in Tumorzellen führte. Am ehesten sind daher für die Zunahme des Fibronektins in der extrazellulären Matrix der ITGAV Knockdowntumore murine Stromazellen verantwortlich, die das fehlende ITGAV der Tumorzellen partiell kompensieren und dabei vermehrt Fibronektin sezernieren.

Für das PDAC ist bekannt, dass im Rahmen der TGF- β vermittelten EMT epitheliale Marker herunterreguliert, mesenchymale Marker verstärkt exprimiert und so funktionell das Migration- und Invasionspotential gesteigert werden (Maier et al.

2010). Als Marker für die TGF- β induzierte EMT wurde der Transkriptionsfaktor Twist in den Primärtumoren immunhistochemisch markiert (Yang et al. 2004, Hotz et al. 2007). In PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren wurde ein geringeres Signal von Twist-1 als in der Kontrollgruppe nachgewiesen, so dass hier von einer geringeren Aktivität der TGF- β induzierten EMT ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 35 B). Dieser Befund steht in Einklang mit den *in vitro* Daten und Resultaten der Genexpressionsanalyse. *In vitro* führt der Knockdown von ITGAV zu einer Reduktion des Migrations- und Invasionspotentials (vgl. Abb. 18). In der Genexpressionsanalyse konnte nachgewiesen werden, dass der Knockdown von ITGAV in PaCa 5061 Tumoren die Molekülinteraktionen *Laminin interactions* und *Degradation of the extracellular matrix* signifikant beeinflusst (vgl. Tab. 5).

Für andere Tumorentitäten ist der Zusammenhang zwischen ITGAV und der TGF- β induzierter EMT bereits belegt. Eine Überexpression von Integrin $\alpha\beta 6$ im Kolonkarzinom ist mit der EMT, TGF $\beta 1$ -Aktivierung und zunehmendem Migrationsvermögen assoziiert (Bates et al. 2005). Auch für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass $\alpha\beta 3$ mit zunehmender EMT korreliert (Gallagher & Schiemann 2006). Die vorliegenden Daten zeigen für das PDAC, dass der Knockdown von ITGAV bei regulärem SMAD4 einen hemmenden Einfluss auf die EMT hat und mit einer verminderten Metastasierung einhergeht (vgl. Abb. 22 B).

In der Genexpressionsanalyse der Primärtumore wurde zudem nachgewiesen, dass das *mTOR signaling* in PaCa 5061 ITGAV kd Tumoren signifikant reguliert ist. Studien zum Bronchialkarzinom zeigen, dass die TGF- β abhängige Induktion der EMT mit der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade interagiert (Baek et al. 2016). Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass diese Interaktion auch beim PDAC besteht. So ist mLST8, eine erforderliche Untereinheit des *mTOR complex 1* (mTORC1) und *mTOR complex 2* (mTORC2) in PaCa5061 ITGAV kd Tumoren mit -2,08 signifikant herunterreguliert. LST8 interagiert direkt mit mTOR und steigert dessen Kinaseaktivität. Zudem ist bekannt, dass der Knockdown von mLST8 die mTORC1- sowie die mTORC2-Komplexbildung supprimiert und funktionell zu einer Reduktion des Tumorwachstums im Kolon- und Prostatakarzinom führt (Kakumoto et al. 2015). Lamouille et al. (2012) gelang der Nachweis, dass TGF- β den *mTOR complex 2* aktiviert und so die EMT und die Invasion der Tumorzelle *in vivo* initiiert.

Es lässt sich für die PaCa 5061 ITGAV kd Primärtumore folgern, dass der Knockdown von ITGAV, vermittelt über die komplexe TGF- β Signalkaskade, zu einer geringen Aktivität des *mTOR signaling* führt. Im Hinblick auf das PDAC wird die Inhibition des *mTOR signaling* bei KRAS-abhängigen Tumoren als vielversprechende Therapieoption angesehen. Zwar hat sich die Inhibition mit nur einem Inhibitor des *mTOR signaling* nicht bewährt, die Kombination mehrerer Inhibitoren zur Kontrolle des mTOR Signaling wird allerdings gegenwärtig diskutiert (Morran et al. 2014). Hierzu könnte die mit dem ITGAV Knockdown assoziierte Suppression des *mTOR Signaling* einen weiteren Ansatz bieten.

Weiterhin ist bekannt, dass TGF- β im Rahmen der EMT die Sekretion von Calponin vermittelt (Shirakihara et al. 2013). Interessanterweise konnte in der Genexpressionsanalyse eine Verminderung von Calponin für beide untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Dieser Befund zeigt, dass in den SMAD4 deletierten BxPC3 Zellen das SMAD unabhängige *non-canonical Signaling* der TGF- β Signalkaskade funktionell bedeutsam ist.

Ebenfalls bei beiden untersuchten ITGAV Knockdownkohorten fiel in der Genexpressionsanalyse auf, dass MMP10, welche den mesenchymalen Marken zugeordnet werden kann, -1,84-fach in BxPC3 bzw. -7,92-fach in PaCa 5061 herunterreguliert ist. Zhang et al. (2014) konnten zeigen, dass die verminderte Expression von MMP10 das invasive und metastatische Potential von PDAC-Zellen reduziert. Dies steht in Einklang mit den Resultaten des Invasionsassays und subkutanen Tierversuchs, in denen ein reduziertes Migrations- und Invasionsverhalten bzw. verminderte pulmonale Metastasierung bei beiden untersuchten Ziellinien nachgewiesen wurden.

Aus der Genexpressionsanalyse geht zudem hervor, dass CEACAM-7 in beiden untersuchten ITGAV Knockdownzelllinien vermehrt exprimiert wird. Immunhistochemische Analysen des normalen Pankreas zu CEACAM-7 zeigen eine oberflächliche Expression auf einzelner Zellen in den Gangstrukturen des Pankreas (Schölzel et al. 2000). Das Modell der Tumorstammzelle besagt, dass Tumorstammzellen aus normalen Gewebestammzellen hervorgehen (Wicha et al. 2006). Bei unseren Modellen handelt es sich folgerichtig um PDAC, obwohl auch

viele azinäre Strukturen beobachtet werden. Möglicherweise führt der Knockdown von ITGAV also zu einer Re-Differenzierung der Tumorzelle, welches als eine Therapiestrategie diskutiert wurde (Pierce & Speers 1988). Weiterhin ist dieses Resultat von besonderem Interesse, da es ein Hinweis auf die Ursprungszelle der untersuchten Zelllinien darstellen könnte. Um die Frage zu klären, ob die CEACAM-7 exprimierenden Zellen in normalem Pankreas Gewebestammzellen sind, aus denen die Tumorstammzelle hervorgeht, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls CEACAM-7 kann letztlich auch ein Kompensationsmechanismus der Tumorzelle sein, der durch die ITGAV Knockdown assoziierte Reduktion des adhäsiven Potentials ausgelöst wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die durch den Knockdown von ITGAV ausgelösten *in vivo* und *in vitro* Veränderungen additiv zum einen aus dem Verlust von ITGAV selbst und dem Integrin eigenen *Signaling* und zum anderen aus der geringeren Aktivität der TGF- β Signalkaskade, *canonical* und *non-canonical*, zusammensetzen. ITGAV stellt somit eine neue vielversprechende Zielstruktur für die Therapie des PDAC dar, insbesondere für Tumore mit überexprimiertem ITGAV und intaktem SMAD4. Niedermolekulare Inhibitoren und Antikörper gegen ITGAV werden aktuell bereits klinisch evaluiert (vgl. Kapitel 2.5). Die effektive pharmakologische Inhibition von ITGAV im Pankreaskarzinom geht als neue wissenschaftliche Herausforderung aus dieser Arbeit hervor.

6 Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist inzwischen die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache in den USA. Zur Entwicklung innovativer Therapiestrategien ist ein besseres molekularbiologisches Verständnis der Tumorprogression essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Relevanz von Hyaluronan und ITGAV untersucht. Der Anteil an Hyaluronan in der Matrix des PDACs erreicht keine prognostische Signifikanz, während ITGAV positive Tumore mit einem verminderten Überleben assoziiert sind. ITGAV eignet sich somit als prognostischer Marker für das PDAC.

Im intraperitonealen Xenograft-Mausmodell führte der Knockdown von ITGAV zu einer Reduktion der Peritonealkarzinose. In Versuchstieren mit Knockout der E- und P-Selektinen vermindert der Knockdown von ITGAV die Peritonealkarzinose zusätzlich. Das subkutane Xenograft-Mausmodell bestätigt die ITGAV vermittelte Tumorprogression. Primärtumorstadium und Fernmetastasierung nehmen unter dem Einfluss von ITGAV zu. *In vitro* vermittelt ITGAV Migration, Proliferation und Adhäsion der Tumorzellen.

Es wurde nachgewiesen, dass ITGAV latentes TGF- β im PDAC aktiviert. Mechanistisch beruhen die Effekte des ITGAV Knockdowns somit auf dem Verlust des Integrins selbst sowie des Integrin eigenen *Signaling* und zum anderen auf der verminderten Aktivität der TGF- β Signalkaskade.

Die Inhibition von ITGAV ist eine neue vielversprechende Therapiestrategie für das duktales Adenokarzinom des Pankreas.

7 Abstract

For the first time in 2016, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) was the third most common tumor-associated cause of death in the USA. A better understanding of not only the molecules involved in progression at the molecular level, but also the resulting innovative therapeutic approaches is urgently needed to improve the clinical situation. The tumor stroma represents a barrier to the diffusion of chemotherapeutic agents and biologicals meaning that substances do not reach all the tumor cells. Hyaluronan is a major component in this extracellular matrix of the tumor stroma. Interaction with this matrix is regulated by the cell-matrix adhesion molecule integrin αV (ITGAV). Changes in cell-matrix interaction are functionally important since they enable the tumor cells to invade the adjacent tumor stroma.

This study investigated the relevance of hyaluronan and ITGAV to prognosis of patients with PDAC using tissue microarray. The level of hyaluronan in the PDAC matrix did not have prognostic significance, while ITGAV-positive tumors were associated with a lower rate of survival. ITGAV is thus suitable as a prognostic marker for PDAC.

In the intraperitoneal xenograft mouse model, ITGAV knockdown led to a reduction of peritoneal carcinomatosis. In E-selectin and P-selectin knockout mice the ITGAV knockdown reduced the peritoneal carcinomatosis in an additive manner. The subcutaneous xenograft mouse model, where primary tumor growth and distant metastases increase under the influence of ITGAV, confirms ITGAV-mediated tumor progression. *In vitro* ITGAV regulates migration, proliferation and adhesion of tumor cells

In respect to the underlying mechanism, it was shown that ITGAV activates latent TGF- β in PDAC. Subsuming the effects of ITGAV knockdown are based on the loss of the integrin itself and its own signaling, as well as on the reduced activity of the TGF- β signaling pathway.

ITGAV inhibition is a new and promising therapeutic strategy for pancreatic ductal adenocarcinoma. How to effectively inhibit ITGAV pharmacologically in PDAC emerges from this investigation as a new scientific challenge.

8 Aus der Dissertation hervorgegangene Vorveröffentlichungen

Gebauer, F.*, Kemper, M.*, Sauter, G., Prehm, P., Schumacher, U., 2017. Is hyaluronan deposition in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma of prognostic significance? *PLoS ONE*, 12, pp.1–11.

* geteilte Erstautorenschaft

9 Literaturverzeichnis

- Akagi, T. et al., 2012. Visinin-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 131, pp.1307–17
- Alexakis, N. et al., 2004. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*, 91, pp.1410–1427.
- Auvinen, P. et al., 1997. Expression of hyaluronan in benign and malignant breast lesions. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 74, pp.477–481.
- Baek, S.H. et al., 2016. Ginkgolic Acid Inhibits Invasion and Migration and TGF- β -Induced EMT of Lung Cancer Cells through PI3K/Akt/mTOR Inactivation. *Journal of Cellular Physiology*, pp.1–9.
- Bardeesy, N. & DePinho, R. a, 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature reviews. Cancer*, 2, pp.897–909.
- Bates, R.C. et al., 2005. Transcriptional activation of integrin beta 6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2).
- Baum, O. et al., 2007. Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the beta3 integrin subunit. *International journal of oncology*, 30, pp.325–332.
- Beauchemin, N. & Arabzadeh, A., 2013. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32, pp.643–671.
- Benton, G. et al., 2011. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 128, pp.1751–7.
- Box, P.O. & Fields, I., 1998. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *British journal of cancer*, 77, pp.1–10.
- Cheng, X.B. et al., 2013. Prognostic impact of hyaluronan and its regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 8, pp.1–7.
- Cirkel, G.A. et al., 2016. A dose escalating phase i study of GLPG0187, a broad spectrum integrin receptor antagonist, in adult patients with progressive high-grade glioma and other advanced solid malignancies. *Investigational New Drugs*, 34, pp.184–192.
- Coupland, L.A., Chong, B.H. & Parish, C.R., 2012. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells. *Cancer Research*, 72, pp.4662–4671.
- Deer, E.L. et al., 2010. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*, 39, pp.425–435.
- Derynck, R. & Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, pp.577–584.
- Desgrosellier, J.S. et al., 2009. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nature medicine*,

- 15, pp.1163–9.
- Desgrosellier, J.S. & Cheresch, D., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer*, 10, pp.9–22.
- Ding, H. et al., 2011. Bioconjugated PLGA-4-arm-PEG branched polymeric nanoparticles as novel tumor targeting carriers. *Nanotechnology*, 22, p.165101.
- Edge, S. et al., 2010. Exocrine and Staging, endocrine pancreas. AJCC cancer manual, 7th ed. *Springer*, pp.241–9.
- Eichbaum, C. et al., 2011. Breast cancer cell-derived cytokines, macrophages and cell adhesion: Implications for metastasis. *Anticancer Research*, 31, pp.3219–3227.
- Felding-Habermann, B. et al., 1996. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *The Journal of biological chemistry*, 271, pp.5892–5900.
- Franken, N. et al., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1, pp.2315–9.
- Fuhrmann, I.K. et al., 2015. Comparative immunohistochemical evaluation of the zonal distribution of extracellular matrix and inflammation markers in human meniscus in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Acta Histochemica*, 117, pp.243–254.
- Gallagher, A.J. & Schiemann, W.P., 2006. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast cancer research : BCR*, 8, p.42.
- Gebauer, F. et al., 2013. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice. *Gut*, 62, pp.741–50.
- Gebauer, F. et al., 2014. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE*, 9, p.113023.
- Gebauer, F. et al., 2017. Is hyaluronan deposition in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma of prognostic significance? *PLoS ONE*, 12, pp.1–11.
- Gueugnon, F. et al., 2015. Kallikrein-related peptidase 13: an independent indicator of favorable prognosis for patients with nonsmall cell lung cancer. *Tumor Biology*, 36, pp.4979–4986.
- Hariharan, D., Saied, A & Kocher, H.M., 2008. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 10, pp.58–62.
- He, Z. et al., 2015. Expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in pancreatic cancer. *Oncology Letters*, 9, pp.793–797.
- Henderson, N.C. et al., 2013. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature medicine*, 19, pp.1617–24.
- Hezel, A.F. et al., 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*, 20, pp.1218–49.
- Hingorani, S.R. et al., 2016. Phase Ib Study of PEGylated Recombinant Human Hyaluronidase and Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer.

- Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22, pp.2848–54.
- Hinz, B., 2013. It has to be the α v: myofibroblast integrins activate latent TGF- β 1. *Nature medicine*, 19, pp.1567–8.
- Hosotani, R. et al., 2002. Expression of Integrin alpha V beta 3 in Pancreatic Carcinoma : Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. 25, pp.30–35.
- Hotz, B. et al., 2007. Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 13, pp.4769–4776.
- Humphries, J.D., Byron, A. & Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, 119, pp.3901–3.
- Huveneers, S. et al., 2007. Integrin alpha v beta 3 controls activity and oncogenic potential of primed c-Src. *Cancer Research*, 67, pp.2693–2700.
- Iacobuzio-Donahue, C.A. et al., 2009. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 27, pp.1806–1813.
- Jaworski, M. & Thome, M., 2016. The paracaspase MALT1: Biological function and potential for therapeutic inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, pp.459–473.
- Jiang, H.-L. et al., 2015. Loss of RAB1B promotes triple-negative breast cancer metastasis by activating TGF- β /SMAD signaling. *Oncotarget*, 6, pp.16352–65.
- Jonas, S., Rafetseder, O. & Wild, C., 2009. Immunhistochemische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Extrazellulärmatrrix beim Pankreaskarzinom. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 7, pp. 7-12
- Jones, S. et al., 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, pp.1801–6.
- Kakumoto et al., 2015. mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PLoS ONE*, 10 p. e0119015
- Kalinina, T. et al., 2010. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC cancer*, 10, p.295.
- Kikkawa, H. et al., 2002. Role of integrin α v β 3 in the early phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clinical and Experimental Metastasis*, 19, pp.717–725.
- Köhler, S. et al., 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. *British journal of cancer*, 102, pp.602–9.
- Koopman Van Aarsen, L.A. et al., 2008. Antibody-mediated blockade of integrin α v β 6 inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor- β -regulated mechanism. *Cancer Research*, 68, pp.561–570.
- Koutsiaris, A.G. et al., 2007. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*, 44, pp.375–86.
- Kulemann, B. et al., 2015. Circulating tumor cells found in patients with localized

- and advanced pancreatic cancer. *Pancreas*, 44, pp.547–550.
- Lamouielle, S et al., 2012. TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Journal of Cell Science*, 2012, 125, pp. 1259-1273.
- Li, M.O. & Flavell, R.A., 2015. TGF- β : A Master of All T Cell Trades. 27, pp.320–331.
- Li, Y. et al., 2015. Genetic depletion and pharmacological targeting of α v integrin in breast cancer cells impairs metastasis in zebrafish and mouse xenograft models. *Breast Cancer Research*, 17, pp.1–16.
- Ludbrook, S.B. et al., 2003. transforming growth factors β 1 and β 3. 318, pp.311–318.
- Lüders, N. & Schumacher, U., 2017. Sphingosine-1-Phosphate-Receptor 1 as a Marker for Endothelial Cells in Mouse Xenograft Models of Human Cancer. *Anticancer Research*, 37, pp.3607–3614.
- Maier, H.J., Wirth, T. & Beug, H., 2010. Epithelial-Mesenchymal transition in Pancreatic Carcinoma. *Cancers*, 2, pp.2058–2083.
- Makrilia, N. et al., 2009. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer investigation*, 27, pp.1023–1037.
- Mamuya, F. a & Duncan, M.K., 2012. α v integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16, pp.445–55.
- Marelli, U.K. et al., 2013. Tumor Targeting via Integrin Ligands. *Frontiers in oncology*, 3, p.222.
- Martin, TA et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
- Massagué, J., 2008. TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
- May, D. et al., 2005. Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer. *Oncogene*, 24, pp.1011–1020.
- Morran, D.C. et al., 2014. Targeting mTOR dependency in pancreatic cancer. *Gut*, 63 pp. 1-10.
- Munger, J.S. et al., 1999. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin α v β 6 Binds and Activates Latent TGF β 1. *Cell*, 96, pp.319–328.
- Nakamura, H. et al., 2011. Decreased expression of LMO7 and its clinicopathological significance in human lung adenocarcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2, pp.1053–1057.
- Namikawa, H. et al., 2016. Disseminated carcinomatosis of the bone marrow from pancreatic cancer: a case report. *BMC cancer*, 16, p.801.
- Nehmann, N. et al., 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 histochemica*, 112, pp.489–96.
- O'Day, S. et al., 2011. A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- α v-

- integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *British journal of cancer*, 105, pp.346–52.
- Ormanns, S. et al., 2014. Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. *Trillium Krebsmedizin*, 23, pp.110–115.
- Partridge, J., 2010. BD Falcon™ FluoroBlok™ Tips and Techniques. [Online im Internet.]
URL:https://www.bdbiosciences.com/documents/webinar_2010_04_fluoroblok.pdf [Stand: 18.12.2017, 15:15].
- Pierce, G.B. & Speers, W.C., 1988. Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal: Prospects for Therapy by Directing Differentiation. *Cancer Research*, 48, pp.1996–2004.
- Qin, Y. et al., 2014. Effect of DAPK1 gene on proliferation, migration, and invasion of carcinoma of pancreas BxPC-3 cell line. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7, pp.7536–7544.
- Reinard, T. 2010. Molekularbiologische Methoden, Auflage 1, UTB Verlag, Stuttgart
- Reymond, N., D'Água, B.B. & Ridley, A.J., 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 13, pp.858–70.
- Ricono, J.M. et al., 2009. Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alpha v beta 5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer Research*, 69, pp.1383–1391.
- Ropponen, K. et al., 1998. Tumor Cell-associated Hyaluronan as an Unfavorable Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Cancer Research* pp.342–347.
- Sawai, H. et al., 2008. Basement Membrane Proteins Play an Important Role in the Invasive Processes of Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Surgical Research*, 144, pp.117–123.
- Schölzel, S. et al., 2000. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *The American journal of pathology*, 156, pp.595–605.
- Setälä, L.P. et al., 1999. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *British journal of cancer*, 79, pp.1133–8.
- Shepard, H.M., 2015. Breaching the Castle Walls: Hyaluronan Depletion as a Therapeutic Approach to Cancer Therapy. *Frontiers in oncology*, 5, p.192.
- Shirakihara, T. et al., 2013. Identification of integrin alpha 3 as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Science*, 104, pp.1189–1197.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A., 2016. Cancer statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 66, pp.7–30.
- Smith, P.K. et al., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, pp.76–85.
- Sugarbaker, T.A., Chang, D. & Sugarbaker, P.H., 1999. Quantitative methodologies for selection of patients with recurrent abdominopelvic sarcoma for treatment. *European Journal of Cancer*, 35, pp.413–419.
- Tan, M.H. et al., 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor

- line. *Cancer investigation*, 4(1), pp.15–23.
- Tannapfel, A. 2010. Pancreatic cancer. Molecular and surgical pathology. *Der Pathologe*, 31, pp.225–8.
- Thomas, G.J. et al., 2001. Expression of the alpha v beta 6 Integrin Promotes Migration and Invasion in Squamous Carcinoma Cells. 650, pp.67–73.
- Tjensvoll, K., Nordgård, O. & Smaaland, R., 2014. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: Methods of detection and clinical implications. *International Journal of Cancer*, 134, pp.1–8.
- Tsui, I.F.L. et al., 2007. Public databases and software for the pathway analysis of cancer genomes. *Cancer Informatics*, 3, pp.389–407.
- Vestweber, D., 2012. Novel insights into leukocyte extravasation. *Current Opinion in Hematology*, 19, pp.212–217.
- Vincent, A. et al., 2011. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791), pp.607–620.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W., 2015. The Path to Cancer — Three Strikes and You're Out Bert. *New England Journal of Medicine*, 373, pp.1893–1895.
- Wagner, C., 2010. *Molekulare Onkologie*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Weis, S.M. & Cheresh, D. a, 2011. α V integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1, p.6478.
- Welsch, U. et al., 2010. *Lehrbuch der Histologie*, 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München
- Wicha, M.S., Liu, S. & Dontu, G., 2006. Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. *Cancer Research*, 66, pp.1883–1890.
- Wicklein, D., 2012. RNAi Technology to Block the Expression of Molecules Relevant to Metastasis: The Cell Adhesion Molecule CEACAM1 as an Instructive Example. In *Metastasis Research Protocols SE - 16*, M. Dwek, S. A. Brooks, & U. Schumacher, Humana Press, pp. 241–250.
- Wolfgang, C. et al., 2013. Recent progress in pancreatic cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63, pp.318–48.
- Wu, G. et al., 2014. ReactomeFIViz: a Cytoscape app for pathway and network-based data analysis. *F1000Research*, 3, p.146.
- Yachida, S. & Iacobuzio-Donahue, C. a, 2013. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene*, 32, pp.5253–60.
- Yang, J. et al., 2004. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, 117, pp.927–939.
- Yang, L. et al., 2015. Expression of serum miR-218 in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Clinical and Translational Oncology*, 8, pp.1–7.
- Yeung, T.M. et al., 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, pp.3722–7.
- Yilmaz, M. & Christofori, G., 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, pp.15–33.
- Zhang, J.-J. et al., 2014. Yin Yang-1 suppresses invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by downregulating MMP10 in a

- MUC4/ErbB2/p38/MEF2C-dependent mechanism. *Molecular cancer*, 13, p.130.
- Zhang, X. et al., 2015. LRIG1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via suppression of the EGFR/PI3K/AKT pathway and epithelial-to-mesenchymal transition in human glioma SHG-44 cells. *Cell Stress and Chaperones*, 20, pp.631–641.
- Zwiener, I., Blettner, M. & Hommel, G., 2011. Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt international*, 108, pp.163–169.

10 Erklärung des Eigenanteils

Der Entwurf der Arbeit erfolgte durch PD Dr. Florian Gebauer und PD Dr. Daniel Wicklein, Prof. Dr. Udo Schumacher und mich. Durchführung und Auswertung des Tissue-Microarray erfolgte durch Prof. Dr. Udo Schumacher, PD Dr. Florian Gebauer und mich. Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie erfolgte durch mich. Durchführung und Ausführung der in vitro Studien erfolgte durch Hanna Maar und mich. Durchführung und Auswertung der Xenograft Studien erfolgte durch mich. Die Genexpressionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit dem National Medical Research Radiological Center in Moskau, Russland durchgeführt. Die funktionelle Analyse erfolgte durch mich.

Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgten durch PD Dr. Florian Gebauer, PD Dr. Daniel Wicklein, Prof. Dr. Udo Schumacher und mich.

Das Manuskript wurde von PD Dr. Florian Gebauer und Prof. Dr. Udo Schumacher und mir verfasst.

11 Danksagung

Für die vertrauensvolle Überlassung des spannenden Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit der Forschung im Labor des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie danke ich Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher. Seine theoriegeleiteten Anregungen haben mir wertvolle Hinweise für die inhaltliche Konzeptionierung der Experimente und Ausarbeitung des Manuskripts gegeben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Daniel Wicklein und PD Dr. med. Florian Gebauer für die Heranführung an das Thema, für den vielseitigen fachlichen Rat sowie die engagierte Betreuung meines Promotionsvorhabens.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern und involvierten Kollegen aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie und anderen Arbeitsgruppen für die wichtigen Erfahrungen, die sehr freundschaftliche Unterstützung und den Austausch in der Zeit des experimentellen Arbeitens.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und Freunde, die mich immer unterstützt haben.

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 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: