

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Direktor: Prof. Dr. Udo Schumacher

Einfluss des Integrin $\beta 4$ auf das Wachstum des Adenokarzinoms des Pankreas

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lennart Kaan Kirchner
aus Hannover

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.05.2019**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Diagnostik und Therapie.....	2
1.1.3	Pathophysiologie und Vorläuferläsionen.....	4
1.2	Metastasierung.....	6
1.3	Theorie der Xenograftmodelle und Vorarbeiten.....	8
1.4	Integrin $\beta 4$	9
1.5	<i>Anoikis</i>	11
1.6	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material.....	15
2.2	Methoden der Zellkultur.....	15
2.2.1	Zellkultur.....	15
2.2.2	Erstellung und Nachweis des Knockdowns.....	17
2.2.3	Analyse des Zellwachstums.....	19
2.2.4	Kolonienformation unter 3D-Wachstumsbedingungen.....	20
2.3	Histologie und Immunhistochemie.....	21
2.3.1	Herstellen histologischer Schnitte.....	21
2.3.2	Feulgen.....	22
2.3.3	Ki-67.....	23
2.3.4	pH2AX.....	25
2.3.5	SDF-1.....	25
2.3.6	pFAK.....	26
2.4	ELISA.....	27
2.4.1	Proteinextraktion aus Zellen und Geweben.....	27
2.4.2	Vorbereitung - Zellysate.....	28
2.4.3	Durchführung des ELISA.....	29
2.5	Western Blot (WB).....	30
2.5.1	Proteinextraktion aus Geweben.....	30
2.5.2	Durchführung des Western Blot.....	30
2.6	Statistische Auswertung.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Überprüfung des ITGB4-KD-Status und Analyse des Zellwachstums <i>in vitro</i> 35	
3.2	Zellkultur mit konditioniertem Medium.....	36
3.3	Kolonienformation mit konditioniertem Medium.....	37

3.4	Apoptose vs. Proliferation <i>in vivo</i>	39
3.4.1	Feulgen.....	40
3.4.2	pH2AX.....	42
3.4.3	Zellproliferation <i>in vivo</i>	43
3.5	SDF-1 Produktion und Sekretion	43
3.5.1	ELISA aus Zelllysaten und Kulturüberständen.....	43
3.5.2	ELISA aus Tumorlysaten	45
3.5.3	SDF-1 Immunhistologie.....	46
3.6	Quantifizierung von Proteinen mittels WB	47
3.6.1	Immunhistologische Validierung der pFAK Veränderung.....	50
4	Diskussion	51
4.1	Apoptose vs. Proliferation.....	52
4.2	CXCL12 (SDF-1).....	53
4.3	Ein autokriner Mechanismus?	54
4.4	Intrazelluläre Signaltransduktion.....	56
4.5	VEGF als autokriner Wachstumsfaktor.....	59
4.6	Tumorassoziierte Makrophagen	61
5	Zusammenfassung	62
6	Abstract	63
7	Abkürzungsverzeichnis.....	64
8	Literaturverzeichnis	67
9	Danksagung	78
10	Lebenslauf	79
11	Eidesstattliche Erklärung	80

1 Einleitung

1.1 Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Mehr als 9 von 10 Patienten mit Pankreaskarzinom versterben innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung (Kaatsch et al. 2017, Schmid 2006). In Deutschland steht das Pankreaskarzinom mit 8.550 Neuerkrankungen bei Männern an 10. bzw. mit 8.580 Neuerkrankungen bei Frauen an 6. Stelle der Krebsneuerkrankungen, jedoch an 4. Stelle der durch Krebserkrankungen bedingten Todesfälle (Stand 2014). Die geringe Überlebensrate spiegelt sich auch in den Sterbefällen wider. So starben im Jahr 2014 8.231 Männer und 8.384 Frauen an dieser Erkrankung, so dass die Zahl der Sterbefälle fast an die der Neuerkrankungen reicht. Die absolute Zahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle steigt seit 1990 stetig (Kaatsch et al. 2017, Schmid 2006).

Es gibt mehrere Risikofaktoren an einem Pankreaskarzinom zu erkranken wie z.B. Geschlecht, ethnischer Ursprung und Alter, wobei der Altersgipfel in der 7. Lebensdekade liegt und Männer häufiger als Frauen erkranken. Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist nicht vollständig geklärt, wird aber durch Umwelteinflüsse und genetische Faktoren bestimmt.

Von zahlreichen postulierten Umwelteinflüssen lassen sich nur Nikotinkonsum und Adipositas statistisch sichern, während der Genuss von koffeinhaltigen Getränken keinen nachweisbaren Effekt hat (Schmid 2006). Ein erhöhtes Risiko findet sich auch bei positiver Familienanamnese und einigen genetischen Erkrankungen (Kaatsch et al. 2013). Dazu gehören das Peutz-Jeghers-Syndrom, das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und die hereditäre Pankreatitis. Ein wichtiger Risikofaktor ist eine langjährige chronische Pankreatitis, wenngleich der Einfluss der chronischen Pankreatitis bislang überschätzt wurde (Schmid 2006, Schulte 2013).

Weitere Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko für ein Pankreaskarzinom einhergehen sind das Lynch-Syndrom und die *Ataxia teleangiectasia*, bei der vereinzelt Pankreaskarzinome beschrieben wurden (Jae-Gahb et al. 1999, Roberts et al. 2012).

1.1.2 Diagnostik und Therapie

Ein geringes Ansprechen des Tumors auf Strahlentherapie und Chemotherapeutika, sowie die frühe lymphogene, perineurale, hämatogene und peritoneale Metastasierung bei fehlender Organkapsel erklären die geringe Lebenserwartung eines Patienten bei Diagnosestellung (Hezel et al. 2006, Li et al. 2004, Warshaw und Castillo 1992). Symptome entstehen meist erst durch lokale Invasion umgebender anatomischer Strukturen wie Magen und Kolon, können aber auch durch Fernmetastasen in z.B. Leber und Lunge verursacht werden. Zum Zeitpunkt des Todes sind bei bis zu 80% der Patienten Metastasen in der Leber, bei 60% im Peritoneum und zwischen 50-70% in Lunge bzw. Pleura vorzufinden (Lillemoe et al. 2000). Tumore des Pankreaskopfes oder -körpers äußern sich auch durch die Einengung umgebender Strukturen, wie Gallengang (schmerzloser Ikterus), Nerven des Plexus coeliacus, Ductus pancreaticus und des Duodenums (Evans et al. 1997).

Die Heilungsraten dieses Karzinoms haben sich im Laufe der Zeit nur geringfügig gebessert und trotz umfassender Weiterentwicklungen in den konventionellen Behandlungsmethoden wie Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie in den letzten Jahrzehnten kann medizinisch noch immer nur sehr geringfügig Einfluss auf den Verlauf dieser Erkrankung genommen werden (5-Jahresüberleben 1996 von 4,3%; 2012 8,6%) (Howlader et al. 2016). Da dieses Adenokarzinom meist keine Frühsymptomatik aufweist, können etwa 80% der Pankreaskarzinome aufgrund ihres fortgeschrittenen Wachstums zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr kurativ operiert werden, auch wenn die chirurgische Resektion die derzeit einzige kurative Behandlungsoption darstellt (Li et al. 2004). Bei einem Pankreaskopfkarzinom ist eine partielle Duodenopankreatektomie, die sog. Operation nach Kausch-Whipple (kurz Whipple OP), indiziert. Hierbei werden neben dem Pankreaskopf und Duodenum auch Gallenblase, distaler Gallengang und das Magenantrum entfernt. Eine Alternative ist hierbei die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (nach Traverso-Longmire), bei welcher der Magen mit Pylorus vollständig erhalten bleibt. Beim Befall des Pankreasschwanzes wird eine Pankreaslinksresektion, bei Pankreaskörpertumoren eine totale Duodenopankreatektomie durchgeführt (Ducreux et al. 2015).

Für den Einsatz von neoadjuvanten Therapien wurden bisher keine größeren Studien durchgeführt, so dass es keine Behandlungsstandards gibt. In Phase-II-Studien zeigte sich aber, dass eine neoadjuvante Radiochemotherapie ein *downstaging* von bisher inoperablen Tumoren erreichen konnte und so eine Operation ermöglicht wurde.

Zudem könnte dies die R0-Resektionsrate (Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe) erhöhen. Ein signifikanter Überlebensvorteil zeichnet sich jedoch nicht ab, so dass die Durchführung neoadjuvanter Radiochemotherapien derzeit noch Studien vorbehalten ist (Oettle und Sinn 2010).

Die adjuvante Chemotherapie hingegen bietet einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber operierten Patienten ohne adjuvante Therapie (Neoptolemos et al. 2004, Stocken et al. 2005). In Europa wird hierbei das Pyrimidinanalogon Gemcitabin, in den USA meistens 5-Floururacil als Zytostatikum verwendet.

Auch nach einer kurativen Operation (R0-Resektion) liegt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aufgrund häufiger Rezidive und Komplikationen durch Metastasen bei nur ca. 20% (Shaib et al. 2007, Strobel und Werner 2013). Falls der Tumor hingegen schon ein lokal fortgeschrittenes Wachstum aufweist, kann eine kurative Operation nicht mehr durchgeführt werden. Hier bietet sich eine palliative Chemotherapie mit Gemcitabin für die Symptomlinderung an (Burriss et al. 1997). Dieses wird häufig als Kombinationschemotherapie zusammen mit nabPaclitaxel angewendet (Von Hoff et al. 2013). Das Behandlungsschema FOLFIRINOX (**F**olinsäure, **5-F**loururacil, **I**rinotecan und **O**xaliplatin) weist zwar längere Überlebenszeit bei lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom im Vergleich zu Gemcitabin auf, geht jedoch auch mit deutlich stärkeren Nebenwirkungen einher. Ein weiteres Medikament, das für die Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms in Deutschland zugelassen ist, ist der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib, welcher die Tyrosinkinase-Domäne des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) inhibiert. In einer Phase-III-Studie des National Cancer Institute of Canada mit 569 Patienten zeigte sich ein verlängertes Gesamtüberleben, verbessertes 1-Jahres-Überleben und progressionsfreies Überleben in der Patientengruppe, die mit Erlotinib + Gemcitabin behandelt wurde, im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie (Moore et al. 2007). Auch die Kombinationstherapie mit Platinanaloga zeigt eine mögliche Überlegenheit gegenüber der Monotherapie (Heinemann et al. 2007).

Die *targeted therapies*, zu denen monoklonale Antikörper und *small molecules* wie Erlotinib gehören, sind bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms bisher noch nicht ausgeschöpft, jedoch wird für eine effektive Therapie auch ein entsprechendes „*target*“ benötigt. Um neue *targets* zu identifizieren ist es notwendig, die zugrundeliegenden Mechanismen des Tumorwachstums und der Tumorprogression besser zu verstehen.

1.1.3 Pathophysiologie und Vorläuferläsionen

Zellen eines Pankreastumors können unterschiedlichen Ursprungs sein und daher duktaler, azinärer und endokriner Funktion entsprechen, die auch als diverse Mischformen auftreten können oder sogar als undifferenziertes Karzinom vorkommen (Wittekind 1997). Die primären, malignen und epithelialen Neoplasien des Pankreas können daher sowohl im exokrinen Parenchym, als auch in den endokrinen Zellen der Langerhans'schen Inseln entstehen, wobei jedoch das Gewebe des exokrinen Pankreas weitaus häufiger betroffen ist. Hier stellt das duktale Adenokarzinom mit über 80% den Großteil aller Pankreaskarzinome dar (Altekruse et al. 2010, Warshaw und Castillo 1992). Unter dem dukталen Adenokarzinom (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) werden hierbei viele Subformen, wie z.B. das adenosquamöse Karzinom oder das hepatoide Karzinom zusammengefasst (Wittekind 2013).

Das Progressionsmodell von Hruban und Kern geht von dem Entstehen eines Malignoms durch die Akkumulation genetischer Veränderungen aus (Hruban et al. 2000). Abb. 1 zeigt den möglichen Weg der Entstehung eines dukталen Adenokarzinoms über verschiedene Vorläuferläsionen und die entsprechenden genetischen Veränderungen.

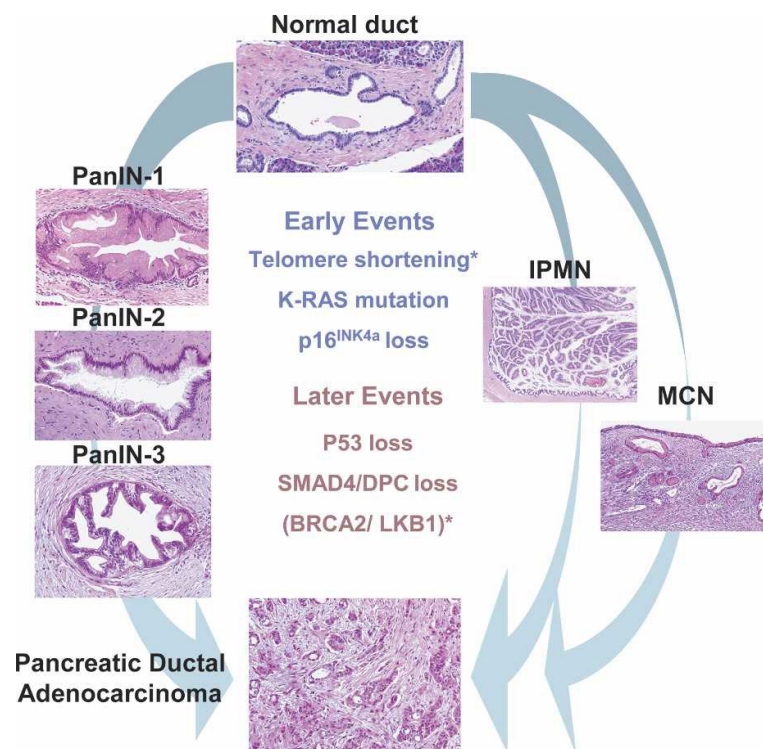


Abb. 1: Vorläuferläsionen und die möglichen genetischen Veränderungen, die zu einem *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC) führen können. Modifiziert nach Hezel et al. 2006.

Es gibt mehrere verschiedenartige Vorläuferläsionen, aus welchen ein duktales Adenokarzinom des Pankreas entstehen kann. Neben der muzinösen zystischen Neoplasie (MCN, *mucinous cystic neoplasm*) und der intraduktalen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN, *intraductal papillary mucinous neoplasm*) entsteht das PDAC meist auf Basis der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) (Maitra et al. 2005, Saiki und Horii 2014). Unterscheidungsmerkmale der drei Vorläuferläsionen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) wird abhängig vom Ausmaß ihrer epithelialen Atypie in drei Grade unterteilt (Abb. 1, Abb. 2). Läsionen mit nur geringen Atypien werden als PanIN-1 bezeichnet, wobei hier noch flache Läsionen als PanIN-1A von papillären Läsionen als PanIN-1B unterschieden werden. Läsionen mit mäßiger Atypie werden als PanIN-2 beschrieben und deutliche Atypien dann als PanIN-3 (Distler et al. 2014, Hruban et al. 2007, Maitra et al. 2005).

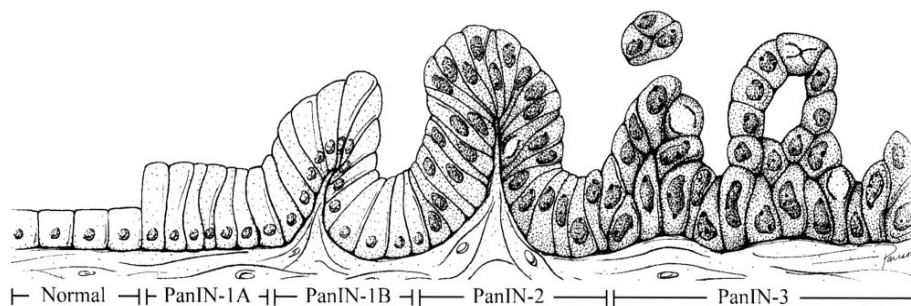


Abb. 2: Progressionsmodell der PanIN. Modifiziert nach Hruban et al. 2000.

Tabelle 1: Eigenschaften der Vorläuferläsionen. Modifiziert nach Hruban et al. 2007, Maitra et al. 2005

Eigenschaft	Mucinous Cystic Neoplasm (MCN)	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN)	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN)
Vorwiegendes Alter	40-50	60	Mit dem Alter zunehmend
Geschlecht	90% w	40% w	m=w
Lokalisation	Pankreaskopf und -schwanz	Pankreaskopf	Pankreaskopf > -körper/ -schwanz
Verbindung Zysten zu großen Pankreasgängen	Üblicherweise nicht verbunden	Immer verbunden	-
Zysteninhalte	Mukoid	Mukoid	-
Muzin sickert aus der Ampulle	Nein	Ja	Nein
Stroma	ovarähnlich	kollagenreich	kollagenreich

Durch die Akkumulation von Mutationen von Protoonkogenen und anderen krebsassoziierten Genen kann sich über die verschiedenen Stufen der Vorläuferläsionen ein duktales Adenokarzinom entwickeln (Hezel et al. 2006, Hruban et al. 2000, Lillemoe et al. 2000, Maitra et al. 2005, Saiki und Horii 2014, Vogelstein und Kinzler 2015). Das humane ausgebildete Pankreaskarzinom fällt durch aggressives Wachstum auf und weist Charakteristika von Pankreasgangzellen auf (Schmid 2006).

Neben dem aggressiven Wachstum ist dieses Adenokarzinom auch zur Metastasierung fähig. Für die Ausbildung einer Metastase müssen jedoch erst einige Schritte durchlaufen werden.

1.2 Metastasierung

Bei praktisch allen Tumorarten hängt die Prognose der betroffenen Patienten in erster Linie davon ab, ob der Tumor die Fähigkeit besitzt zu metastasieren. Das Pankreaskarzinom zeigt eine hohe Metastasierungstendenz. Daher ist es von äußerstem klinischem und wissenschaftlichem Interesse, die biologischen Grundlagen der Metastasierung besser zu verstehen, um daraus neue therapeutische Optionen abzuleiten. Bei der Metastasierung müssen Tumorzellen eine Reihe von Schritten erfolgreich absolvieren. Zunächst müssen sich einzelne Tumorzellen aus ihrem Primärtumorverband herauslösen und die sie begrenzende Basallamina überschreiten (Invasion). Nach Durchwanderung des angrenzenden Bindegewebes (Migration) müssen die Tumorzellen über Mikrogefäße des Primärtumors in den Blutkreislauf eintreten (Intravasation). Anschließend müssen diese zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blutkreislauf überleben können, bis sie am Ort der späteren Metastase die Gefäße wieder verlassen (Extravasation). In neuen Geweben müssen diese disseminierten Tumorzellen (DTC) wiederum anfangen zu proliferieren, um eine Mikrometastase zu bilden und später für die Ausbildung einer klinisch relevanten Metastase (Kolonisation) neue Blutgefäße ausbilden (Chambers et al. 2002, Fidler 1999, Valastyan und Weinberg 2011).

Unklar bleibt hierbei, warum nur einzelne Zellen es schaffen, eine Metastase zu bilden, obwohl häufig eine Vielzahl an CTC und DTC vorzufinden ist (Pantel und Alix-Panabieres 2007).

Für einige Schritte der Metastasierung, wie z.B. die Extravasation und die Etablierung im neuen Organ, sind die Zelladhäsionsmoleküle, die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden, von großer Bedeutung (Danen et al. 1995). Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Anhaftung von CTC an die luminale Endotheloberfläche der Blutgefäße des Zielorgans (Abb. 3). Vergleichbar mit der Adhäsion von Leukozyten an Gefäßendothel in entzündlich veränderten Bereichen zeigten mehrere Studien, dass die Adhäsion von Tumorzellen durch die Bindung von Selektinen, welche auf dem Endothel exprimiert werden, an Selektinliganden, die auf den Tumorzellen exprimiert werden, initiiert wird (Gout et al. 2008, Witz 2006). Die Selektine umfassen eine Familie von C-Typ-Lektinen. Zwei Lektine dieser Familie, E(ndothelial)-Selektin und P(latelet)-Selektin, wurden zuerst als Mediatoren beim initialen Schritt der Leukozytenadhäsion und Transmigration zum Ort einer Inflammation beschrieben. Daher ist E-Selektin auch als *endothelial-leukocyte adhesion molecule 1* (ELAM-1) bekannt (Groves et al. 1991). Im zweiten Schritt der Adhäsionskaskade, also im Anschluss an die Selektin-vermittelte Initiation, wird die Adhäsion von Leukozyten über Integrin/Rezeptor-Interaktionen gefestigt, so dass die Integrine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Extravasation von Tumorzellen spielen könnten.

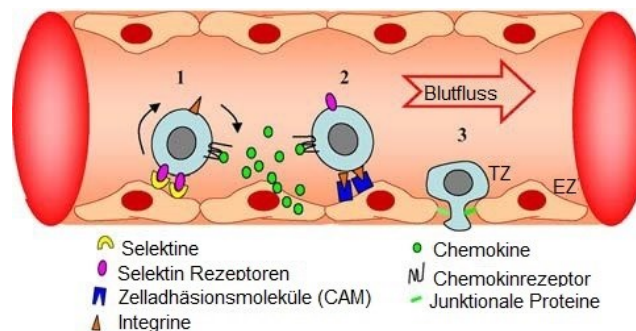


Abb. 3: Extravasation von Tumorzellen. Tumorzellen mimikrieren Mechanismen der Leukozytenadhäsionskaskade für ihre Anhaftung an das Gefäßendothel am Ort der späteren Metastase. TZ = Tumorzelle, EZ = Endothelzelle. Modifiziert nach Gout et al. 2008.

Hinsichtlich der Selektine konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass Tumorzellen unter dynamischen Flussbedingungen an immobilisiertem rekombinantem E- und P-Selektin entlangrollen und daran anhaften können, so wie es Leukozyten beim *homing* in entzündlichem Gewebe tun (Gout et al. 2008, Köhler et al. 2009, Laferrière et al. 2004, Richter et al. 2012).

1.3 Theorie der Xenograftmodelle und Vorarbeiten

Basierend auf der Beobachtung, dass humane Tumorzellen *in vitro* an rekombinanten E- und P-Selektin adhären können (Wicklein et al. 2013), wurden am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie E- und P-Selektin-defiziente Mäuse (mit einem Gen-*knockout* für E- und P-Selektin, kurz Selektin-KO) mit immundefizienten Mäusen gekreuzt, um die Bedeutung von E- und P-Selektin bei der Metastasierung humaner Tumorzellen in sog. Xenograftmodellen untersuchen zu können (Gebauer et al. 2013). In Xenograftmodellen werden humane Tumorzellen auf Mäuse transplantiert. Damit diese nicht vom murinen Immunsystem abgestoßen werden, ist es notwendig, immundefiziente Mäuse zu verwenden. Tatsächlich zeigte sich eine drastische Reduktion der pulmonalen Metastasierung bei Verwendung von Selektin-KO-Mäusen in einem Xenograftmodell des kolorektalen Karzinoms (Köhler et al. 2009). In Bezug auf das Pankreaskarzinom wurde zunächst ein intraperitoneales Modell gewählt, da die intraperitoneale Metastasierung die klinische Problematik beim Pankreaskarzinom besser widerspiegelt. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass die Auskleidung der Blutgefäße (Endothel) und der Bauchhöhle (Mesothel) sich aufgrund ihres gemeinsamen embryonalen Ursprungs aus dem Mesoderm funktionell ähneln. Tatsächlich haben diese Versuche gezeigt, dass bei Selektin-KO-Mäusen die intraperitoneale Metastasierung von humanen Pankreaskarzinomzellen drastisch reduziert war, während das lokale Wachstum der Tumore an der Einstichstelle in der Selektin-KO-Maus unverändert war (Gebauer et al. 2013). Zusätzlich kam es in den wenigen Metastasen der Selektin-KO-Mäuse zu einer Heraufregulierung des Zelladhäsionsmoleküls Integrin $\beta 4$ (ITGB4) im Vergleich zu den Metastasen der Wildtyp-Mäuse (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe).

Abgeleitet von der Grundhypothese, dass die (Leukozyten-) Adhäsionskaskade von großer Bedeutung für die Metastasierung ist und dass die Integrine den Selektinen in dieser Kaskade nachgeschaltet sind, erschien das ITGB4 somit besonders interessant. Da es zu einer Heraufregulierung des Integrins bei Selektindefizienz kam, wurden Xenograftmodelle erzeugt, bei denen Tumorzellen mit shRNA-vermitteltem, stabilen *knockdown* (KD) von ITGB4 (shITGB-KD), sowie entsprechende Kontrolltransfektanten mit normalem ITGB4-Status, subkutan (s.c.) in Wildtyp Mäuse (Mäuse ohne *knockout*, kurz WT) bzw. Selektin-KO Mäuse injiziert wurden. Überraschend stellte sich dabei heraus, dass der Selektin-KO der Mäuse in Kombination mit dem KD des ITGB4 auf den Tumorzellen synergistisch das Primärtumorwachstum dras-

tisch reduzierte. Dies war so ausgeprägt, dass keine Aussage zu einer möglicherweise reduzierten Metastasierung in dieser Kombinationsgruppe mehr getroffen werden konnte, da praktisch kaum noch Tumoren wuchsen (unpublizierte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu dieser Doktorarbeit). Gleichzeitig hatte der Selektin-KO allein keinen Effekt auf das s.c. Tumorwachstum (von Kontrollzellen mit normalem ITGB4-Status).

Ein Erklärungsmodell ist, dass die Selektine nicht nur für die Metastasierung, sondern auch für das Anwachsen von Tumorzellen (als Primärtumor oder metastatische Kolonie) von großer Bedeutung sind. Bei einer alleinigen Selektindefizienz (des Tumorstromas) schaffen es die Tumorzellen über einen „Umweg“ ihr Wachstum weiterhin aufrechtzuerhalten, so dass sowohl im s.c.- als auch im i.p.-Xenograftmodell (Gebauer *et al.* 2013) das Tumorwachstum an der Injektionsstelle vom Selektinstatus unbeeinflusst war. Möglicherweise regulieren die Tumorzellen im Selektin-defizienten Stroma die Expression von ITGB4 herauf, welches auf bisher unklarem Wege das Wachstum aufrechterhält oder fördert, so dass es bei zusätzlichem KD von ITGB4 zu der drastischen Reduktion des Tumorwachstums bei Selektindefizienz kommt. Folglich muss vermutet werden, dass beide Moleküle einen gemeinsamen Mechanismus benutzen, um das Tumorwachstum zu gewährleisten. Um dieser Frage nachzugehen, bedurfte es jedoch einer Reihe weiterer Experimente, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden.

1.4 Integrin β 4

Die Zelladhäsionsmoleküle sind ein wichtiger Faktor für das Wachstum von Tumorzellen. Sie ermöglichen dem Tumor, mit seiner extrazellulären Umgebung in Kontakt zu treten. Zu diesen Zelladhäsionsmolekülen gehört die Familie der Integrine.

Integrine sind transmembranöse Glykoproteine, welche als Adhäsionsmoleküle bzw. Rezeptoren fungieren. Sie vermitteln den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt und sind auch für die Signaltransduktion von Bedeutung. Es gibt 26 verschiedene Untereinheiten (18 α - und 8 β -Untereinheiten), welche sich zu 24 verschiedenen Heterodimeren zusammenfügen (Hynes 2002). Das Integrin β 4 (ITGB4), welches Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist, bildet ein Heterodimer zusammen mit der Untereinheit α 6, so dass sich das Integrin α 6 β 4 (ITGA6B4) ergibt. Das ITGA6B4, welches primär an der basolateralen Membran der meisten Epithelien und einigen weni-

gen anderen Zelltypen exprimiert wird, ist als Adhäsionsrezeptor für die meisten der bekannten Laminine definiert. Es bindet bevorzugt an Laminin-5 ($\alpha3\beta3\gamma2$ -Laminin). Außerdem zeigt es sowohl eine strukturelle, als auch eine funktionelle Besonderheit, welche sonst in der Integrin-Familie der Rezeptoren nicht zu finden ist, nämlich eine große zytoplasmatische Domäne, über die für Integrine untypische Signaltransduktionswege beeinflusst werden (Kikkawa et al. 2000, Lipscomb und Mercurio 2005).

Eine primäre Funktion ist die Aufrechterhaltung der Integrität von Epithelien, insbesondere der Epidermis, was in Studien mit *knockout*- und transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (van der Neut et al. 1996). Diese Aufgabe bewältigt ITGA6B4, indem es in sogenannten Hemidesmosomen den Kontakt der Zelle zur extrazellulären Matrix bildet. In invasiven Tumoren finden sowohl diese adhäsiven, als auch die oben erwähnten signaltransduktiven Funktionen der Integrine ihre Bedeutung. Insbesondere begünstigen diese Integrin-Funktionen den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition, bei der die zuvor noch sessilen Tumorzellen migratorische und invasive Kapazität erlangen und gleichzeitig vielfältig mit der Extrazellulärmatrix (ECM) interagieren (Li et al. 2017). Daher ist es nachvollziehbar, dass die Expression von ITGA6B4 in vielen invasiven Karzinomen erhalten bleibt oder sogar erhöht ist, selbst bei fehlender Formierung von Hemidesmosomen (Mercurio und Rabinovitz 2001). So wurde bei Zellen, welche von aggressiven *late-stage* Kolon-Adenokarzinomen abstammen, ITGA6B4 in migrationskompetenten Membranausläufern, wie z.B. Filopodien, Lamellipodien und Retraktionsfasern lokalisiert (Rabinovitz und Mercurio 1997).

Die adhäsiven Eigenschaften des ITGA6B4 können zur Migration von Karzinomzellen beitragen und es gibt Hinweise darauf, dass die Fähigkeit zur Signaltransduktion die Karzinommigration stimuliert und dass diese Fähigkeit, als funktionelle Besonderheit, unabhängig von der der Adhäsion ist (Mercurio et al. 2001).

Das charakteristische strukturelle Merkmal des ITGA6B4 ist die mit über 1000 Aminosäuren lange, für die Integrinfamilie atypisch ausgeprägte, zytoplasmatische Domäne der $\beta4$ Untereinheit, welche in besonderer Weise die Signaltransduktion der Zelle beeinflusst (Hogervorst et al. 1990). Diese Signaltransduktion geschieht über verschiedene Proteine wie beispielsweise PI3-K, Src, erbB2 (HER2), HGF oder VEGF-R (Chung et al. 2002, Dutta und Shaw 2008, Gambaletta et al. 2000).

Inwiefern diese besonderen Eigenschaften des ITGB4 mit dem oben beschriebenen synergistisch reduzierten Tumorwachstum von Pankreaskarzinom-Xenografts nach

KD von ITGB4 und vor allem bei gleichzeitig bestehender Selektindefizienz der Versuchstiere (also des Tumorstromas) im Zusammenhang stehen, soll mit Hilfe weiterer Experimente in dieser Arbeit analysiert werden.

1.5 Anoikis

Anoikis (griechisch: ἀνοικίς, „heimatlos“) bezeichnet eine spezielle Form des programmierten Zelltods (Apoptose), die durch den Verlust des Kontaktes der Zelle zur extrazellulären Matrix ausgelöst wird. *Anoikis* kann als physiologisch relevanter Vorgang beschrieben werden, welcher die Entwicklung und Gewebshomöostase sicherstellt. Er repräsentiert eine wichtige Abwehrfunktion indem er die erneute Adhäsion von abgelösten Zellen an eine Matrix eines anderen Gewebes und deren dysplastisches Wachstum verhindert. Fehler bei der Durchführung dieses programmierten Zelltodes könnten daher dazu führen, dass nicht-adhärente Zellen im Körper überleben oder in anderen Geweben mit veränderter extrazellulärer Matrix weiter proliferieren (Chiarugi und Giannoni 2008, Frisch und Ruoslahti 1997, Paoli et al. 2013), wie beispielsweise bei der Metastasierung.

Die Einleitung und Ausführung dieses Zelltodprogramms wird über verschiedene Signalwege vermittelt, welche alle in der Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen enden und so die DNA-Fragmentierung und den Zelltod herbeiführen (Grossmann 2002). Hierbei wird zwischen einem intrinsischen und extrinsischen Signalweg unterschieden (siehe Abb. 4).

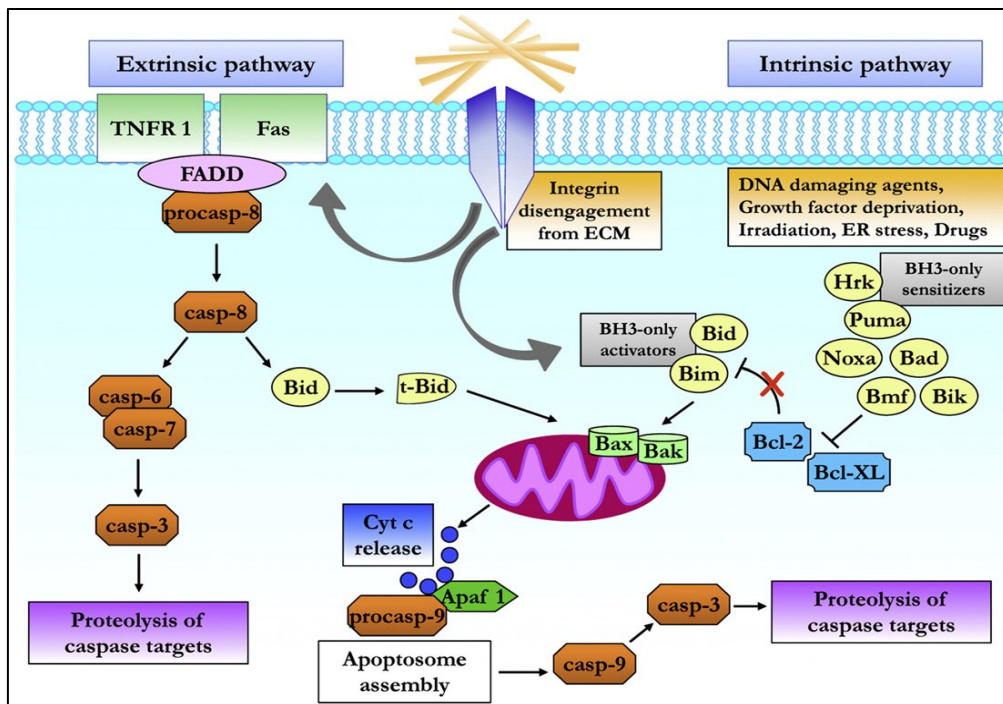


Abb. 4: Extrinsischer und intrinsischer apoptotischer Signalweg. Fehlender ECM Kontakt (*anoikis*, *Integrin disengagement from ECM*, Mitte oben) aktiviert den Apoptoseweg über beide Systeme (entsprechende Signalproteine hier nicht gezeigt). Modifiziert nach Paoli et al. 2013.

Aufgrund der oben beschriebenen Funktion schützen Integrine vor der Apoptose durch *anoikis* und das nicht nur aufgrund der Tatsache, dass sie für den Zell-Matrix-Kontakt von Bedeutung, sondern auch an diversen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Da Tumore bei „erfolgreicher“ Metastasierung der *anoikis* (insbesondere im Moment der Zirkulation durch die Blutbahn) entgehen können, kann angenommen werden, dass Tumore bestimmte Integrine aberrant exprimieren. So zeigen epitheliale Tumore eine mangelnde räumliche Organisation der Integrinexpression (Juliano und Varner 1993). Integrine, die in Interaktion mit Kollagenen, Lamininen oder anderen Komponenten der Basalmembran treten, sind in gesunden Epithelien vorzugsweise an der basolateralen Membran vorzufinden. Diese Art der Organisation findet sich daher z.B. auch bei den Integrinen $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$. Diese Ordnung ist jedoch in Karzinomen gestört und es zeigt sich eine diffuse und normalerweise weniger reichliche intrazelluläre Verteilung. Diese Veränderungen korrelieren mit der Zerstörung der Strukturen der Basalmembran. Hierbei wirkt sich die veränderte Integrinexpression negativ auf die Organisation der Basalmembran aus (O'Connor et al. 1998, Rabinovitz und Mercurio 1997, Tennenbaum et al. 1993).

1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung

In unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass ein KD von ITGB4 das Primärtumorwachstum von humanen Pankreaskarzinomzellen (PaCa5061) in immundefizienten Mäusen signifikant hemmt (Xenograftmodell). Zudem zeigte sich, dass dieser Effekt überadditiv gesteigert werden konnte, wenn gleichzeitig E- und P-Selektin in den Mäusen ausgeknockt war, während der Selektin-KO allein keinen Einfluss auf das lokale Tumorwachstum der Tumore hatte.

Mit dieser Arbeit sollte primär die Frage beantwortet werden, welche Mechanismen dieser Beobachtung zugrunde lagen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Hypothese aufgestellt, dass der ITGB4-KD aufgrund einer möglicherweise gestörten Verankerung der Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix zu einer Induktion der *anoikis* führt. Dieser Effekt könnte von verschiedenen Änderungen in intrazellulären Signalwegen begleitet werden, da ITGB4 besonders vielfältige Einflüsse auf das *signaling* hat. Bei gleichzeitiger Selektindefizienz des Tumorstromas sind die durch den ITGB4-KD erzielten Effekte auf das Tumorwachstum besonders relevant, so dass aus den Vorbefunden abgeleitet werden kann, dass sich die durch den ITGB4-KD ausgelöste(n) *anoikis* bzw. *Signalingveränderungen* bei gleichzeitigem Fehlen von E- und P-Selektin im Tumorstroma besonders negativ auf das Überleben der Tumorzellen bei der Bildung eines Xenograft-Primärtumors auswirken.

Beobachtungen, die die Funktionen des ITGB4 in diesem Zusammenhang erklären könnten, wurden bereits mit humanen Prostatakarzinomzellen in einer kürzlich am Institut für Anatomie durchgeführten Doktorarbeit (cand. med. Daniela Schetler) gemacht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ITGB4-KD-Zellen deutlich weniger SDF-1 (*stromal cell-derived factor*, auch CXCL12) sezernieren und dass dieses para- und autokrin wirkende Chemokin einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Zelle selbst hat (unveröffentlichte Daten).

Hieraus ergab sich die Hypothese, dass das ITGB4 auch im Pankreaskarzinom über Signaltransduktionswege die Expression von CXCL12 reguliert, welches wiederum über auto- bzw. parakrine Mechanismen das Tumorwachstum beeinflusst. Des Weiteren konnte für das Prostatakarzinom gezeigt werden, dass die intratumorale CXCL12-Konzentration bei alleiniger Selektindefizienz ebenfalls reduziert ist, was den synergistischen Effekt der kombinierten ITGB4-/Selektin-Depletion auf das Tumorwachstum erklären könnte (unveröffentlichte Daten).

Ziel dieser Versuche war es, diese Hypothesen an humanen Pankreaskarzinomzellen und -xenografts zu prüfen und, wenn nötig, weiterzuentwickeln. Daher war auch Gegenstand der Untersuchung, ob sich der wachstumseinschränkende Effekt eines ITGB4-KD mithilfe der Gabe von SDF-1 aufheben lässt und ob die Sekretion dieses Chemokins in den KD-Zellen verringert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Geräte und verwendete Materialien werden im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode aufgeführt.

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 PaCa5061

Das Primärtumorgewebe der Pankreasadenokarzinomzelllinie PaCa5061 wurde einem 63jährigen Patienten nach totaler Pankreatikoduodenektomie entnommen. Die histopathologische Untersuchung zeigte ein niedrig differenziertes Adenokarzinom des Pankreas, welches als pT3, pN1 (7/43), G3, M0, R1 eingestuft wurde. Zur Etablierung und Charakterisierung der PaCa5061-Zelllinie siehe Kalinina et al. 2010.

2.2.1.2 Zellkultivierung

Alle beschriebenen Arbeitsabläufe, mit Ausnahme der Lichtmikroskopie, wurden unter sterilen Bedingungen an einer HERA Safe Zellkulturbank (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die Zellkultivierung wurde mit TUM-Medium (siehe unten) unter Standardbedingungen (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) in einem HERA Cell Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

TUM-Medium:

- *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)- 1640 [+] L-Glutamine (Gibco®, Carlsbad, USA)
- hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) 10% (Gibco®)
- 1 U/ml Penicillin und 1 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) (Gibco®)
- Insulin 0,01 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *fibroblast growth factor* (FGF) 0,01 mg/ml (PeproTech, Rocky Hill, USA)
- *epidermal growth factor* (EGF) 0,01 mg/ml (PeproTech)
- Transferrin 0,05 µmol/ml (Sigma-Aldrich)
- (Puromycin 0,5 µg/ml)

Das beschriebene TUM-Medium wurde in einem Wasserbad bei 37°C (Inkubations-/Inaktivierungsbad Typ1003, GFL, Burgwedel, Deutschland) vorgewärmt. Die Kultivierung der PaCa5061 Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde das Wachstum der Zellen kontrolliert. Sobald die Zellen zu ca. 70% konfluent gewachsen waren, wurden sie mittels Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco®, Carlsbad, USA) abgelöst und passagiert.

Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und 5 ml DPBS [-/-] (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, [-]CaCl₂ [-]MgCl₂, Gibco®, Carlsbad, USA) zum Verdünnen der Serumreste hinzugegeben. Nach Absaugen des DPBS wurden 2 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Die Zellkulturflasche inkubierte unter Standardbedingungen für mindestens 5 min, so dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösen konnten. Mit dem Lichtmikroskop wurde dieser Vorgang kontrolliert. Dann wurde die Wirkung des Trypsin-EDTA durch TUM-Medium oder serum-haltiges Kulturmedium (RPMI 1640, FCS, Pen/Strep) gestoppt. Die so erstellte Zellsuspension wurde auf neue, mit frischem Kulturmedium befüllte Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Alternativ zum TUM-Medium wurde konditioniertes Medium (CM) der Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zelllinie (zur Etablierung dieser Derivate von PaCa5061 siehe 2.2.2.1) für die Kultivierung verwendet, um einen möglichen modulierenden Effekt der von den jeweiligen Zellen sezernierten Moleküle auf das Zellwachstum untersuchen zu können. Konditioniertes Medium wurde gewonnen, indem Zellen wie beschrieben kultiviert wurden, das Kulturmedium nach 48h entnommen und gefiltert (Nalgene™ Syringe Filter 0.2 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde, so dass sich keine Zellen darin befanden. Anschließend wurde es bei -80°C tiefgefroren und für weitere Versuche verwendet.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Eine Zellsuspension wurde wie in 2.2.1.2 beschrieben erstellt. Diese wurde für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert (Heraeus™ Labofuge™ A, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml DPBS resuspendiert und wiederholt bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml CryoSafe Medium (cryo-safe I KM-11-D, c.c.pro, Oberdorla, Deutschland) resuspendiert. Diese 5 ml Zellsuspension wurden auf 5 CryoTubes™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgeteilt und

in einem CoolCell® Container (Alcohol-Free Cell Freezing Containers, Biocision, San Rafael, USA) bei -80°C eingefroren. Bei längerer Lagerung der Zellen wurden die Zellen in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

2.2.1.4 Auftauen kryokonservierter Zellen

Das gefrorene CryoTube™ wurde im 37°C warmen Inkubationsbad 2-3 min erwärmt, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Die 1000 µl Zellsuspension wurden mit einer Pipette in eine mit 5 ml warmem TUM-Medium befüllte T25 Flasche überführt. Anschließend wurden die Zellen unter Standardbedingungen im Inkubator kultiviert. Das Medium wurde vor der ersten Passage der Zellen einmal gewechselt.

2.2.1.5 Zellzählung

Durch die Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) konnte die Zellkonzentration in einer Zellsuspension ermittelt werden. Hierbei wurden 10µl einer Zellsuspension mit 90 µl DPBS verdünnt (Verdünnungsfaktor 10). Von dieser verdünnten Zellsuspension wurden nun 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer zeigt ein Gitter mit 3 x 3 Großquadraten. Die 4 Eckquadrate werden ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor}(10) * 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Zellsuspension}$$

2.2.2 Erstellung und Nachweis des Knockdowns

2.2.2.1 Etablierung des ITGB4-knockdowns

Zur Etablierung des ITGB4-KD wurde in Vorarbeiten zu diesem Projekt (PD Dr. Wicklein, Dr. Gebauer, Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie) ein DNA Oligonukleotid, welches die Sequenz 5'–CGAGAAGCTTCACACCTAT–3' beinhaltet und für die shRNA codiert, in einen pLVX-shRNA1-Vektor kloniert.

Dieses Vektorkonstrukt (shITGB4) bzw. ein pLVX-Kontrollvektor (Luc), der die shRNA-Information gegen die in Säugerzellen nicht exprimierte *firefly* Luciferase (*Luc*) trägt, wurde lentiviral in die PaCa5061 Zellen transduziert (unter S2-Bedingungen, Kooperation mit der AG Fehse, Forschungslabor Zell- und Genthera-

pie, UKE). Nach einer einwöchigen Selektion mit Puromycin wurden die shITGB4-Zellen mit niedrigstem ITGB4-Gehalt mittels fluoreszenz-aktiviertem *cell sorting* (Kooperation mit der AG Hauber am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) in einer Anzahl von 1, 10, 30 bzw. 100 Zellen pro *well* auf ein 96 *well* verteilt (24 *wells* pro Anzahl) und die Formation von Kolonien unter fortgesetzter Selektion überwacht. Alle *wells*, die aus bis zu maximal drei Kolonien zugewachsen waren, wurden mittels Durchflusszytometrie auf die ITGB4 Expression hin untersucht (siehe unten). Diejenigen Kolonien mit der niedrigsten ITGB4-Expression wurden in T25-Flaschen weitergezogen und parallel kryokonserviert sowie anschließend die Zellen mehrerer Flaschen gepoolt (dies ergab die Zelllinie PaCa5061-shITGB4). Da der ITGB4-KD in dieser Linie später zwar stabil, aber nicht maximal war, wurde die Linie aus dem *well* IIE wieder aufgetaut und für weitere Analysen verwendet (dies ergab die Zelllinie PaCa5061-IIE). Hier zeigte sich ein stabiler, deutlicher KD von ITGB4 (siehe Ergebnisse). Bei dem initialen *sorting* nach Puromycin-Selektion wurden in das *well* IIE 30 Zellen abgelegt, so dass klonale Effekte in dieser Linie weitgehend ausgeschlossen sind.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung des KD wurden Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen ITGB4 inkubiert und anschließend mithilfe des CyFlow® Cube 6 (Sysmex Partec, Görlitz, Deutschland) analysiert. Aus der zu untersuchenden Zellkultur wurde hierfür eine Zellsuspension erstellt (siehe 2.2.1.2). Von dieser wurden je Zelllinie zwei 1,5 ml Eppendorf Tubes mit je 1 ml Zellsuspension befüllt (anti-ITGB4 bzw. Isotypenkontrolle). Die Zellen wurden bei 1500 U/min für 5 min in einer Kühlzentrifuge (Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 100 µl der mit FACS-Puffer (DPBS [-/-], 1% BSA, 0,05% NaN₃) verdünnten Antikörperlösungen (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgeschwemmt und für 15 min auf Eis inkubiert (Tabelle 2). Für jedes Eppendorf Tube wurde ein FACS-Tube (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 2 ml FACS-Puffer befüllt. Der Inhalt der Eppendorf Tubes wurde in das entsprechende FACS-Tube pipettiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Zur Lebend-

/Tot-Differenzierung wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung mit Propidiumiodid gefärbt.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

Antikörper	Konzentration	Hersteller, Produktnr.
Anti human CD104 (ITGB4) eFluor 660	0,2 mg/ml Verdünnung 1:200	affymetrix eBioscience, Santa Clara, USA, #50-1049-82
Rat IgG2b Isokontrolle eFluor 660	0,2 mg/ml Verdünnung 1:200	affymetrix eBioscience, Santa Clara, USA, #50-4031-82

2.2.3 Analyse des Zellwachstums

Der in den vorangegangenen Tierversuchen bereits *in vivo* nachgewiesene, wachstumsverzögernde Effekt des ITGB4-KD sollte *in vitro* näher analysiert werden. Dafür wurden jeweils Zellen mit KD von ITGB4 (PaCa5061-shITGB4) und Kontrollzellen (PaCa5061-Luc) ausgesät. Dazu wurden von jeder Zelllinie $5 \cdot 10^4$ Zellen in eine T75-Flasche ausgesät und für 6 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. In einem zweiten Versuchsdurchgang wurde die Zelllinie mit dem stärksten KD (PaCa5061-IIE) für einen Vergleich mit PaCa5061-Luc herangezogen. Von beiden Zelllinien wurden diesmal $1 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät und für 6 Tage unter Standardbedingungen kultiviert.

Nach Ablauf der angesetzten Kultivierungsdauer wurden die Zellen wie in 2.2.1.2 beschrieben trypsiniert und die Zellzahl anschließend mittels einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt.

Für die Analyse des Zellwachstums unter dem Einfluss von konditioniertem Medium (CM) wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen von PaCa5061-Luc und -IIE mit den verschiedenen Medien TUM, CM-IIE und CM-Luc für 5 Tage kultiviert, so dass sich 6 Zellkulturen ergaben. Die Zellzahlen wurden anschließend mit der Zählkammer ermittelt. Diese Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt.

2.2.3.1 XTT-Assay

Als weitere Methode, um die Proliferation der Zellen zu beurteilen, wurde ein Cell Proliferation Kit II „XTT-Assay“ (#11465015001, Roche, Basel, Schweiz) verwendet.

Hierbei erhält man über die Messung der metabolischen Aktivität der Zellen Hinweise auf die Proliferation. Die zu untersuchenden Zellen (PaCa5061-Luc und -shITGB4) wurden in einer Zellzahl von $3 \cdot 10^4$ Zellen auf einer 96-*well*-Platte für 3 Tage kultiviert und jedes *well* mit 100 μ l Kulturmedium befüllt. XTT *labeling reagent* und *electron-coupling reagent* wurden bei 37°C aufgetaut. Für eine 96-*well*-Platte wurden 5 ml XTT *labeling reagent* mit 0,1 ml *electron coupling reagent* gemischt („*labeling mixture*“). Anschließend wurden in jedes *well* 50 μ l der *labeling mixture* pipettiert. Die 96-*well*-Platte wurde für 5 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Extinktion konnte dann im *Microplate Reader* (DIAS Max002, Dynex Technologies, Chantilly, USA) bei 450-500 nm Wellenlänge bestimmt werden.

2.2.4 Kolonienformation unter 3D-Wachstumsbedingungen

Um einen möglichen Effekt des ITGB4-KD auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzellen unter 3D-Wachstumsbedingungen und den Einfluss von Basalmembranproteinen auf die Kolonienbildung zu untersuchen, wurden Kolonienformations-Assays in Soft-Agar (ohne Basalmembranproteine) bzw. Matrigel (mit Basalmembranproteinen) durchgeführt.

2.2.4.1 Kolonienformations-Assay mit Soft-Agar

Für die Kolonienbildung in Soft-Agar wurde zur Herstellung eines 2% Agars 2 g Soft-Agar (2-Hydroxyethylagarose, #A4018, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 100 ml DPBS gelöst, in der Mikrowelle erhitzt und anschließend im Tischautoklaven autoklaviert. Eine 24-*well*-Platte wurde für 1 h im Inkubator vorgewärmt und der Soft-Agar, sowie ein Röhrchen mit Kulturmedium, bei 42°C im Wasserbad erwärmt. In einem separaten Röhrchen wurde mit dem 2%igen Agar durch Mischung mit Kulturmedium ein 0,8%iger Agar erstellt. Von diesem wurden in jedes *well* 250 μ l pipettiert und die 24-*well*-Platte für 30 min auf 4°C gekühlt.

Anschließend wurde von den PaCa5061-Luc und PaCa5061-IIE Zellen eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1200 Zellen/ml hergestellt. Der 2%ige Agar wurde mit dieser Zellsuspension 1:6 verdünnt, so dass man eine 0,33%ige Agar-Zellsuspension-Mischung erhielt. Von dieser Mischung wurden 250 μ l in jedes *well* auf den nun erkalteten 0,8%igen Agar pipettiert. Die Platte wurde erneut für 20 min bei 4°C abgekühlt. Das Zellwachstum fand anschließend im Inkubator unter Stan-

dardbedingungen statt. Nach ca. 5 Tagen wurde 1 ml Kulturmedium auf jedes *well* gegeben und davon 500 µl alle 5-7 Tage durch frisches Medium ersetzt.

Für weitere Versuche wurde CM wie in 2.2.1.2 beschrieben hergestellt und für das Beschichten der Platte und den Wechsel des Mediums verwendet. Nach 10 Tagen wurden mikroskopisch alle Kolonien in jedem *well* gezählt und dabei morphologisch zwischen diskoiden und sphärischen Kolonien diskriminiert.

2.2.4.2 Kolonienformations-Assay mit Matrigel in 96-*well*-Platten

Zur Untersuchung der Kolonienbildung bei Anwesenheit von Basalmembranproteinen wurden PaCa5061-Luc und PaCa5061-IIE Zellen in 96-*well*-Platten (TC-Platte 96 *well*, Cell+, F, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in Matrigel (*growth factor-reduced*, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) kultiviert. Hierfür wurde zunächst die 96-*well*-Platte für 1 h im Inkubator vorgewärmt. Anschließend wurde von den PaCa5061-Luc und PaCa5061-IIE Zellen eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 200 Zellen/ml hergestellt. Dazu wurden 600 Zellen mit 1,5 ml kaltem Medium aufgeschwemmt und mit 1,5 ml kaltem Matrigel vermischt. Von dieser Suspension wurden 50 µl in jedes *well* pipettiert und die Platte für 30 min im Inkubator belassen. Anschließend wurde jedes *well* mit 200 µl puromycin-freiem Medium überschichtet. Das Zellwachstum fand im Inkubator unter Standardbedingungen statt. Der erste Wechsel des Kulturmediums wurde nach Sichtbarwerden der ersten Kolonien durchgeführt. Dann wurde das Medium zweimal pro Woche gewechselt.

Für diese Versuche wurde alternativ CM wie in 2.2.1.2 beschrieben hergestellt und für das Beschichten der Platte und den Wechsel des Mediums verwendet.

Nach 11 Tagen wurden mikroskopisch alle Kolonien in jedem *well* gezählt und dabei morphologisch zwischen diskoiden und sphärischen Kolonien diskriminiert.

2.3 Histologie und Immunhistochemie

2.3.1 Herstellen histologischer Schnitte

Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit haben gezeigt, dass ein ITGB4-KD zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung von PaCa5061-Zellen im subkutanen (s.c.) Xenograftmodell führt und dass diese besonders ausgeprägt ist, wenn die Versuchstiere zusätzlich E-/P-Selektin-defizient sind. Dahingegen hatte der Selektin-KO allein kei-

nen Einfluss auf das subkutane Tumorwachstum von PaCa5061-Zellen. Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene histologische und biochemische Analysen an den Xenografttumoren durchgeführt. Für die Herstellung der histologischen Schnitte aus den in Paraffin gegossenen Tumoren der Mäuse wurde ein Mikrotom (Microm HM400, Walldorf, Deutschland) verwendet.

Der Paraffinblock wurde am Mikrotom eingespannt und die zu schneidende Fläche mit Eis gekühlt. Der Paraffinblock wurde so justiert, dass die Oberfläche der späteren Schnittführung entspricht. Nun wurden pro Tumor 20 4 µm dünne Schnitte gefertigt, auf der Wasseroberfläche eines 37°C warmen Paraffinstreckbades (Medax Typ 24900, Neumünster, Deutschland) erwärmt, anschließend auf einen Histobond® Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) übertragen und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte (Medax, Neumünster, Deutschland) gelegt. Die Schnitte wurden über Nacht in einem 37°C warmen Heizschrank (MELAG, Berlin, Deutschland) aufbewahrt. Anschließend konnten die Schnitte gefärbt werden.

Vor der Färbung mittels Immunhistochemie müssen die Präparate entparaffiniert werden, um das Gewebe für die Antikörper freizulegen. Die Proben werden in einem Xylolbad für 10 min entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (8 min Ethanol 100%, 5 min 96%, 5 min 70%, 5 min 50%) rehydriert.

Abschließend werden die Präparate mit *Aqua dest.* für 2 min gespült. Für den gesamten Vorgang wurde ein Varistain V24-4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Vor dem Eindecken der Präparate (im Anschluss an die unten beschriebenen Färbungen) mit Eukitt (Deckgläser, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) müssen diese noch durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert werden (im Varistain: 15 s Ethanol 70%, 1 min 96%, 10 min 100%, 15 min Xylol-Ersatz).

2.3.2 Feulgen

Zum Studium der Kernmorphologie in den Xenografttumoren wurde das Feulgen-Verfahren zur Anfärbung von DNA durchgeführt. Nach dem Entparaffinieren der histologischen Schnitte wurden diese für 2-3 min mit *Aqua dest.* gespült und für 1 min in 1 M HCl bei Raumtemperatur getaucht. Anschließend wurden die Schnitte in 60°C warme HCl getaucht und anschließend erneut für 1 min in HCl bei Raumtemperatur.

Nach dem Spülen mit *Aqua dest.* wurde für 30 min das Schiff'sche Reagenz (fuchsin-schweflige Säure, 109033, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) auf die Schnitte gegeben und vor Licht geschützt. SO₂-Wasser (200 ml Leitungswasser, 10 ml 10%ige Kalium- oder Natriumbisulfit-Lösung, 10 ml 1N HCl) wurde in 3 Küvetten gefüllt und die Präparate für je 2 min in jede Küvette getaucht und für 5 min fließend unter Leitungswasser gespült. Nach Spülen mit *Aqua dest.* und der Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe konnten die Präparate mit Eukitt eingedeckt werden.

Die histologischen Schnitte wurden an einem Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Hierfür wurden verblindet für jedes Präparat (Luc/WT, Luc/Selektin-KO, shITGB4/WT n=5; shITGB4/Selektin-KO n=2) sechs Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung gewählt, welche den gesamten Tumor repräsentierten und gleiche Abstände zum Tumorrand hatten. Dafür wurde ein Gitterokular zur Hilfe genommen. In den Gesichtsfeldern wurde anschließend die Zahl der apoptotischen Zellen pro 100 Zellen bestimmt. Dabei wurde auf intensive Färbung kondensierter DNA-Fragmente (apoptotische Kernmorphologie) geachtet. In Abb. 11 in Kapitel 3.4.1 sind apoptotische Zellkerne exemplarisch dargestellt. In der Gruppe mit kombiniertem ITGB4-KD und Selektin-KO konnten deshalb nur 2 Tumore analysiert werden, weil nur noch 2 von 10 Mäusen in dieser Gruppe überhaupt Tumore entwickelten.

2.3.3 Ki-67

Zur Darstellung proliferierender Zellen wurde in den Xenograft-Tumorschnitten immunhistochemisch Ki-67 nachgewiesen. Hierfür wurden die Präparate entparaffiniert und über Nacht im Wasserbad bei 85°C mit *Antigen Retrieval Solution S1699* (Dako, Eching, Deutschland) in einer Küvette vorbehandelt (pH=6). Am nächsten Tag wurden die Präparate für 20 min abgekühlt und anschließend die Hälfte des Küvetteninhalts durch *Aqua dest.* ersetzt (10 min), bevor für weitere 5 min nur *Aqua dest.* verwendet wurde. Zur Herstellung von TBS (*tris-buffered saline*) wurden 6 g Trizma Base (T1503, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 8,7 g NaCl und 200 ml 2 N HCl vermischt. Die Schnitte wurden 2 x 5 min mit TBS-T (TBS mit 0,1% Tween20, Sigma-Aldrich) gespült und danach für 5 min mit TBS behandelt. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Waschzyklus bezeichnet. Dann wurden die Präparate mit Ziegense-

rum (X0907, Dako), 1:10 in TBS verdünnt, für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Das Serum wurde abgekippt, der Primärantikörper Ki-67 Mib1 (M7240, 41 mg/ml, Dako) 1:32 in Antikörper Diluent (S0809, Dako) verdünnt (1,28 mg/ml) und auf den Schnitt pipettiert. Für die Isotypen-Kontrolle wurde Mouse IgG1 (X0931, 100 mg/ml, Dako), 1:91 in AK Diluent verdünnt, verwendet. Nach 1h bei RT wurde erneut ein Waschzyklus durchgeführt. Dabei wurden die Isotypen-Kontrollen getrennt von den mit dem anti-Ki-67-Primärantikörper inkubierten Schnitten gewaschen. Ein polyklonaler, biotinylierter Sekundärantikörper gegen Maus-Immunglobulin aus der Ziege (E0433, 0,65 g/l, Dako), 1:200 in TBS verdünnt (3,25 mg/l), wurde für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde ABC-AP (2,5 ml TBS + 1 Tropfen Reagenz A + 1 Tropfen Reagenz B, Vectastain ABC-AP Kit, AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 min auf die Präparate gegeben um eine Bindung mit dem biotinylierten Teil des Sekundärantikörpers einzugehen. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde Permanent Red für 12 min bei RT auf die Präparate gegeben um einer Farbreaktion zu erzeugen. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min unter laufendem Leitungswasser und anschließend für 2 min mit *Aqua dest.* gespült. Dann wurden die Präparate für wenige Sekunden in Hämalaun getaucht, um die Zellkerne schwach gegenzufärben, so dass auch Zellen, die nicht durch die Ki-67-Färbung gefärbt wurden, sichtbar wurden. Anschließend wurde erneut für 5 min unter laufendem Leitungswasser und für 2 min mit *Aqua dest.* gespült. Zur Fertigstellung der Präparate wurden sie entwässert und mit Eukitt eingedeckelt. Die Quantifizierung der durch anti-Ki-67 gefärbten Schnitte wurde durch verblindete Auszählung der Ki-67-positiven Zellen pro 100 Zellen im Gesichtsfeld durchgeführt. Für jedes Präparat (Luc/WT, Luc/Selektin-KO, shITGB4/WT n=5; shITGB4/Selektin-KO n=2) wurden sechs Gesichtsfelder untersucht, welche jeweils im gleichen Abstand zum Tumorrand lagen und über den gesamten Tumor verteilt waren. Als Ki-67-positiv wurden jene Zellen betrachtet, deren Kerne sich durch eine rote Farbe von den restlichen, nur schwach durch Hämalaun gegengefärbten Zellkernen abgrenzten.

2.3.4 pH2AX

Die Präparate wurden entparaffiniert und für 10 min in *Antigen Retrieval Solution* S1699 (pH 6, Dako) im *steamer* bei 121°C vorbehandelt. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben gewaschen („Waschzyklus“).

Der polyklonale Kaninchenantikörper gegen phosphoryliertes Histon H2AX (ab81299, 48 µg/ml, Abcam) wurde 1:672 in Antikörper Diluent (S0809, Dako) verdünnt (71 ng/ml) und auf die Schnitte pipettiert. Für die Isotypen-Kontrolle wurde *rabbit negative control* (X0903, 19 g/l, Dako) 1:266.000 in AK Diluent verdünnt verwendet. Nach 1 h bei RT wurde erneut ein Waschzyklus durchgeführt.

Der Sekundärantikörper *swine-anti-rabbit* Ig (E0353, 0,92 g/l, Dako), 1:200 in TBS verdünnt (4,6 mg/l), wurde für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde ABC-AP für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde *permanent red* für 20 min bei RT auf die Präparate gegeben. Nun wurde für 3 min unter laufendem Leitungswasser und anschließend für 2 min mit *Aqua dest.* gespült. Die Präparate wurden für wenige Sekunden in Hämalaun getaucht. Anschließend wurde erneut für 5 min unter laufendem Leitungswasser und für 2 min mit *Aqua dest.* gespült. Zur Fertigstellung der Präparate wurden sie entwässert und mit Eukitt eingedeckt.

Für jedes Präparat (Luc/WT, Luc/Selektin-KO, shITGB4/WT n=5; shITGB4/Selektin-KO n=2) wurde in 6 Gesichtsfeldern pro Tumor die Anzahl an pH2AX-positiven Zellen pro 100 Zellen im Gesichtsfeld gezählt.

2.3.5 SDF-1

Die Präparate wurden entparaffiniert und für 8 min in *Antigen Retrieval Solution* S1699 (pH 6, Dako) in der Mikrowelle bei ca. 600 Watt vorbehandelt. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben gewaschen („Waschzyklus“). Ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen *SDF-1* (ab9797, 0,5 µg/ml, Abcam, Cambridge, England) wurde 1:250 in Antikörper Diluent (S0809, Dako) verdünnt (2 ng/ml) und auf die Schnitte pipettiert. Für die Isotypen-Kontrolle wurde *rabbit negative control* (X0903, 19 g/l, Dako) 1:9500 in AK Diluent verdünnt verwendet.

Nach 1 h bei RT wurde erneut ein Waschzyklus durchgeführt.

Der Sekundärantikörper *swine-anti-rabbit* Ig (E0353, 0,92 g/l, Dako), 1:200 in TBS verdünnt (4,6 mg/l), wurde für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weite-

ren Waschzyklus wurde ABC-AP für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde *permanent red* für 12 min bei RT auf die Präparate gegeben. Nun wurde wie bereits beschrieben gespült, mit Hämalaun gegengefärbt, entwässert und mit Eukitt eingedeckelt. Anschließend wurden die Schnitte mikroskopiert.

2.3.6 pFAK

Die Präparate wurden entparaffiniert und für 20 min im Wasserbad bei 60°C in *Antigen Retrieval Solution S1699* (pH 6, Dako) vorbehandelt. Nach dem Abkühlen der Schnitte wurden sie 5 min mit *Aqua dest.* gespült und anschließend wie oben beschrieben gewaschen („Waschzyklus“). Der polyklonale Kaninchenantikörper gegen phosphorylierte *focal adhesion kinase* FAK (phospho Y397) (ab4803, Abcam) wurde 1:100 in Antikörper Diluent (S0809, Dako) verdünnt (ca. 7,45 µg/ml) und auf die Schnitte pipettiert. Für die Isotypen-Kontrolle wurde *rabbit negative control* (X0903, 19 g/l, Dako) 1:2.550 in AK Diluent verdünnt verwendet. Nach 1 h bei RT wurde erneut ein Waschzyklus durchgeführt. Der Sekundärantikörper *swine-anti-rabbit* Ig (E0353, 0,92 g/l, Dako), 1:200 in TBS verdünnt (4,6 mg/l), wurde für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde ABC-AP für 30 min auf die Präparate gegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit einer Farbentwicklungslösung (Natrium-Nitrit 200 mg, *Aqua dest.* 5 ml, Neufeuchsin 200 µl, Trispuffer pH 8,24 100 ml, Naphtol AS 13 - 20 mg, Dimethylformamid 500 µl, Tween 20 130 µl, Levamisol 40 mg) inkubiert. Nun wurde wie bereits beschrieben gespült, mit Hämalaun gegengefärbt, entwässert und mit Eukitt eingedeckelt.

Es wurde für jedes Präparat (Luc/WT, Luc/Selektin-KO, shITGB4/WT n=5; shITGB4/Selektin-KO n=2) für sechs Gesichtsfelder die Anzahl an pFAK-positiven Zellen pro 200 Zellen gezählt. Dabei wurden stark- und schwach positive Zellen voneinander durch ihre Farbintensität unterschieden.

2.4 ELISA

2.4.1 Proteinextraktion aus Zellen und Geweben

Nachdem die Zellkonzentration einer Zellsuspension mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt wurde, wurden die Proteine aus $5 \cdot 10^6$ bzw. $1,3 \cdot 10^6$ Zellen für die Analyse im ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) extrahiert. Die benötigte Menge an Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Zellpellet mit 500 μ l DPBS+Protease-Inhibitor Cocktail (PIC: 1 ml DPBS[+/+] + 10 μ l PIC I, Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) resuspendiert. Diese Suspension wurde zusammen mit einer Stahlkugel in ein 2 ml Eppendorf Tube gegeben und in einem Tissuelyser II (Qiagen, Venlo, Niederlande) mechanisch bei 200 Schwingungen/min für 5 min lysiert. Der Inhalt wurde in einem neuen Eppendorf Tube zentrifugiert (3,5 min, 14000 rpm) und der Überstand für den ELISA verwendet.

Für die mechanische Zerkleinerung der soliden Tumoren wurde ein Stahlhohlzylinder mit entsprechendem Stößel verwendet. Diese wurden durch flüssigen Stickstoff gekühlt, so dass sich die Tumore während dieser Prozedur nicht erwärmen konnten. Die zerkleinerten Proben wurden mit Lysepuffer NP-40 aufgeschwemmt. Anschließend wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

Für 10 ml NP-40 Lysepuffer:

- 0,82 ml ddH₂O (demineralisiertes Wasser)
- 2,5 ml 0,2 M Hepes 7,5
- 0,3 ml 5 M NaCl
- 0,2 ml 100% Aprotinin
- 80 μ l 250 mM EDTA
- 1,0 ml 500 mM NaF
- 1,0 ml 100 mM NaPP_i
- 2,5 ml 40% Glycin
- 1,0 ml 10 mM Vanadat
- 0,1 ml 100 mM Pefablac

2.4.2 Vorbereitung - Zellysate

Die Tabelle 3 zeigt die Vorbereitung und Erstellung der Proben für die Messung des SDF-1 Gehaltes in den lysierten Zellen und den gewonnenen konditionierten Medien dieser Zellen. Die Spalte „Aussaat“ zeigt die Anzahl der Zellen, die für die Versuche ausgesät wurden. Es wurden zu Beginn gleiche Zahlen gewählt, damit etwaige Schwankungen im SDF-1 Gehalt der Überstände nicht durch unterschiedliche Zellmengen bedingt waren. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h wurde das Medium komplett durch 4 ml serumfreies Medium ersetzt. Dieses Medium wurde nach weiteren 48 h gewonnen und in diesem der SDF-1 Gehalt bestimmt. Am Ende der Inkubationszeit wurde erneut die Zellzahl bestimmt und gleiche Zellzahlen für die Proteinextraktion lysiert.

Der Ablauf bei der Linie PaCa5061-IIE unterschied sich dahingehend, dass hier kein serumfreies Medium für die Inkubation benutzt werden konnte, da die Zellen sich unter serum-freien Bedingungen ablösten. Zum Vergleich wurde hier eine Kontrolle mit PaCa5061-Luc Zellen mit gleicher Behandlung erstellt.

Tabelle 3: Schema der Probenvorbereitung für die SDF-1 Bestimmung im ELISA. Für die Zellkultivierung des Klons IIE musste das Medium FCS enthalten, da die Zellen dies sonst nicht überlebten.

Zelllinie	Sublinie	Zellzahl Aussaat	Kultivierung		Zellzahl Ernte	Lysierte Zellen
PaCa5061	Luc	$2 \cdot 10^6$	48 h	4 ml serum-freies Medium, Ernte nach 48 h	$6 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
	shITGB4	$2 \cdot 10^6$	48 h	4 ml serum-freies Medium, Ernte nach 48 h	$5,25 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$

PaCa5061	Luc	$2 \cdot 10^6$	48 h	4 ml serum-haltiges Medium, Ernte nach 48 h	$5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$
	IIE	$2 \cdot 10^6$	48 h	4 ml serum-haltiges Medium, Ernte nach 48 h	$1,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$

2.4.3 Durchführung des ELISA

Der ELISA zum Nachweis der SDF-1 Proteinlevel wurde mit dem Human CXCL12/SDF-1 DuoSet ELISA Development System (DY350, R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Eine 96-well-Platte wurde mit dem Human CXCL12/SDF-1 *capture antibody* beschichtet. Dafür wurde der Antikörper mit DPBS rekonstituiert und mit DPBS[+/+] ([+]CaCl₂ [+]MgCl₂, Gibco®, Carlsbad, USA) auf die vorgegebene Konzentration von 1,0 µg/ml verdünnt. 100 µl wurden auf jedes well gegeben, die Platte verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die wells wurden dreimal mit 300 µl pro well Waschpuffer (500 ml DPBS[+/+], 250 µl Tween®20) gewaschen und anschließend auf Papiertücher gedrückt, um Restmengen zu entfernen. Im Folgenden wird dieser Vorgang als Waschen bezeichnet.

Die Platte wurde mit 300 µl *Reagent Diluent* (0,5 g bovines Serumalbumin, 500 ml DPBS[+/+], gefiltert) pro well für mindestens 1 h bei RT geblockt. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen.

Die Standardreihe wurde mit dem Human CXCL12/SDF-1 Standard erstellt. Nachdem das rekombinante SDF-1 mit destilliertem Wasser rekonstituiert worden war, wurde eine Verdünnungsreihe von 2000 pg/ml bis 31,3 pg/ml mit *Reagent Diluent* erstellt. Die wells wurden nun mit jeweils 100 µl Probe oder Standard befüllt und die Platte für 2 h bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Im nächsten Schritt wurden pro well 100 µl vom biotinylierten anti-human-CXCL12/SDF-1 *detection antibody* (mit *Reagent Diluent* auf die vorgegebene Konzentration von 50 ng/ml verdünnt) gegeben und für 2 h bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurde die Platte mit 100 µl pro well Streptavidin-HRP, 1:40 mit *Reagent Diluent* verdünnt, befüllt, für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend gewaschen. Nun wurden pro well 100 µl der *Substrate Solution* (*BM Blue POD Substrate, soluble*, Roche) hinzugegeben und erneut für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde regelmäßig die blaue Farbreaktion überwacht und bei deutlicher Abgrenzung der einzelnen Standardproben mit 50 µl der *stop solution* (2 N H₂SO₄) die Reaktion gestoppt. Die optische Dichte wurde dann im *Microplate Reader* (DIAS Max002, Dynex Technologies, Chantilly, USA) bei 450 nm bestimmt.

2.5 Western Blot (WB)

2.5.1 Proteinextraktion aus Geweben

Die Lyse der Tumoren wurde wie für den ELISA in 2.4.1 durchgeführt. Die erstellte Lösung konnte einer Proteinbestimmung zugeführt werden. Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

2.5.2 Durchführung des Western Blot

2.5.2.1 Proteinbestimmung

Vor dem WB wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um von den jeweiligen Proben identische Mengen für die weitere Untersuchung einsetzen zu können. Die Bestimmung wurde mit dem DC™ Protein Assay (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Reaktionen laufen hierbei ähnlich zur Proteinbestimmung nach Lowry ab (Lowry et al. 1951). Die Vorbereitung wurde wie folgt nach Herstellerangaben durchgeführt: auf 1 ml *Reagent A* wurden 20 µl *Reagent S* gegeben. Dann wurde eine Standardreihe aus 3-5 Proben erstellt, welche die Konzentrationen von 0,2 mg/ml bis 1,5 mg/ml Protein enthalten. Von den Standards und den Proben wurden 5 µl in die *wells* einer 96-*well*-Platte pipettiert, 25 µl vom Gemisch (*Reagent A* + *Reagent S*) und 200 µl von *Reagent B* hinzugegeben und durch leichtes Schwenken der Platte vermischt. Nach 15 min konnte die Extinktion bei 595 nm im *microplate reader* Infinite® M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen werden.

Aus den Ergebnissen konnten dann die benötigten Mischverhältnisse von Tumorlysat und Lysepuffer (NP-40) berechnet werden.

Die Kammern zum Gießen der Gele wurden mit Hilfe von ddH₂O auf Dichtigkeit überprüft. Für jede Kammer wurden 13 ml noch flüssiges Trenngel verwendet, welches zwischen die Glasscheiben gegossen wurde.

Für 2 Trenngele (10%ig) wurden folgende Stoffe gemischt:

- 8,45 ml ddH₂O
- 11,25 ml 1 M Tris pH 8,8
- 10 ml 30% Acrylamid
- 0,3 ml 10% SDS
- 0,02 ml TEMED
- 0,2 ml 10% APS

Um eine ebene Oberkante des Gels zu erzielen, wurden 600 µl Isopropanol aufpipetiert und das Gel anschließend für 1 h auspolymerisiert. Das Isopropanol konnte durch Zugabe von ddH₂O verdrängt werden, um es anschließend abzugießen. Nun konnten die Kammern bis zum oberen Rand mit Sammelgel befüllt und ein Kamm zur Bildung von Taschen eingesteckt werden.

Für 2 Sammelgele:

- 6,9 ml ddH₂O,
- 1,9 ml 2 M Tris pH 6,7
- 1,34 ml 30% Acrylamid
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,0076 ml TEMED
- 0,15 ml 10% APS

Das Auspolymerisieren des Sammelgels benötigte mind. 30 min.

Vorbereitung der Proben:

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit Lysepuffer und 3x Ladepuffer vermischt und für 5 min bei 100°C aufgeköcht. Dabei war die Menge an Lysepuffer abhängig von der Proteinbestimmung der einzelnen Proben, so dass vor dem WB in allen Proben die gleiche Proteinmenge von 80 µg eingestellt wurde.

3x Ladepuffer:

- 180 mM 1M Tris-HCl pH 6,8
- 6% SDS
- 30% Glycerol
- 0,03% Bromphenolblau
- 0,3 M DTT (direkt vor Gebrauch zugeben)

Es wurden folgende Puffer vorbereitet:

- 10x Running Buffer (10 x RB): 144 g Glycin, 30 g Tris-Base, auf 1 l aufgefüllt mit ddH₂O
- 1x Running Buffer (1x RB): 350 ml 10x RB, 35 ml 10% SDS, 3115 ml ddH₂O

Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt, die Taschen mit Kathodenpuffer (500 ml 1xRB, 625 ml DTT) befüllt und die Proben aufgetragen (25 µl/Tasche). Die Elektro-

phoresevorrichtung wurde mit 10x Running Buffer als Elektrophoresepuffer und der Kathodenraum mit Kathodenpuffer befüllt. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V eingestellt, so dass die Proben in das Sammelgel einwandern konnten. Anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Die gesamte Laufzeit der Elektrophorese betrug ca. 2 h.

Der Transferpuffer (TB) wurde vorbereitet und bis zur Verwendung gekühlt:

- 100 ml 10x RB
- 200 ml MeOH
- 10 ml 10% SDS
- 690 ml ddH₂O

Die Blotschwämme wurden in Transferpuffer getränkt und die Nitrocellulosemembranen in ddH₂O angefeuchtet. In der Transfervorrichtung wurde auf den Blotschwamm ein Stück Whatmanpapier gelegt und darauf das Gel überführt. Auf das Gel wurde die vorbereitete Nitrocellulose gelegt und darauf wiederum eine weitere Lage Whatmanpapier. Ein zweiter Blotschwamm wurde aufgelegt und alles wurde in einer Klammervorrichtung („tray“) zusammengeklemmt. Der Tank für den Transfer der Proteine wurde mit Transferpuffer gefüllt und das tray im Tank befestigt. Mit einem Magnetrührer und bei 70 V Spannung wurde über 2 h im Kühlraum der Transfer durchgeführt.

Die Membran wurde vorsichtig mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 1 h in Blocklösung (5%ig, z.B. 50 g Milchpulver, 1 l TBS-T) gelegt. Die Membranen wurden über Nacht mit den Primärantikörperlösungen (Tabelle 4) im Kühlraum auf einem Schwenktisch inkubiert.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper im WB

Antikörper	Klon/Produktnr.	Verdünnung	Hersteller
CyclinD3	DCS22, sc-56307	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
HER2 Neu	E23, sc-74241	1:500	Santa Cruz Biotechnology
HSC70	B-6, sc-7298	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
MAPK p42/44 MAPK	137F5, #4695	1:1000	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA

p27	F-8 , sc-1641	1:500	Santa Cruz Biotechnology
p38MAPK	D13E1, #8690	1:1000	Cell Signaling Technology
p-Akt (Ser473)	D9E, #4060	1:1000	Cell Signaling Technology
pAkt (Thr308)	D25E6, #13038	1:1000	Cell Signaling Technology
p-FAK (Tyr925)	#3284	1:1000	Cell Signaling Technology
pGSK-3 β (Ser9)	D85E12, #5558	1:1000	Cell Signaling Technology
pHER2/ErbB2 (Tyr877)	#2241	1:1000	Cell Signaling Technology
p-JNK (Thr183/Tyr185)	81E11 #4668	1:1000	Cell Signaling Technology
pMAPK, p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E, #4370	1:1000	Cell Signaling Technology
pmTOR (Ser2448)	D9C2, #5536	1:1000	Cell Signaling Technology
pS6 (Ser235/236)	D57.2.2E, #4858	1:1000	Cell Signaling Technology
p-Src Family (Tyr416)	D49G4, #6943	1:1000	Cell Signaling Technology

Die Membranen wurden anschließend dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und der Sekundärantikörper 1:5000 in Waschlösung (500 ml Blocklösung, 500 ml TBS-T) verdünnt in die Schalen gegeben. Nach 1 h Inkubation auf einem Tischschüttler wurde 6 x für 15 min mit TBS-T gewaschen.

Zur Darstellung der Banden wurden die Membranen für 5 min mit Chemilumineszenz-Lösung inkubiert (SuperSignal® West Dura Chemiluminescent Substrate und/oder SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate nach Herstellerangaben). Die Visualisierung erfolgte am LAS-3000 Imager.

Mit dem Programm AIDA Image Analyzer wurde die optische Dichte der Banden bestimmt, um so den WB quantifizieren zu können. Dazu wurde ein identischer Bereich für jede Tumorprobe gesetzt, die optische Dichte bestimmt und anschließend der *background* subtrahiert. Danach wurde die Ratio aus der optischen Dichte des analysierten Proteins und der optischen Dichte der Ladekontrolle (HSC70), jeweils abzüglich des *backgrounds*, errechnet und für die statistische Auswertung verwendet.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde Microsoft Excel verwendet. Die Darstellungen der Ergebnisse wurden ebenfalls mit Microsoft Excel oder mit Microsoft PowerPoint erstellt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ festgelegt. Zur Berechnung des p -Werts wurde ein ungepaarter zweiseitiger t-Test für die Vergleiche benutzt.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen erfolgte mit FCS Express 4 (DeNovo)

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung des ITGB4-KD-Status und Analyse des Zellwachstums *in vitro*

Das Zelladhäsionsmolekül ITGB4 spielt eine zentrale Rolle für das Wachstum von humanen Pankreaskarzinomzellen in immundefizienten Mäusen. Um diesen Effekt auch *in vitro* analysieren zu können, musste zunächst das Ausmaß des ITGB4-KD in PaCa5061-Zellen mittels Durchflusszytometrie kontrolliert werden. Zusätzlich konnte hierdurch die Stabilität des KD über die Zeit geprüft werden, insbesondere da verschiedenste Analysen mit den Zellen über einen Zeitraum von mehreren Monaten gemacht wurden. Daher war es auch notwendig, zwischendurch Zellen aufzutauen, die bei niedriger Passage nach Etablierung des KD kryokonserviert worden waren. Auch von diesen Zellen musste der ITGB4-Status überprüft werden. Wie in Abb. 5A gezeigt, lag der KD der Zelllinie PaCa5061-IIE im Mittel bei etwa 93%. Der KD der aus mehreren Kolonien gepoolten Zelllinie PaCa5061-shITGB4 lag bei nur 72%. Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde zunächst ein XTT-Assay durchgeführt. Dieser zeigte, dass sich die Proliferation von PaCa5061-Luc und -shITGB4-Zellen nicht unterschied, wenn die Zellen bei hoher Konfluenz (ca. 80%) verglichen wurden (Abb. 5B).

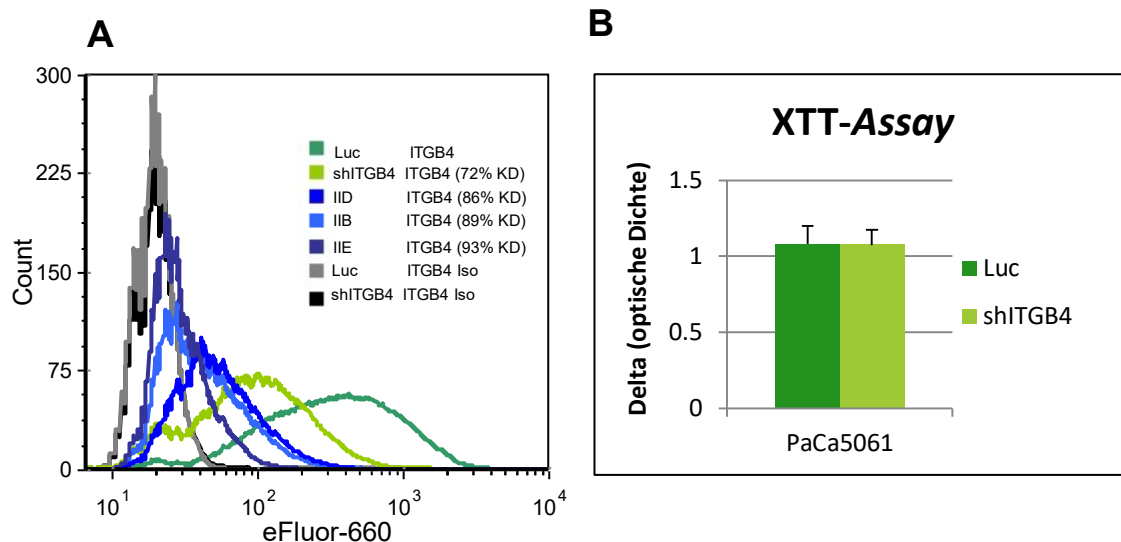


Abb. 5: (A) Durchflusszytometrische Messung der ITGB4-Expression auf PaCa5061-Zellen mit normalem ITGB4-Status (Luc) bzw. shRNA-vermitteltem ITGB4-knockdown (shITGB4, IID, IIB, IIE). Die Prozentangaben beschreiben den *knockdown* (KD) im Vergleich zur Luc-Kontrolle. Die graue bzw. schwarze Linie im Histogramm zeigt die Fluoreszenzintensität der Isotypenkontrollen **(B) XTT-Assay.** Bei Subkonfluenz (ca. 80%) in beiden Linien zeigen PaCa5061-Luc- und -shITGB4-Zellen keinen Unterschied in der Proliferation.

In einem weiteren Proliferationsversuch wurde nach dünner Aussaat der Zellen (5×10^4 bzw. 1×10^4 Zellen pro T75-Zellkulturflasche) die Zellzahl nach 6 Tagen bestimmt (Abb. 6). Hierbei zeigte sich für PaCa5061-shITGB4 eine um **27%** verringerte Zellzahl im Vergleich mit PaCa5061-Luc.

Für PaCa5061-IIE konnte eine um **85%** verringerte Zellzahl im Vergleich mit PaCa5061-Luc nachgewiesen werden. Somit zeigte sich für die Zelllinie mit dem stärkeren KD eine stärkere Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle.

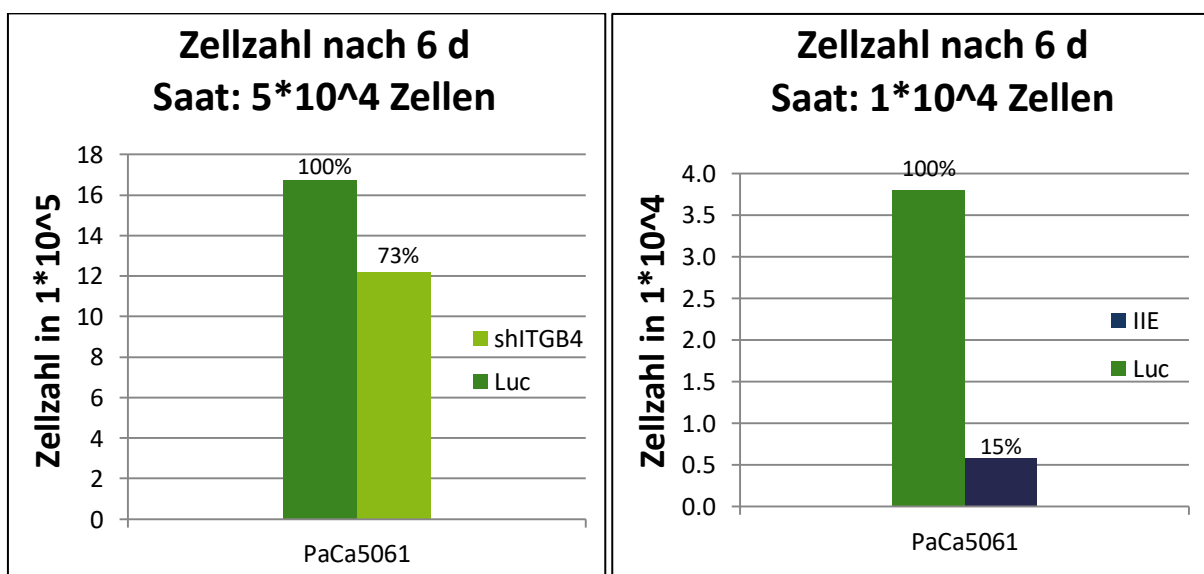


Abb. 6: Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation unter Standardbedingungen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrolle (100%). Bei der Zelllinie „IIE“ zeigt sich eine stark verringerte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Farbgebung entsprechend Abb. 5.

3.2 Zellkultur mit konditioniertem Medium

Aufgrund der Ergebnisse aus den Proliferationsversuchen nach initial dünner Aussaat erfolgten weitere Versuche zum Einfluss konditionierter Medien der Kontroll-Zelllinie bzw. der ITGB4-KD-Zelllinie auf die Proliferation. Aufgrund des stärkeren KD von ITGB4 und der damit verbundenen stärkeren Einschränkung der Proliferation wurden diese Versuche nur mit der Linie PaCa5061-IIE durchgeführt (im Vergleich zu PaCa5061-Luc).

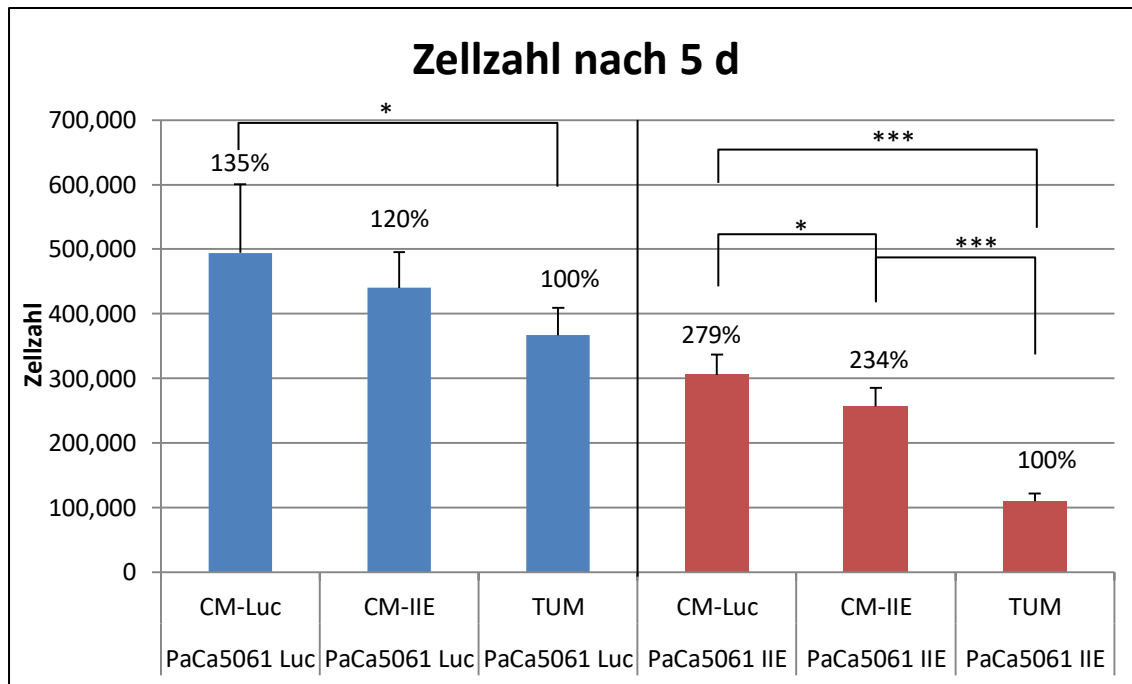


Abb. 7: Zellzahlen nach Wachstum in konditioniertem Medium der Kontrolltransfektante (CM-Luc), der ITGB4-KD-Linie (CM-IIE) oder Standard-Kulturmedium (TUM) für 5 Tage unter Standardbedingungen (2D in T75 Flaschen); initiale Aussaat: 50.000 Zellen; Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n=3$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Hierbei zeigte sich, dass 5 Tage nach Aussaat von $5 \cdot 10^4$ Zellen die Zellzahl in beiden Gruppen unter dem Wachstum im üblichen Zellkulturmedium dieser Zellen (TUM-Medium) am wenigsten angestiegen war (100%) (Abb. 7). Es zeigte sich zudem erneut die deutlich reduzierte Proliferation von PaCa5061-IIE-Zellen. Unter CM stiegen die Zellzahlen in beiden Gruppen an, bei CM-Luc stärker (PaCa5061-Luc: $p=0,033$; PaCa5061-IIE: $p < 0,001$) als bei CM-IIE (PaCa5061-Luc: keine Signifikanz; PaCa5061-IIE: $p < 0,001$). Auch der Zuwachs durch Kultivierung mit CM-Luc gegenüber CM-IIE war bei PaCa5061-IIE mit $p=0,018$ signifikant. Zudem war der Effekt auf das Wachstum bei PaCa5061-IIE deutlich größer, als bei der Luc-Kontrolle.

3.3 Kolonienformation mit konditioniertem Medium

Um den Einfluss des ITGB4-KD auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzellen unter 3D-Wachstumsbedingungen zu untersuchen, wurden Kolonienformations-Assays in Matrigel bzw. Soft-Agar durchgeführt. Für die Kultivierung wurden hierbei, wie in der „2D-Zellkultur“, entweder TUM- oder die konditionierten Medien verwendet.

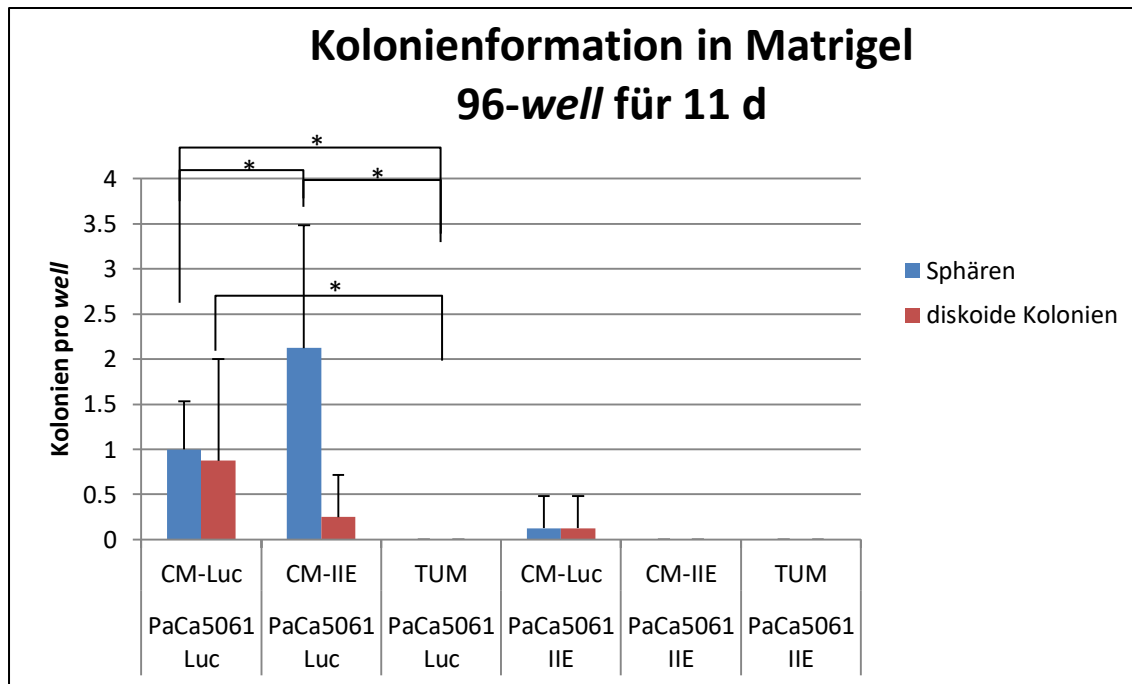


Abb. 8: Anzahl der Kolonien pro well unterteilt in sphärische und diskoidale Kolonien. Wachstum in konditioniertem Medium der Kontrolltransfektante (CM-Luc) und der ITGB4-KD-Linie (CM-IIE) bzw. Standard-Kulturmedium (TUM) in 96-well-Platten in Matrigel für 11 Tage. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n=8$. * $p<0,05$.

Bei dem Kolonienformations-assay der Zellen in normalem Zellkulturmedium (TUM) bildeten sich unter den Bedingungen dieser Versuchsanordnung (96-well-Platte, Matrigel) sowohl bei der PaCa5061-Luc-Kontrolle als auch bei der ITGB4-KD Zelllinie PaCa5061-IIE keine Kolonien (Abb. 8). Es zeigte sich ein signifikanter Effekt von konditioniertem Medium (CM) auf die Ausbildung von Kolonien. Insgesamt zeigte die Luc-Kontrolle, wie auch in anderen Versuchen, hierunter ein deutlich besseres Wachstum und bildete bei beiden konditionierten Medien Kolonien ($p<0,001$ für sphärische, $p=0,045$ für diskoidale Kolonien unter CM-Luc), wohingegen die ITGB4-KD-Linie nur unter CM-Luc sehr wenige Kolonien bildete.

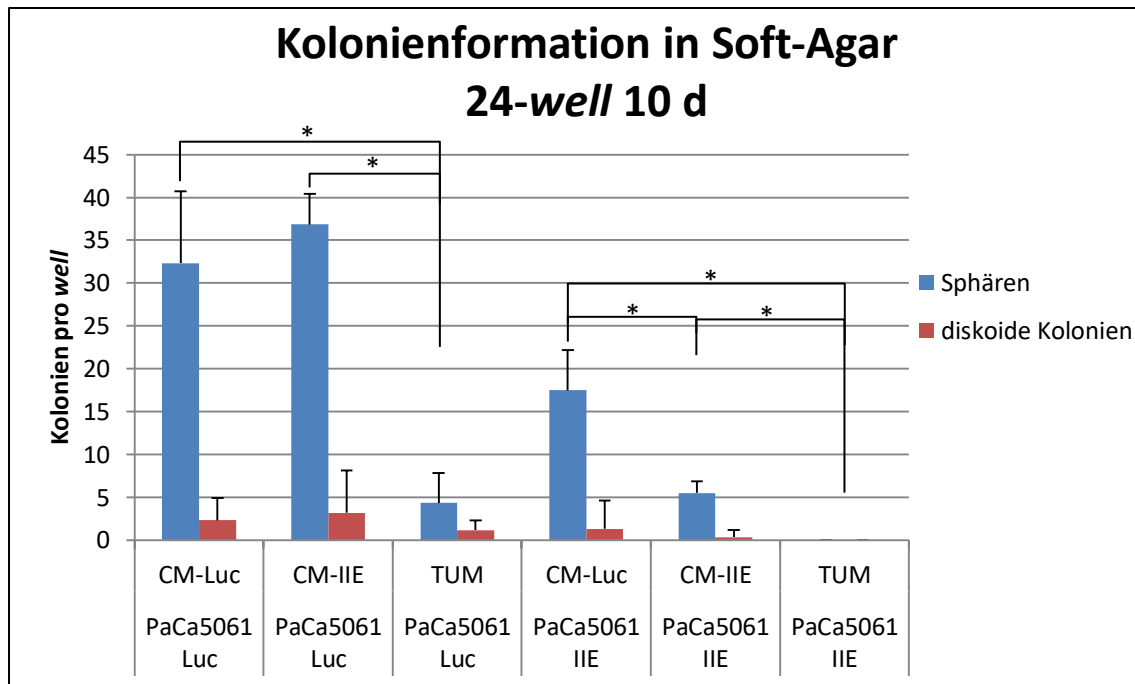


Abb. 9: Anzahl der Kolonien pro well unterteilt in sphärische und diskoid Kolonien. Wachstum in konditionierten Medien oder TUM in 24-well-Platten in Soft-Agar für 10 Tage. Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von $n=6$. * $p<0,001$.

Auch die Versuchsanordnung mit einer 24-well-Platte unter der Verwendung von Soft-Agar zeigte ein ähnliches Bild. Hier bildeten sich in der Luc-Kontrolle bei jedem Medium Kolonien, bei TUM-Medium jedoch nur ein Bruchteil derer, die unter den konditionierten Medien anwuchsen ($p<0,001$ für sphärische Kolonien im Vergleich mit CM-IIE und CM-Luc). Die ITGB4-KD-Linie PaCa5061-IIE bildete auch in Soft-Agar unter TUM-Medium keine Kolonien. Unter konditioniertem Medium bildeten sich Kolonien, insbesondere nach Gabe des Luc-CM. Die Unterschiede sind bei den sphärischen Kolonien deutlicher ausgeprägt als bei den diskoiden Kolonien ($p<0,001$ für alle in Abb. 9 markierten Signifikanzen).

3.4 Apoptose vs. Proliferation *in vivo*

Der ITGB4-KD muss auch *in vivo* stabil sein, damit anschließende Untersuchungen der Tumorproben aussagekräftig sind. Um dies zu kontrollieren, wurden Schnitte der Xenografttumore aus dem vorangegangenen Tierversuch (unveröffentlichte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe) mit einem Antikörper gegen humanes ITGB4 immunhistochemisch gefärbt. Zu sehen war eine deutliche Reduktion des ITGB4 durch den KD, welches für seine Stabilität *in vivo* spricht. In Selektin-KO-Mäusen deutete sich zudem eine erhöhte Expression von ITGB4 in den Xenograft-Tumorzellen an. Dies wurde besonders deutlich in den wenigen, mit deutlicher Verzögerung gewachsenen

Tumoren der Kombinationsgruppe (Selektin-KO plus ITGB4-KD). Hier ist ITGB4 trotz des ITGB4-KD nachweisbar, so dass im Selektin-KO der ITGB4-KD deutlich schwächer war als in WT-Mäusen (Abb. 10).

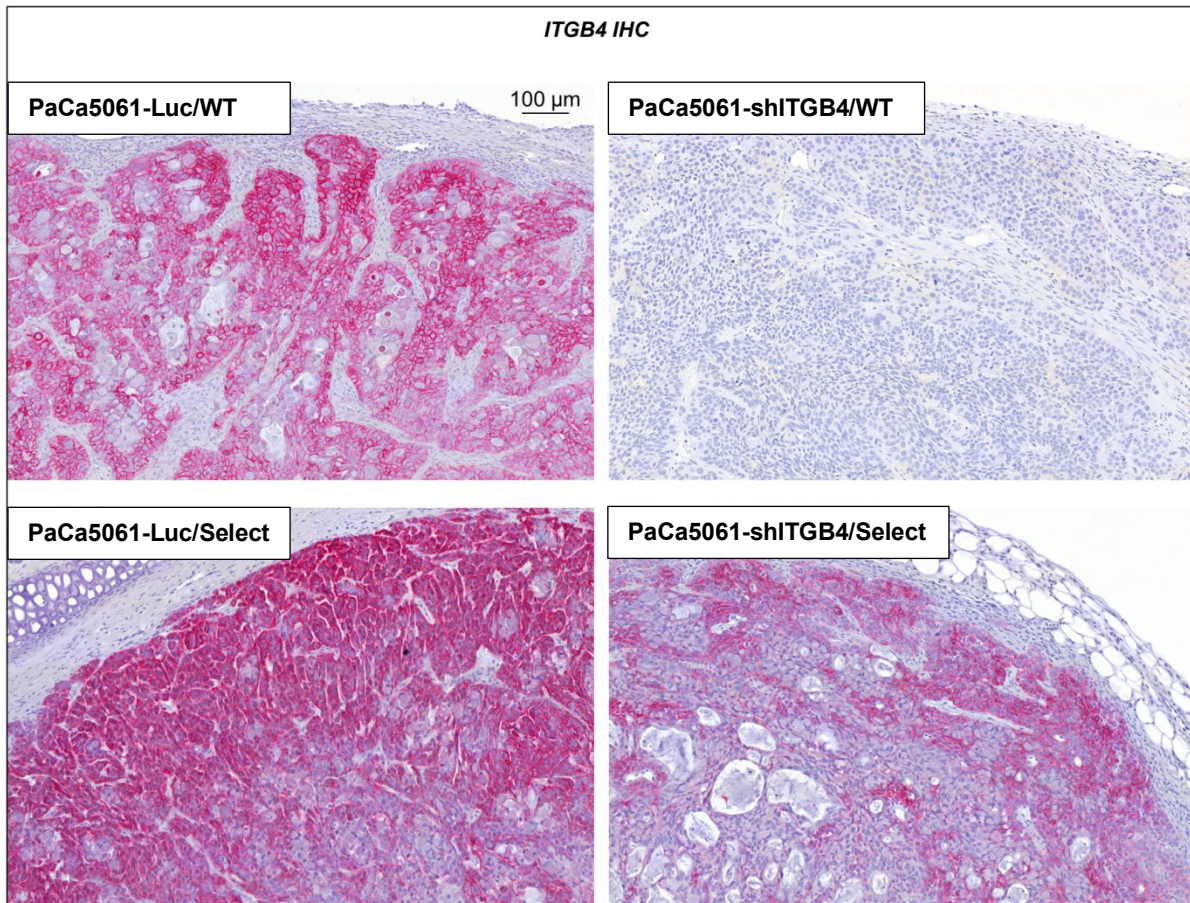


Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von ITGB4 (rot). Exemplarisch dargestellt ist je ein subkutaner Primärtumor der vier Gruppen der Xenograft-Tierversuche (siehe 1.3; Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Zellen in WT-Mäusen bzw. E-/P-Selektin-KO-Mäusen [PaCa5061-Luc/WT, -shITGB4/WT, -Luc/KO, -shITGB4-KO]). Zu sehen ist die Reduktion des ITGB4 durch den ITGB4-KD. Bei Selektin-KO ist mehr ITGB4 nachweisbar als bei den Wildtyp-Mäusen, insbesondere ist der ITGB4-KD in Selektin-KO-Mäusen unvollständig.

3.4.1 Feulgen

Da in den Tierversuchen Unterschiede im Überleben der Mäuse beobachtet wurden und dies auf unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der Kontroll- bzw. ITGB4-KD-Tumore zurückzuführen ist (Endpunkt: s.c. Tumor von ca. 1,5 cm³), war es von Interesse, die Tumore hinsichtlich des Anteils apoptotischer und proliferierender Zellen zu vergleichen.

Mit Hilfe der Feulgen-Färbung kann der Anteil apoptotischer Zellen in einem histologischen Schnitt bestimmt werden (siehe Abb. 11). Für die Präparate wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Tumorzellen für jeden Tumor in sechs verschiedenen

Gesichtsfeldern bestimmt. Hieraus wurde für jede Tumorgruppe ein arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung berechnet (Luc/WT; ITGB4/WT; Luc/Select; ITGB4/Select).

Der ITGB4-KD führte in WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld ($p=0,0138$, t-Test). Der Selektin-KO bewirkte keine Änderung der Apoptose. Der tendenziell noch höhere Anteil apoptotischer Zellen in der Gruppe mit kombiniertem ITGB4-KD plus Selektin-KO kann statistisch nicht gesichert werden, da nur noch in zwei von zehn Mäusen Tumore wuchsen, die in die Analyse eingebracht werden konnten (siehe Abb. 12).

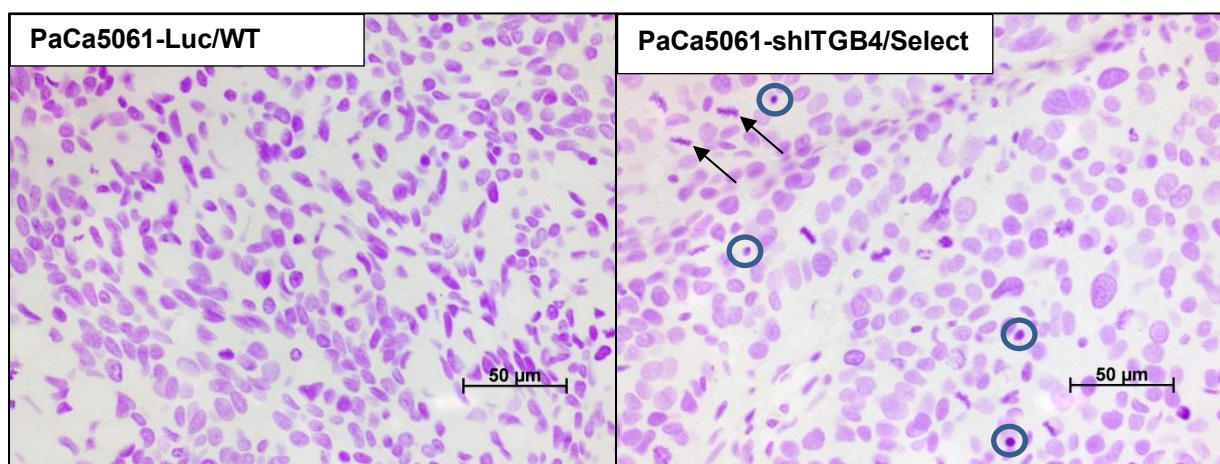


Abb. 11: Feulgen-Färbung an PaCa5061-Xenografttumoren, 400-fache Vergrößerung. Links ein Tumor der Gruppe Luc/WT, rechts shITGB4/Select. Erkennbar sind hier die zahlreichen dunkelviolett gefärbten Zellkerne. Abzugrenzen sind die Mitosefiguren (Pfeil) von apoptotischen Zellkern-Residuen mit dicht gepacktem Chromatin (Kreis).

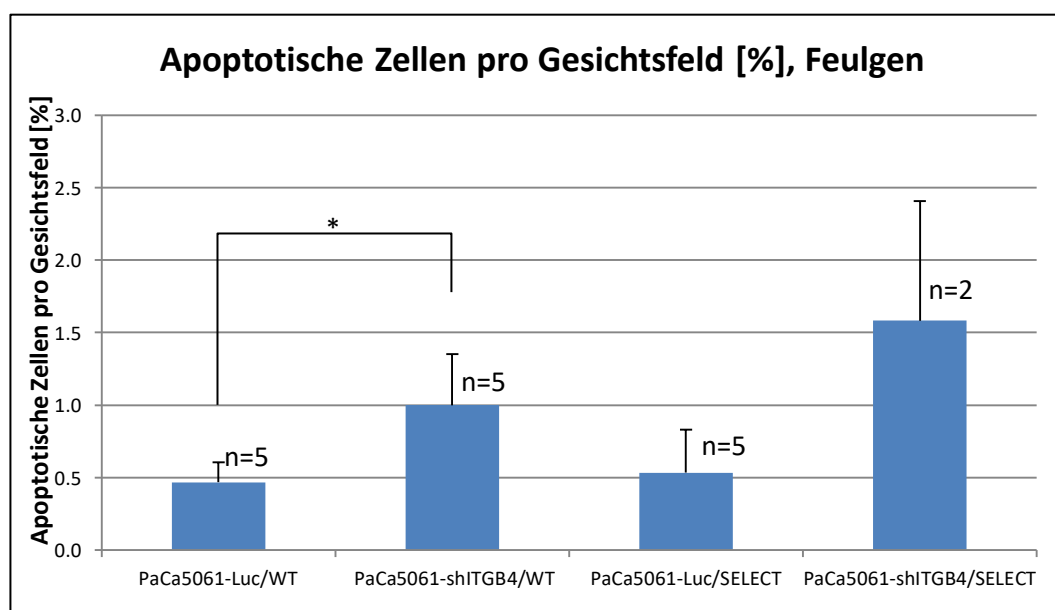


Abb. 12: Anteil apoptotischer Zellen pro 100 Tumorzellen pro Tumor (n=5 außer shITGB4/Select [n=2], 6 Gesichtsfelder pro Tumor). Balken zeigen Mittelwerte \pm SD; * $p \leq 0,05$.

3.4.2 pH2AX

Das Histon H2AX wird während der Apoptose phosphoryliert. Die Ermittlung des Anteils apoptotischer Zellen unter 100 gezählten Zellen wurde in Ergänzung und analog zur Feulgen-Färbung am Mikroskop nach immunhistochemischer Anfärbung von phospho(p)-H2AX durchgeführt (Abb. 13).

Der ITGB4-KD führte in den WT-Mäusen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld ($p=0,002$, t-test).

Auch hier kann für den Vergleich mit der Gruppe ITGB4/Select keine statistische Signifikanz gesichert werden, da nur noch in zwei Mäusen Tumore wuchsen, die in die Analyse eingebracht werden konnten (Abb. 14).

Die Selektindefizienz allein führte nicht zu einer Änderung des Anteils apoptotischer Zellen. Demnach konnte das Ergebnis der Feulgen-Färbung anhand der pH2AX-Färbung bestätigt werden.

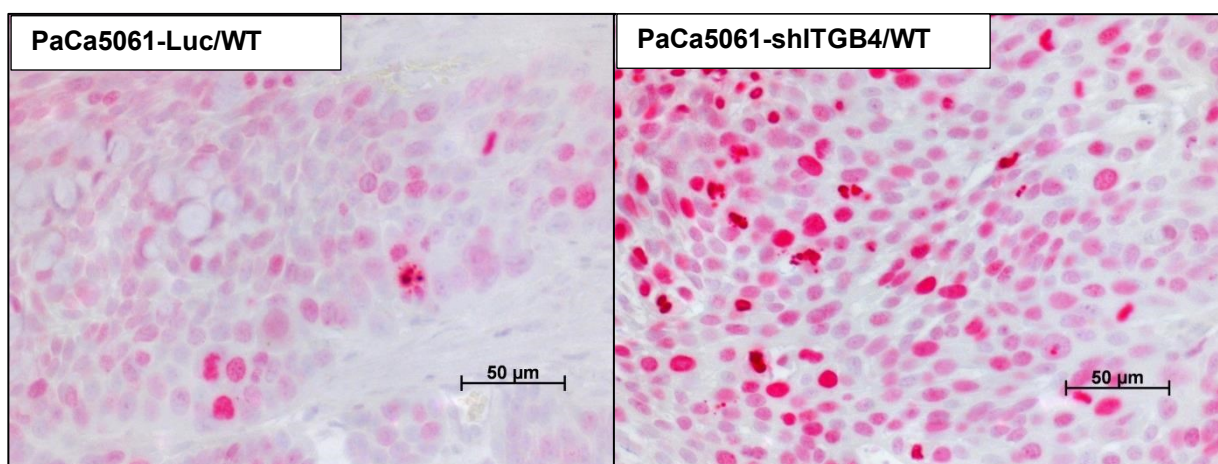


Abb. 13: Färbung von pH2AX. Links ein Tumor der Gruppe Luc/WT. Rechts shITGB4/WT. Die intensiv rot gefärbten Zellkerne wurden als pH2AX-positive Zellen bestimmt.

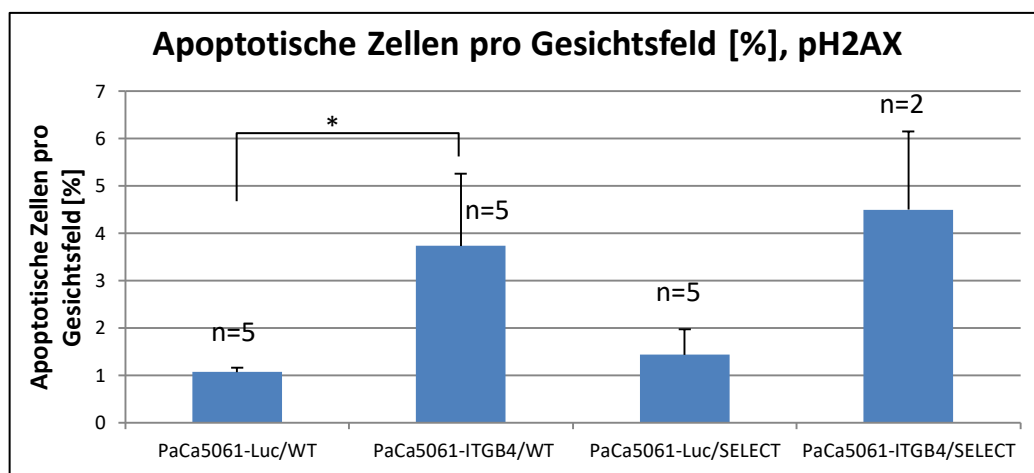


Abb. 14: Anteil pH2AX-positiver (=apoptotischer) Zellen pro 100 Tumorzellen pro Tumor ($n=5$ außer shITGB4/Select [$n=2$], 6 Gesichtsfelder pro Tumor). Balken zeigen Mittelwerte \pm SD; * $p \leq 0,05$.

3.4.3 Zellproliferation *in vivo*

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede im Tumorwachstum zusätzlich zur vermehrten Apoptose auch durch eine verminderte Proliferation zustande gekommen sein könnten, wurde diese mit Hilfe des Zellproliferationsmarkers Ki-67 bestimmt.

Der Anteil Ki-67-positiver Zellen pro Gesichtsfeld wurde für jeden Tumor in sechs verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt (siehe Abb. 15). Hieraus wurde für jede Tumorgruppe der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet (Luc/WT; ITGB4/WT; Luc/Select; ITGB4/Select). Die Auswertung ergab große Standardabweichungen und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

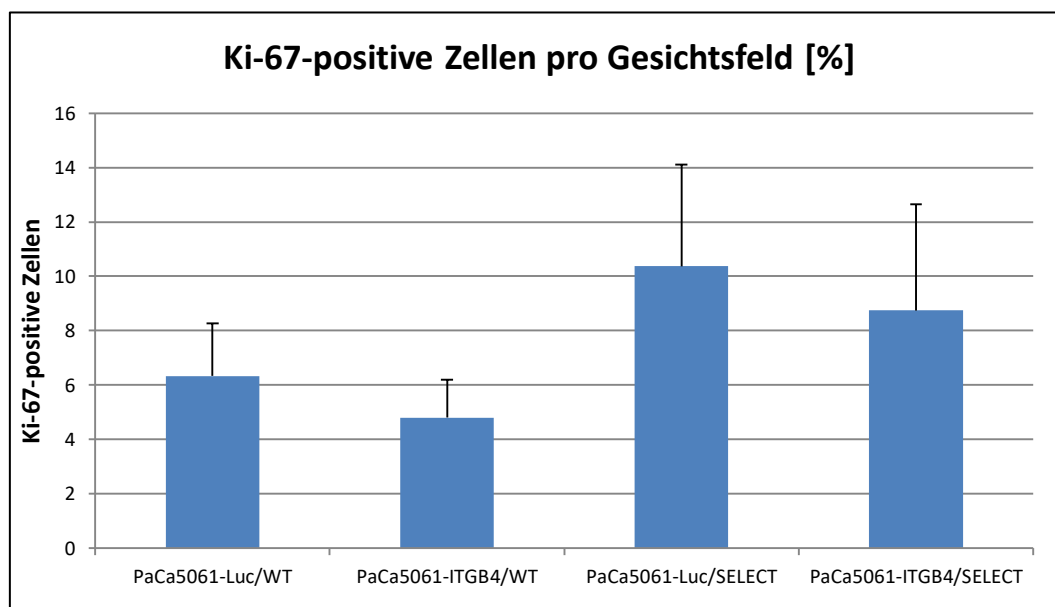


Abb. 15: Anteil Ki-67-positiver (proliferierender) Zellen pro 100 Tumorzellen pro Tumor (n=5 außer ITGB4/SELECT [n=2], 6 Gesichtsfelder pro Tumor); Balken zeigen Mittelwerte \pm SD.

3.5 SDF-1 Produktion und Sekretion

3.5.1 ELISA aus Zelllysaten und Kulturüberständen

Nachdem in einer parallel am Institut durchgeführten Doktorarbeit (Daniela Schetler) das nach ITGB4-KD reduzierte Wachstum von Prostatakarzinom-Xenografts zumindest teilweise durch erniedrigte Proteinkonzentrationen des Chemokins CXCL12 (SDF-1) erklärt worden war, wurden die in dieser Arbeit betrachteten Pankreaskarzinomzellen ebenfalls auf Änderungen der SDF-1-Produktion und -Sekretion hin unter-

sucht. Hierfür wurden zunächst ELISA zum Nachweis von SDF-1 in Zelllysaten und Kulturüberständen durchgeführt. Von jeder Probe und den Standards wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend gemittelt. Aus diesen Werten wurde die Standardkurve und die Änderung des SDF-1 Gehalts im Zelllysat und im Zellkulturüberstand nach ITGB4-KD im Vergleich zur Kontrollzelllinie berechnet und grafisch dargestellt (siehe Abb. 16 und Abb. 17).

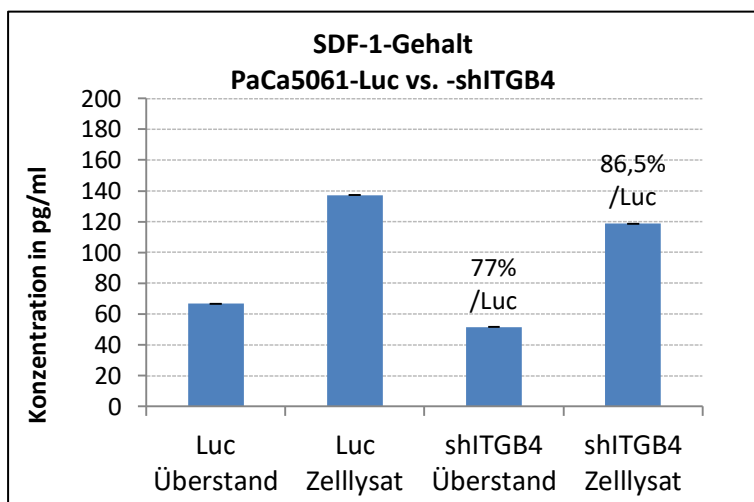


Abb. 16: Effekt des ITGB4-KD auf die Expression (Zelllysat) und Sekretion (Überstand) von SDF-1 anhand des Vergleichs von PaCa5061-Luc und -shITGB4 (gepoolte Zelllinie mit vergleichsweise schwachem KD von ITGB4). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Luc-Kontrolle (100%) bei getrennter Betrachtung des Überstands bzw. des Zelllysats. Mittelwerte \pm SD von n=2.

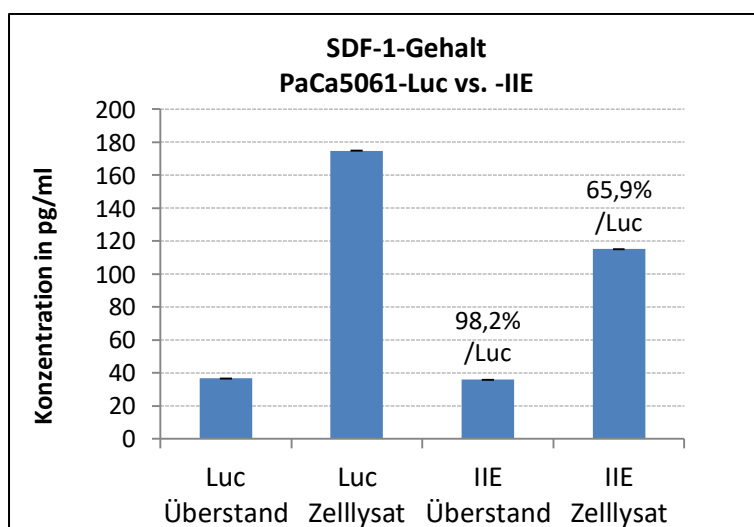


Abb. 17: Effekt des ITGB4-KD auf die Expression (Zelllysat) und Sekretion (Überstand) von SDF-1 anhand des Vergleichs von PaCa5061-Luc und -IIE (Zelllinie mit vergleichsweise starkem KD von ITGB4). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Luc-Kontrolle (100%) bei getrennter Betrachtung des Überstands bzw. des Zelllysats. Zur Gewinnung des Überstandes musste serum-haltiges Medium genutzt werden, da PaCa5061-IIE-Zellen in Abwesenheit von Serum abschwimmen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD von n=2.

Obwohl es sich bei SDF-1 um ein sezerniertes Protein handelt, fand sich im ELISA in allen Ansätzen das SDF-1 hauptsächlich im Zelllysate und viel weniger im Überstand. Dies lässt sich jedoch auch dadurch erklären, dass im Überstand vermutlich die Gesamtproteinkonzentration geringer ist als in Zelllysaten. In beiden ITGB4-KD-Linien, also shITGB4 und IIE, war das intrazelluläre SDF-1 vermindert und dies in der Linie mit dem stärkeren KD (IIE) deutlicher als in der Linie mit schwächerem KD (shITGB4).

3.5.2 ELISA aus Tumorlysaten

Die Messungen des SDF-1 Gehaltes in den lysierten Tumoren aus den Mausversuchen zeigten in 31 von 34 Proben eine niedrigere Extinktion als der niedrigste Standard, so dass SDF-1 in diesen Tumoren unter der Nachweisgrenze lag. Zum Nachweis, dass der Versuchsablauf funktioniert hat, ist in Abb. 18 die korrespondierende Standardreihe aus diesem ELISA-Experiment gezeigt. Die fehlende SDF-1-Expression in den Xenografttumoren wurde durch eine immunhistochemische Färbung von SDF-1 an den Tumorschnitten bestätigt (siehe 3.5.3).

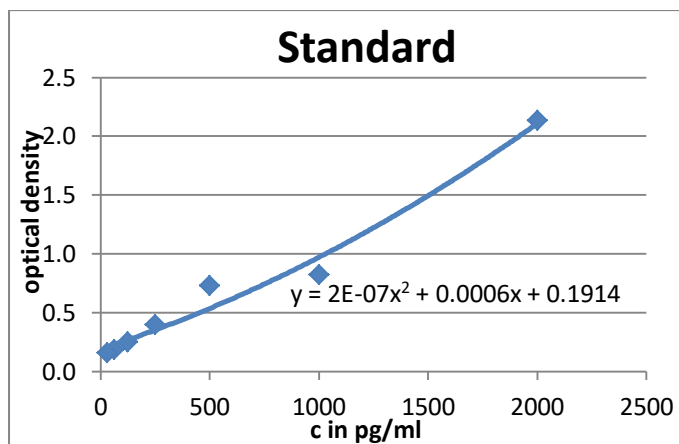


Abb. 18: SDF-1 Standardreihe. Die Standardreihe für diesen Versuch zeigt, dass der Versuchsablauf funktioniert und kann somit als Positivkontrolle angesehen werden.

3.5.3 SDF-1 Immunhistologie

Da mittels ELISA in den Tumorlysaten in 31 von 34 Proben kein SDF-1 nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich eine immunhistologische Färbung von SDF-1 an den Tumorschnitten durchgeführt. Hier waren sämtliche Tumorschnitte SDF-1 negativ, während die Positivkontrolle am Hoden positiv ausfiel (Abb. 19 und Abb. 20). Dies bestätigte das Ergebnis des SDF-1 ELISA, welches im Hinblick auf die Tumorlysate auch negativ war.

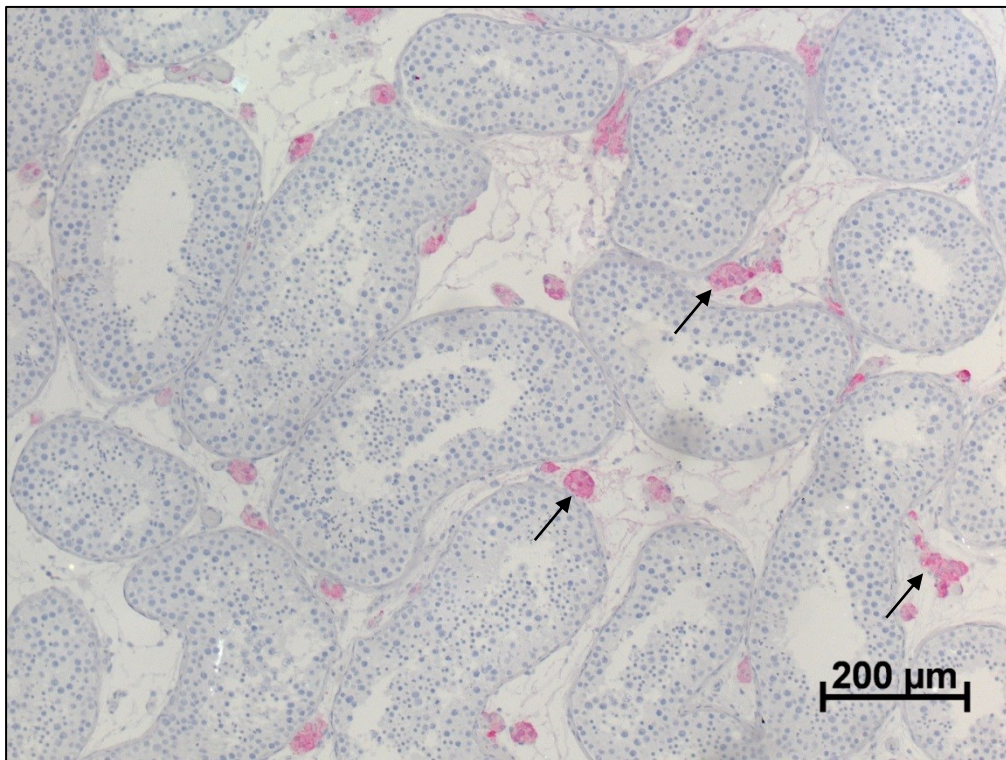


Abb. 19: Positivkontrolle der SDF-1-Färbung. Die Leydig-Zwischenzellen im Hoden sind spezifisch rot angefärbt (Pfeile).

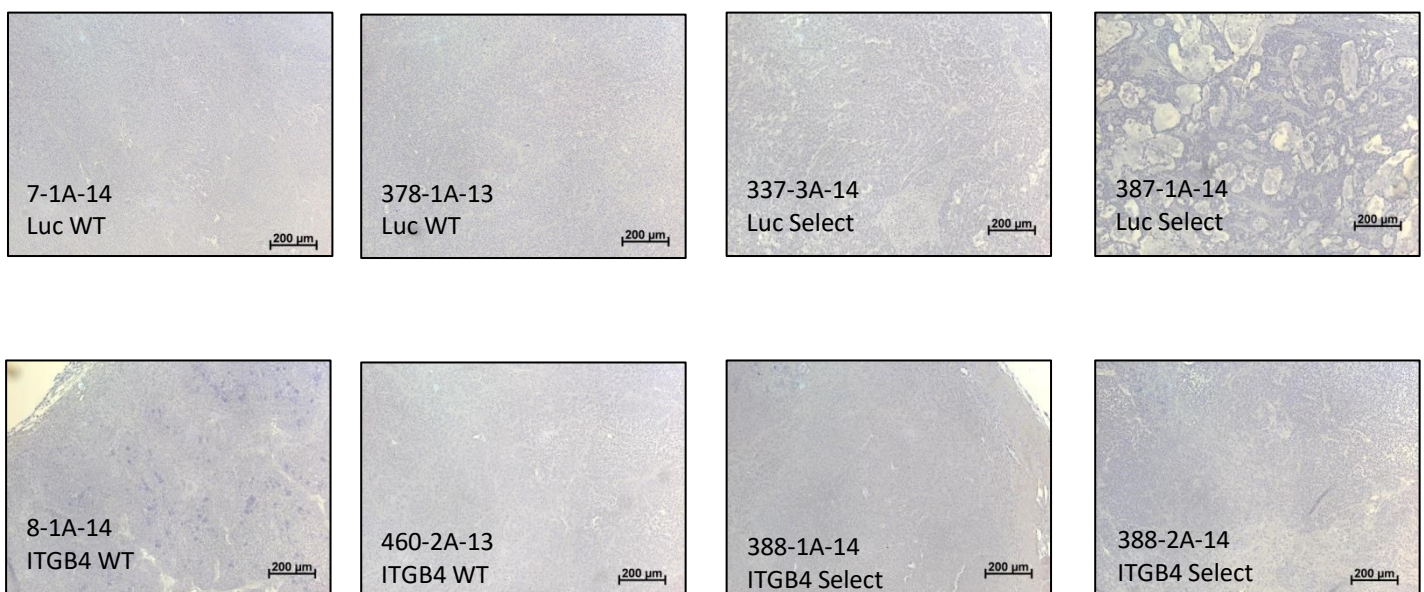


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von humanem SDF-1 an PaCa5061-Xenograftumoren aller vier Versuchsgruppen. Exemplarisch sind aus jeder Gruppe zwei Präparate dargestellt. Alle 17 Präparate waren SDF-1 negativ

3.6 Quantifizierung von Proteinen mittels WB

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche, mit Zellproliferation und ITGB4-*signaling* assoziierte Proteine bzw. deren Phospho-Stufen mittels WB in in den Xenografttumor-Lysaten nachgewiesen (siehe Abb. 21).

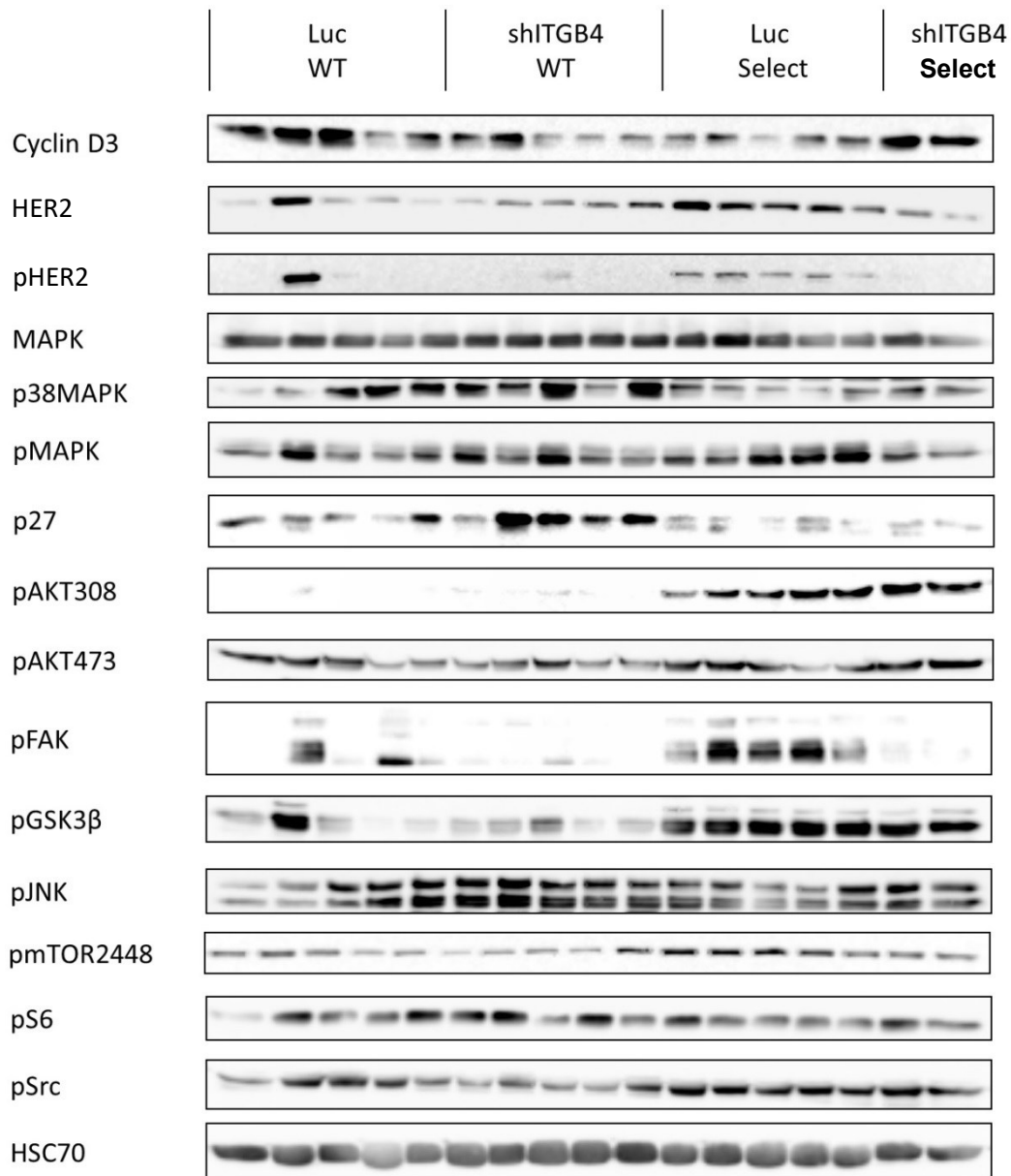


Abb. 21: Zusammenstellung der immunreaktiven Proteinbanden nach WB der Tumorlysate (n=5 außer n=2 bei shITGB4/Select). Aus diesen Aufnahmen konnte die optische Dichte der Proteinbanden bestimmt werden und so eine Quantifizierung stattfinden. Dabei wurde HSC70 als Ladekontrolle verwendet.

Um die Expression der nachgewiesenen Proteine zu quantifizieren, wurde für jeden Tumor ein Quotient aus optischer Dichte jeder Bande des zu untersuchenden Proteins (abzüglich des *backgrounds*, also der optischen Dichte der Membran in der

Umgebung) und der optischen Dichte der HSC70-Ladekontrolle aus demselben Proteinauftrag (derselben *lane*, abzüglich des *backgrounds* der optischen Dichte der Membran in der Umgebung) errechnet. Anschließend wurden aus diesen Ratios für jede Tumorgruppe (Luc/WT; ITGB4/WT; Luc/Select; ITGB4/Select) der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und diese graphisch dargestellt. Mit den Ratios wurden dann t-Tests der einzelnen Gruppen im Vergleich mit Luc/WT durchgeführt, um die statistische Signifikanz zu ermitteln (mit Ausnahme der Gruppe ITGB4/SELECT, da hier in nur 2 von 10 Versuchstieren Tumore wuchsen, die für weitere Analysen genutzt werden konnten). Interessanterweise waren verschiedene getestete Antigene allein durch den Selektin-KO signifikant beeinflusst (gesteigerte Expression von HER2, pSrc, pAkt(308), pFAK, pGSK3 β , pmTOR(2448) in Luc/Select vs. Luc/WT Tumoren). Dahingegen hatte der ITGB4-KD allein kaum Einfluss auf die getesteten Moleküle, schien aber tendenziell die Aktivität von FAK zu senken (Abb. 22).

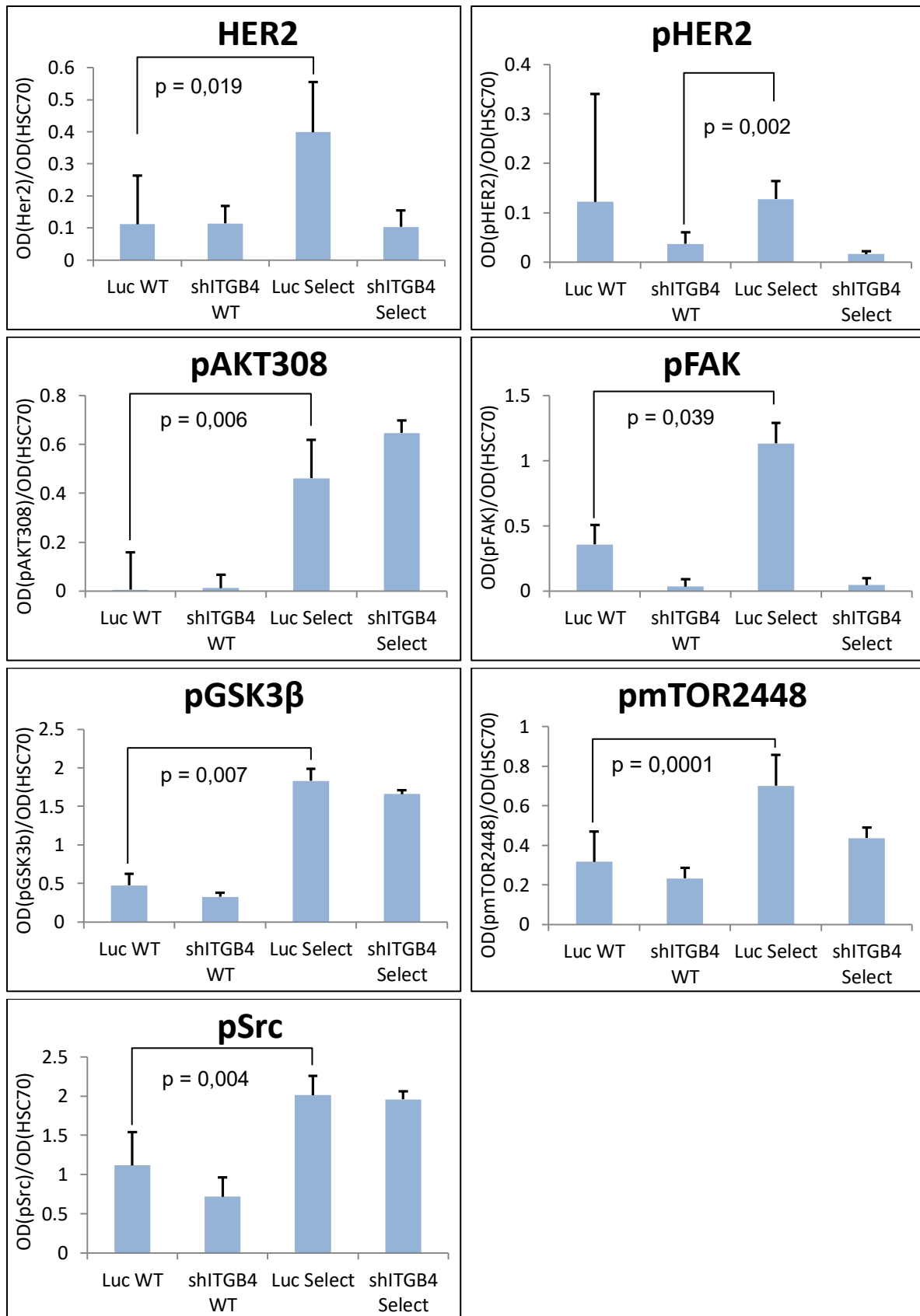


Abb. 22: Quantitatives Ergebnis der WB Analysen (Ratio der optischen Dichte des Proteins zur Ladekontrolle HSC70, jeweils abzüglich des *backgrounds*). Potenzielle Unterschiede in der Gruppe shITGB4/Select konnten statistisch nicht gesichert werden, da in dieser Gruppe nur zwei Tumore ($n=2$) nach den Tierversuchen vorhanden waren. Zu beachten ist die gesteigerte Aktivität verschiedener Signalmoleküle in der Gruppe Luc/Select (Tumorzellen mit normalem ITGB4-Status in Selektin-KO-Mäusen, kein Unterschied im Tumorstadium). Die Balken zeigen Mittelwerte+SD von $n=5$ (außer bei shITGB4/Select [$n=2$]). OD=optical density

3.6.1 Immunhistologische Validierung der pFAK Veränderung

Da die FAK (*focal adhesion kinase*) wichtiger Bestandteil des Integrin-ECM *downstream signaling* ist und somit Einfluss auf *anoikis* und Metastasierung hat (Alanko et al. 2015), war es wichtig herauszufinden, ob es Unterschiede in den Versuchsgruppen hinsichtlich der FAK-Aktivität (gemessen an der Menge von phosphoryliertem FAK, pFAK) gibt. Tatsächlich zeigten die WB-Analysen signifikante Änderungen in der Expression von pFAK, nämlich eine Steigerung von pFAK in Selektin-KO Mäusen (Luc/Select) und eine tendenzielle Verminderung von pFAK nach ITGB4-KD in WT-Mäusen (ITGB4/WT und auch ITGB4/Select). Da im WB nicht näher differenziert werden kann, ob das pFAK-Signal aus Zellen des murinen Stromas oder aus den humanen Tumorzellen stammt, wurde ergänzend eine immunhistochemische Analyse von pFAK auf den Xenografttumor-Schnitten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass pFAK in den Tumorzellen selbst exprimiert war (siehe Abb. 23). Zudem zeigte sich hier tendenziell auch die vermehrte pFAK-Expression in Luc/WT Tumoren (verglichen mit ITGB4-KD/WT Tumoren), passend zum WB Ergebnis.

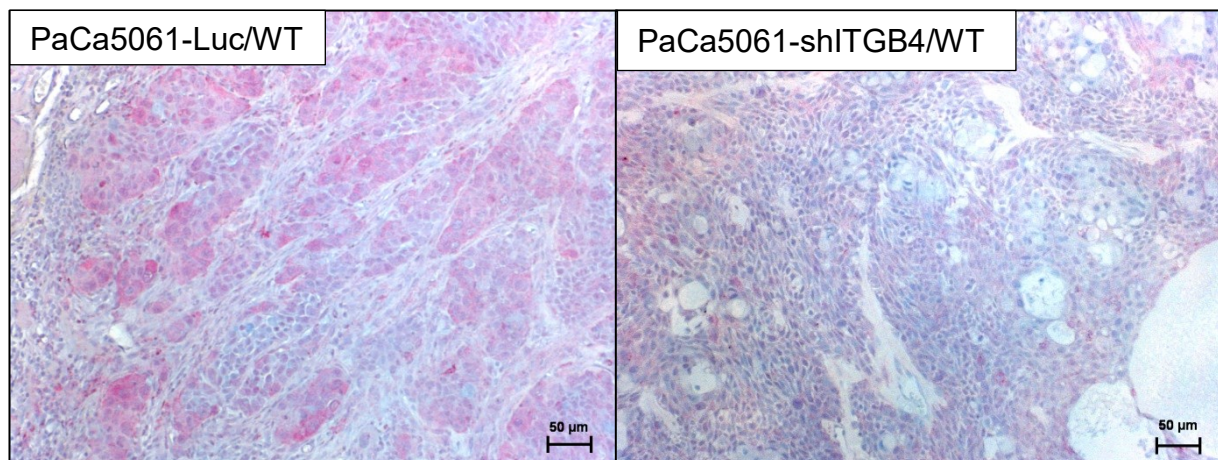


Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis von pFAK an Xenografttumor-Schnitten. Links Luc/WT, rechts shITGB4/WT. Man sieht eine deutliche Reduktion der rotgefärbten pFAK-positiven Zellen durch den ITGB4-KD.

4 Diskussion

Aufgrund der im Vorfeld zu diesem Projekt erzielten Beobachtung, dass ein shRNA-vermittelter, stabiler KD von ITGB4 zu einer Wachstumsverzögerung von Pankreaskarzinom-Xenografttumoren *in vivo* führt, wurde zu Beginn der Experimente ein möglicher Einfluss des ITGB4 auf die Proliferation von PaCa5061 Zellen *in vitro* untersucht. Hierfür wurden die Zellen bei niedriger Zelldichte (5×10^4 Zellen pro T75-Flasche) ausgesät und die resultierende Zellzahl nach sechs Tagen Kultivierung verglichen. Als ITGB4-KD-Zelllinien dienten einerseits die aus mehreren Kolonien zusammengeführte Zelllinie PaCa5061-shITGB4, sowie andererseits die aus drei Kolonien abgeleitete Linie PaCa5061-ITGB4-IIE. Hier zeigte sich, dass der wachstumseinschränkende Effekt deutlich vom Ausmaß des ITGB4-KD abhing (je stärker der KD, desto stärker die Wachstumseinschränkung). Regelmäßige durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass der ITGB4-KD in der Linie PaCa5061-ITGB4-IIE über mehrere Monate hinweg stabil war, so dass keine Beeinflussungen der Ergebnisse durch den Zeitpunkt der Experimente zu erwarten waren.

Die durch den ITGB4-KD vermittelte Reduktion des Zellwachstums konnte jedoch teilweise aufgehoben werden, indem für die Kultivierung der Zellen konditioniertes Medium verwendet wurde. Sowohl in 2D-assays zur Proliferation als auch in 3D-assays zur Kolonienformation konnte das Wachstum der Zellen positiv beeinflusst werden und zwar insbesondere durch konditioniertes Medium der Kontrollzellen in den 3D-assays. Dabei wurde die Fähigkeit zur Kolonienformation von ITGB4-KD-Zellen stärker gesteigert als die von den Kontrollzellen.

Diese Beobachtung leitet zu der Hypothese, dass ein löslicher Faktor abhängig von der ITGB4-Expression von den Zellen abgegeben wird und sich die Zellen so über einen auto- bzw. parakrinen Mechanismus selbst bzw. gegenseitig stimulieren. Diese Hypothese wurde bereits in einer Doktorarbeit (cand. med. Daniela Schetler) zum Prostatakarzinom erhoben und durch Untersuchungen belegt. So wurde an Prostatakarzinomzellen gezeigt, dass die Zellen der Luc-Kontrolle eine höhere Konzentration von SDF-1 in ihrer Umgebung erreichen als ITGB4-KD-Zellen und dass der besonders ausgeprägte wachstumsfördernde Effekt von Luc-CM auf ITGB4-KD-Zellen durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen SDF-1 aufgehoben werden kann (Daniela Schetler, unveröffentlichte Daten). Auch in der vorliegenden Studie wurde eine verringerte Expression von SDF-1 in Pankreaskarzinomzellen mit ITGB4-KD nachgewiesen, allerdings nur *in vitro*, nicht *in vivo* (siehe 4.2).

Analysen unter dreidimensionalen Zellkulturbedingungen waren notwendig, da in dieser Arbeit ein „*in vivo*-Phänotyp“ vorrangig durch Zellkulturexperimente erklärt werden sollte, Tumorzellen sich aber allein durch 3D-Wachstumsbedingungen in ihrem Verhalten grundlegend ändern können (Gill und West 2014). Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden Analysen in semisoliden Medien wie Matrigel oder Soft-Agar durchgeführt und ferner die Xenografttumoren genauer analysiert.

4.1 Apoptose vs. Proliferation

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob der wachstumsverzögernde Effekt des ITGB4-KD *in vivo* auch durch eine verringerte Proliferation (wie die *in vitro*-Daten vermuten ließen) oder durch eine erhöhte Apoptose erklärt werden kann.

Mit der Feulgen-Färbung konnte gezeigt werden, dass bei einem ITGB4-KD die Zahl der apoptotischen Zellen in den Tumoren signifikant steigt. Zudem ist der synergistische Effekt von ITGB4-KD und Selektindefizienz auf das Tumorstadium durch eine noch höhere Zahl apoptotischer Zellen in dieser Gruppe erkennbar, wenngleich in dieser Gruppe nur zwei Tumore für die Analysen zur Verfügung standen, so dass keine statistisch belastbaren Aussagen zum Ausmaß der Apoptose getroffen werden können (nur noch zwei von zehn Mäusen entwickelten überhaupt Tumoren). Da diese Beobachtung ein grundlegender Punkt für die weitere Auseinandersetzung mit der Arbeitshypothese und damit von hoher Bedeutung für diese Arbeit war, wurde eine weitere Färbung zur Darstellung der Apoptose in den Tumorschnitten durchgeführt. Hierfür eignet sich pH2AX als Marker für die Apoptose (Lu et al. 2006, Rogakou et al. 2000). So zeigte sich auch bei Färbung von phosphoryliertem H2AX ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen in den ITGB4-KD-Tumoren mit tendenziell noch höherem Anteil bei kombiniertem ITGB4-KD plus Selektindefizienz. So kann schon ein Teil der initialen Fragestellung beantwortet und die Aussage getroffen werden, dass das verringerte Wachstum der Tumoren bei ITGB4-KD mindestens zu einem Teil der erhöhten Apoptose der Zellen zuzuschreiben ist. Um diese Aussage zu komplettieren, musste jedoch untersucht werden, ob auch die Proliferation der Zellen beeinträchtigt ist. Hierzu wurde eine histologische Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 verwendet.

Die Auswertung dieser histologischen Färbung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation für die verschiedenen Gruppen. So kann man zusammenfas-

sen, dass das eingeschränkte Wachstum bei ITGB4-KD *in vivo* durch eine Beeinflussung der Apoptose und nicht der Proliferation zustande kommt. Die Beobachtung, dass eine Depletion von ITGB4 zu erhöhten Apoptoseraten führt, konnte bereits für Brustkrebszellen beschrieben werden (Lipscomb et al. 2005).

In vitro findet unter normalen 2D-Wachstumsbedingungen kaum Apoptose statt (Baumgartner-Parzer et al. 1995, Elstner et al. 1998). Daher war es umso wichtiger, das Wachstum der ITGB4-KD-Zellen unter 3D-Wachstumsbedingungen in Matrigel oder Soft-Agar zu untersuchen. Hierbei konnte der Wachstumsrückstand durch konditioniertes Medium (CM) teilweise aufgehoben werden. Allgemein gilt der Integrin-ECM-Kontakt als grundsätzlicher Mechanismus zur Suppression von *anoikis*, so dass die nachweisbar vermehrte Apoptose in den Xenografttumoren mit ITGB4-KD bereits über den mit dem KD verbundenen Verlust des ECM-Kontakts erklärt werden kann. Gleichzeitig konnte jedoch die verminderte Kolonienformation der ITGB4-KD-Zellen *in vitro* durch Zugabe von CM reduziert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass zusätzlich ein durch ITGB4 direkt oder indirekt regulierter löslicher Faktor das Wachstum der Zellen beeinflusst. Ein Faktor, für den bereits eine mögliche Regulation durch ITGB4 und gleichzeitig ein wachstums-modulierender Effekt auf ITGB4-depletierte Zellen anhand von Prostatakarzinomzellen beobachtet werden konnte, war CXCL12 (SDF-1) (Daniela Schetler, unveröffentlichte Daten).

4.2 CXCL12 (SDF-1)

Ein Ziel war also zu untersuchen, ob CXCL12 (SDF-1) auch bei Pankreaskarzinomzellen für die nach ITGB4-KD zu beobachtende Wachstumsverzögerung verantwortlich sein könnte. Es wurden Untersuchungen mittels ELISA durchgeführt, welche Aufschluss darüber geben sollten, in welchen Mengen dieser Botenstoff in den Zellen und in der Zellumgebung vorhanden ist. Vergleichbare Proben waren die Voraussetzung, so dass jede Zelllinie in gleicher Zellzahl ausgesät, unter gleichen Bedingungen kultiviert und gleiche Zellzahlen lysiert wurden. Da die Zelllinie PaCa5061-IIE nicht in serumfreiem Medium kultiviert werden konnte, musste diese in mit FCS versehenem Medium kultiviert werden, so dass dies auch für die Luc-Kontrolle durchgeführt wurde. Serum-freie Bedingungen wären zu bevorzugen gewesen, da lösliche Faktoren nach ihrer Freisetzung an Serumbestandteile gebunden werden können und dann im ELISA schlechter nachweisbar sind. Zudem steigert das Fehlen von

Serum im Kulturmedium die Sekretionsleistung von Zellen (vergleiche Abb. 16 und Abb. 17).

Zudem sind die Konzentrationen von SDF-1 in den Gruppen PaCa5061-shITGB4 und PaCa5061-IIE im Vergleich mit den Luc-Kontrollen verringert, so dass hier ein Zusammenhang von ITGB4-Status der Zellen mit der SDF-1-Konzentration hergestellt werden kann.

Auch die Xenograftumore wurden hinsichtlich des SDF-1-Gehaltes in Abhängigkeit vom ITGB4- und Selektinstatus analysiert. Hierbei konnte jedoch keinerlei SDF-1 nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass das SDF-1 durch das Kryokonservieren und Auftauen der Tumorlysate zerstört worden ist, wurde der SDF-1-Gehalt zusätzlich mittels Immunhistochemie an Xenograft-Tumorschnitten bestimmt, was ebenfalls ein Fehlen von SDF-1-Expression in den Tumoren nachweisen konnte. Demnach war SDF-1 nicht ursächlich für die beobachteten Wachstumsunterschiede der Xenograftumore *in vivo* und es bestanden deutliche Unterschiede in der Produktion von SDF-1 unter *in vivo*- und *in vitro*-Bedingungen. Dies ist nicht verwunderlich, da sich Tumorzellen aus der Zellkultur und nach Wachstum *in vivo* zum Teil erheblich unterscheiden (Daniel et al. 2009, Williams et al. 2013).

Daher kann nicht von einem zu generalisierenden Effekt von CXCL12 auf das Wachstum ITGB4-depletierter Tumoren verschiedener Entitäten ausgegangen werden. Es können jedoch sehr wohl andere lösliche Faktoren angenommen werden, die das Wachstum ITGB4-depletierter Pankreaskarzinomzellen auto- oder parakrin modulieren. Dies wurde durch den wachstumsstimulierenden Effekt von konditionierten Medien, insbesondere des Luc-CM auf ITGB4-KD-Zellen, in dieser Arbeit nachgewiesen.

4.3 Ein autokriner Mechanismus?

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse musste die initiale Fragestellung abgewandelt werden, jedoch konnte weiterhin von einem löslichen Faktor ausgegangen werden, welcher das Wachstum der Zellen beeinflusst, aber nicht SDF-1 zu sein scheint. Auch der Mechanismus einer autokrinen und parakrinen Wirkungsweise, kam weiterhin in Frage, da insbesondere die ITGB4-KD-Zellen vom konditionierten Medium der Kontrollzellen in ihrem Wachstum gesteigert wurden. Gleichzeitig zeigten die Daten, dass das Wachstum der Zellen direkt aufgrund des ITGB4-KD eingeschränkt wird, da

durch Verwendung von konditioniertem Medium keine vollständige „Normalisierung“ des Wachstumsverhaltens auf das Niveau der Kontrollzellen gelang. Würde das Wachstum ausschließlich durch lösliche Faktoren beeinflusst werden, müsste der Rückstand sowohl in 2D- als auch in 3D-Kulturen vollständig durch konditioniertes Medium aufzuheben sein.

Die Zelllinie PaCa5061-IIE wuchs mit CM-Luc besser als mit normalem TUM Medium, sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur. Jedoch zeigte sich auch unter Einfluss von eigenem konditioniertem Medium (CM-IIE) ein erhöhtes Wachstum. Diese Befunde könnten dafür sprechen, dass die Produktion des wachstumsfördernden Faktors bei ITGB4-KD nicht vollkommen ausgeschaltet ist und diese Zellen den Botenstoff über einige Tage hinweg in ihrem Medium anreichern können. Eine andere Möglichkeit ist, dass die KD-Zellen auf die Expression eines alternativen Faktors wechseln, welcher unabhängig von ITGB4 ist, um ihr Überleben zu sichern. In den 2D-Kulturen wuchsen beide Zelllinien unter TUM-Medium am langsamsten. Dies war bei den KD-Zellen jedoch weitaus kennzeichnender als bei der Luc-Kontrolle. Auch hier wäre die Erklärung der verminderten Expression des Faktors bei den KD-Zellen sinnvoll. Für die Luc-Zellen ist es scheinbar unerheblich, welche Mengen des Faktors sich in dem Medium befinden, da diese Zellen eine ausreichende Konzentration des Faktors schnell selbst produzieren können. Da aber auch bei den Luc-Zellen die Zugabe von konditioniertem Medium von PaCa5061-Luc zu einem erhöhten Wachstum führte, liegt es nahe, dass die Zellen in frischem Medium erst eine ausreichende Menge des Faktors abgeben müssen, bis dieser eine Wirkung zeigt.

Um die Proliferation der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Dabei kam auch ein „*Cell Proliferation Kit II*“ zum Einsatz, um PaCa5061-Luc und -shITGB4 zu vergleichen. Die Zellen zeigten im XTT-Assay, bei dem die Zellen nahezu konfluent vorliegen, keine Unterschiede in ihrer Proliferation, jedoch sind signifikante Unterschiede in der resultierenden Zellzahl nach initial dünner Saat beobachtet worden. Dies spricht zusätzlich für einen auto-/parakrinen Faktor, auf den die ITGB4-KD Zellen angewiesen sind, da dieser auto-/parakrine Faktor bei stärkerer Vereinzelung der Zellen geringer konzentriert ist als bei (sub)konfluenter Kultivierung.

4.4 Intrazelluläre Signaltransduktion

Nachdem eine Verringerung der SDF-1-Produktion nicht zur Erklärung der vermehrten Apoptose in den ITGB4-KD-Tumoren herangezogen werden konnte, war das nächste Ziel dieser Arbeit, einen umfassenderen Blick auf die durch den ITGB4-KD bzw. den Selektin-KO ausgelösten Änderungen im *signaling* der Tumorzellen zu werfen. Hierzu wurden WB Analysen von Proteinextrakten aus den Xenografttumoren durchgeführt. Für die Interpretation der Ergebnisse ist besonders wichtig, dass der Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen zwischen Kontroll- und ITGB4-KD-Zellen im Bereich von 1 % (Kontrolle) gegenüber 3-5 % (KD) lag. Die Apoptose war also selbst im KD in nicht mehr als einem Zwanzigstel der Primärtumorzellen nachweisbar. Für die Analysen zum *signaling* hingegen wurde die gesamte Tumormasse eingesetzt (WB mit Gesamt-Gewebe-Extrakt), so dass Änderungen im Expressionsniveau einzelner Signalmoleküle eher auf eine Anpassung der vitalen, nicht-apoptotischen Tumorzellen an Unterschiede der Wachstumsbedingungen (ITGB4- bzw. Selektin-Status) hindeuten.

Insofern zeigen die WB-Ergebnisse mutmaßlich viel mehr die schon vorhandenen „Resistenzmechanismen“ (gegen den ITGB4-KD bzw. den Selektin-KO) als diejenigen Vorgänge, die ursprünglich für die Wachstumsverzögerung verantwortlich waren.

Die WB-Ergebnisse legen nahe, dass das Tumorstadium in Abhängigkeit vom ITGB4- und insbesondere auch vom Selektin-Status über intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst wird. So zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expression von bspw. pmTOR, pFAK, pGSK3 β , HER2 und pSrc im Selektin-KO. Diese bekannten Signalproteine spielen eine zentrale Rolle für das Wachstum von Zellen. Der Anteil Ki-67-positiver Zellen war dabei im Selektin-KO nicht erhöht gegenüber der WT-Kontrolle, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die genannten Änderungen in den Signalmolekülen ein Wachstumsdefizit, das allein durch den Selektin-KO hervorgerufen wird, kompensieren. Folglich ist das Überleben der Selektin-KO-Mäuse unverändert.

Zum Zeitpunkt der Tumorentstehung könnte der ITGB4-KD diese Anpassung erschweren bzw. unterbinden. Das bedeutet, dass der ITGB4-KD möglicherweise diejenigen Signalwege unterdrückt, die im Selektin-KO bei der Tumorentstehung heraufreguliert werden. Diese Hypothese könnte man prüfen, indem die Tumore kurze Zeit nach Injektion in das s.c. Stroma isoliert, eingebettet und histologisch untersucht werden.

Ferner wäre es im nächsten Schritt dringend erforderlich, die Wirksamkeit bspw. eines mTOR-/ Akt- oder FAK-Inhibitors (allesamt verfügbar) auf das Wachstum von PaCa5061-Zellen (mit normalem ITGB4-Status) in WT- und Selektin-KO-Mäusen zu vergleichen. Die Inhibitoren müssten dabei besonders in Selektin-KO-Mäusen wirksam sein. Vorrangig interessant wäre eine Inhibition der FAK, da diese im Selektin-KO aktiver, im ITGB4-KD jedoch tendenziell weniger aktiv ist.

Die Proteine, für die signifikante Unterschiede im WB gesehen wurden (HER2, FAK, GSK3 β , Akt, mTOR und Src), können direkt oder indirekt durch ITGB4 beeinflusst werden (Chung et al. 2002, Cross et al. 1995, Gambaletta et al. 2000, Guo et al. 2006, Merdek et al. 2007, Mitra und Schlaepfer 2006, Shaw et al. 1997). Somit könnte ein ITGB4-KD die nachgewiesene Aktivierung dieser Proteine im Selektin-KO behindern. In der immunhistochemischen Färbung gegen ITGB4 ist ein unvollständiger KD in Selektin-KO Mäusen sichtbar (siehe 3.4). Das könnte dafür sprechen, dass die Zellen trotz der shRNA die ITGB4-Produktion wegen des Selektin-KO in der Umgebung erhöhen. Diese Ineffektivität der shRNA (bei gleichzeitig sehr guter Effektivität in WT-Mäusen) deutet an, dass die intrinsische ITGB4-Expression deutlich gesteigert ist, was jedoch aufgrund von $n = 2$ (in der Gruppe shITGB4/Select) nicht suffizient untersucht werden konnte. *Ex vivo* Analysen mittels Durchflusszytometrie an Prostata-Xenografttumoren haben gezeigt, dass der Anteil ITGB4-positiver Tumorzellen im Selektin-KO (Luc/SELECT) gegenüber Luc/WT ebenfalls signifikant erhöht war (Daniela Schetler).

Bei den Signaltransduktionswegen, die durch ITGA6B4 beeinflusst werden steht die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) am Anfang der Signalkaskaden und stellt somit ein zentrales Signalprotein *downstream* von ITGB4 dar. Eine entsprechende Analyse der PI3-K-Aktivität an Tumorlysaten und Zelllinien (z.B. mittels ELISA) ist für weitere Experimente zu empfehlen. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass ITGA6B4 effektiver in der Lage ist die PI3K zu aktivieren als andere Integrine (Nguyen et al. 2000). Funktionell ist bekannt, dass eine Hemmung der PI3-K durch LY294002 (PI3-K Inhibitor) das Zellüberleben und die Ausbildung von Kolonien in 3D assays beeinträchtigt (Dutta und Shaw 2008). Diese Beobachtung passt sehr gut zu den Befunden zum Zellwachstum nach ITGB4-KD.

Shaw et. al. konnten 2001 einen Tyrosinrest (Y1494) in der zytoplasmatischen Domäne des ITGA6B4 identifizieren, welcher es dem Integrin ermöglicht, die PI3-Kinase

zu aktivieren und darüber das Überleben und die Invasivität der Karzinomzellen *in vitro* zu regulieren (Shaw et al. 1997, Bachelder et al. 2001, Dutta und Shaw 2008). Um den Einfluss dieses Tyrosinrestes auszumachen, wurden humane Brustkrebszellen mit einer Punktmutation (Y1494F) für Mausversuche genutzt. Zellen, die die Wildtyp- β 4-Untereinheit bzw. einen leeren Kontrollvektor exprimierten, bildeten in 90% bis 95% der Mäuse Tumoren aus. Im Gegensatz dazu bildeten bei den Mäusen, denen Y1494F- β 4 Zellen injiziert worden waren, nur in 25% der Tiere Tumore (Dutta und Shaw 2008). Ferner transfizierten Shaw *et al.* MDA-MB-435 Zellen (humane Brustkrebszellen) mit einer konstitutiv exprimierten PI3-K (Myr-p110-Myc) und verglichen die Invasivität dieser Zellen mit denen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Es zeigte sich eine 2-fach erhöhte Invasivität *in vitro* (Shaw et al. 1997).

Es gibt diverse Signalwege, die über die PI3-K vermittelt werden. Einer davon ist eine durch MAPK und PI3-K/Akt vermittelte Phosphorylierung von pro-apoptotischem Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), welche durch eine Integrinbindung ausgelöst wird. Diese sorgt für eine Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Bim und verhindert somit die Apoptoseinduktion (Qi et al. 2006). Als Konsequenz ergibt sich daraus, dass bei fehlendem Kontakt zwischen Integrin und ECM die Phosphorylierung inhibiert wird, Bim akkumuliert und seine pro-apoptotische Wirkung entfalten kann (Cheng et al. 2001). Das steht in direktem Zusammenhang mit den gemachten Beobachtungen zur Apoptose der Zellen bei ITGB4-KD. Da ITGA6B4 wie oben beschrieben die PI3-K aktiviert, könnte man allein über diesen Weg einen kausalen Zusammenhang schlussfolgern (siehe auch 4.5 mit Abb. 24). PI3-K war in den initialen WB Analysen der Signalmoleküle nicht enthalten und sollte für weitere Untersuchungen nachgeholt werden.

Des Weiteren spielen in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion FAK, Integrin-linked Kinase (ILK), Src und das Adapterprotein Shc eine wichtige Rolle, um einen Schutz vor *anoikis* zu erreichen (Chiarugi und Giannoni 2008). Die Aktivität von FAK- und Src in den Xenografttumoren (gemessen am pFAK- und pSrc-Gehalt) war im ITGB4-KD tendenziell reduziert, jedoch nicht statistisch signifikant verringert. Ein Zusammenhang mit der nachweisbaren Erhöhung apoptotischer Zellen in den ITGB4-KD-Tumoren lässt sich also nur andeuten (wie oben erwähnt ist jedoch zu beachten, dass signifikante Änderungen im pSrc/pFAK-Niveau in den einzelnen der Apoptose geweihten Zellen möglicherweise in der Gesamt-Tumormasse untergehen). Im Ge-

gensatz hierzu waren beide Phospho-Proteine im Selektin-KO signifikant erhöht. Die Proteine, die laut Chiarugi und Giannoni für eine *anoikis*-Resistenz mitverantwortlich sind, werden also bei Selektindefizienz vermehrt exprimiert. Folglich ist der Anteil apoptotischer Zellen in der Gruppe Luc/Select nicht erhöht. Bei nun zusätzlich vorhandenem ITGB4-KD sind die Zellen möglicherweise nicht mehr in der Lage, diese Mechanismen der *anoikis*-Resistenz aufrechtzuerhalten.

4.5 VEGF als autokriner Wachstumsfaktor

Der Verlust des Integrin-ECM-Kontakts führt epitheliale Zellen physiologischerweise in die Apoptose (*anoikis*). Die Veränderung des Expressionsmusters von Integrinen könnte die Krebszellen daher vor der *anoikis* schützen. Ein KD dieser Integrine würde den Krebszellen diese Möglichkeit zur „*anoikis*-Resistenz“ entziehen. Zusätzlich könnten Integrine, und aufgrund seiner strukturellen Besonderheiten vor allem ITGA6B4, auch über diverse Signaltransduktionswege Einfluss nehmen auf die Expression und/oder Sekretion von bspw. Zytokinen, die ebenfalls einen Einfluss auf die Modulation der *anoikis* haben.

In bisherigen Versuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich tatsächlich ein Einfluss von ITGB4 auf die Produktion von SDF-1 (Daniela Schetler), jedoch konnten die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit mit Zellen des Adenokarzinoms des Pankreas (PaCa5061) nicht reproduziert werden. Ein anderer und für die Beobachtungen interessanter Faktor könnte der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sein, der als Signalprotein an die Tyrosinkinaserzeptoren VEGF-R bindet und so eine Angiogenese bewirken kann. Interessant ist VEGF, da ITGA6B4 tatsächlich über noch unzureichend definierte Signalkaskaden die Genexpression beeinflussen kann, indem es die Translation von Zytokinen wie VEGF über den PI3-K/mTOR Signalweg stimuliert (Bachelder et al. 2001, Burnett et al. 1998, Chung et al. 2002, Gambaletta et al. 2000, Mercurio et al. 2004). VEGF kann über einen autokrinen Mechanismus das Wachstum und die Migration von Krebszellen stimulieren. Somit hat ITGA6B4 über die Regulation von VEGF bedeutende Auswirkungen für die Bildung von autokrinen Signalwegschleifen, welche *anoikis* und Apoptose der Zellen beeinflussen könnten (Mercurio et al. 2004). Zudem spielt die VEGF-Translation, welche durch ITGA6B4 reguliert wird, eine wichtige Rolle für das Überleben von Mammakarzinomzellen, in-

dem es einen autokrinen VEGF-Signalweg aufrechterhält, der die Aktivierung des PI3-K/Akt Signalweges bewirkt und die Expression von CXCR4 induziert (Bachelder et al. 2001, Bachelder et al. 2002, Chung et al. 2002).

Ferner konnte in Versuchen an humanen Brustkrebszellen der durch ITGA6B4 vermittelte Überlebensvorteil (verminderte Apoptose) *in vitro* mithilfe der Reduktion der VEGF-Expression aufgehoben werden (Chung et al. 2002). Zudem zeigte sich, dass der Tyrosinrest Y1494 im ITGA6B4 essentiell für die Regulation der VEGF-Expression ist (Dutta und Shaw 2008, Lipscomb und Mercurio 2005). Dies sind wichtige Beobachtungen, welche auch die Ergebnisse dieser Arbeit erklären könnte. Hierfür sollte als nächstes untersucht werden, ob der ITGB4-KD in den analysierten Pancreaskarzinomzellen tatsächlich eine Reduktion der VEGF-Produktion/Sekretion bewirkt.

Ein Weg, wie Integrine die Expression von VEGF beeinflussen können, ist die Interaktion mit Translationsproteinen. ITGA6B4 ist in der Lage, die Phosphorylierung von 4E-binding protein 1 (4E-BP1) zu stimulieren und damit die Inaktivierung dieses Proteins herbeizurufen. Da das 4E-BP1 ein Translationsrepressor ist und die Funktion des *eukaryotic translation initiation factor* 4E (eIF-4E) inhibiert, wird so durch die Aktivität von ITGB4 die Translation gefördert. Die Regulation der Phosphorylierung von 4E-BP1 durch ITGA6B4 wird durch die Fähigkeit erreicht, den PI3-K/Akt Signalweg und damit die Kinase mTOR zu aktivieren. Die Kinase mTOR kann anschließend 4E-BP1 phosphorylieren und so Einfluss auf die Translation von VEGF nehmen (siehe Abb. 24) (Burnett et al. 1998, Chung et al. 2002, De Benedetti und Harris 1999, Dennis et al. 1999, McKendrick et al. 1999). Die Ergebnisse im WB (siehe 3.6) zeigten, dass das mTOR-signaling der PaCa5061-Luc-Zellen insbesondere im Selektin-KO gesteigert war. Denkbar ist, dass bei ITGB4-KD zum Zeitpunkt der Tumorinitiation diese Steigerung im mTOR-signaling behindert ist und dass deshalb das Tumorstwachstum bei Kombination von ITGB4-KD und Selektin-KO so deutlich reduziert war.

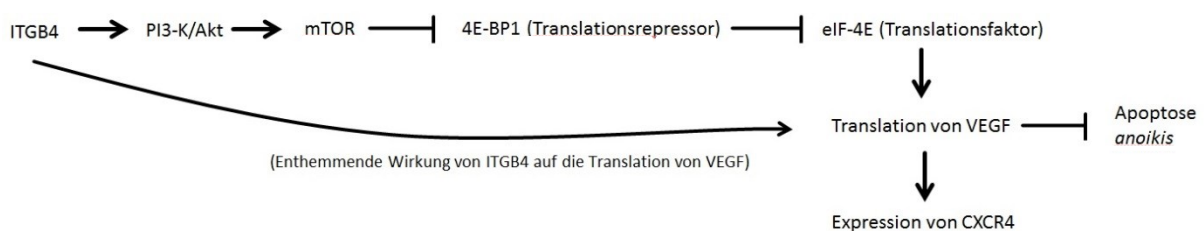


Abb. 24: Signalweg, über den ITGB4 vermutlich die Translation von VEGF beeinflusst.

4.6 Tumorassoziierte Makrophagen

Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) sind Makrophagen, welche sich in direkter Nachbarschaft zu Tumoren oder innerhalb dieser befinden. Diese TAM können die Tumorentwicklung beeinflussen.

Leukozyten, zu denen die TAM gehören, benötigen E- und P-Selektine, um den Blutstrom verlassen zu können und in entzündete Gewebe einwandern zu können (siehe 1.2). Daher können vermutlich weniger TAM in den sich entwickelnden Tumor einwandern, wenn ein Selektin-KO vorhanden ist. Angesichts der existierenden Literatur kann angenommen werden, dass diese TAM ein wachstumsförderndes Signal liefern (Mantovani 1990). Sollte dieses Signal aufgrund der verminderten Einwanderung von TAM beim Selektin-KO fehlen, könnten die Zellen selbst Signalmoleküle wie FAK, mTOR, GSK3 β , Akt und Src heraufregulieren. Wenn die Tumorzellen dies durch den ITGB4-KD nicht mehr können, da ITGB4 möglicherweise genau diese Moleküle reguliert, benötigen sie mehr Zeit für ihr Wachstum oder können gar keine Tumore mehr bilden. Für dieses pathophysiologische Erklärungsmodell sprechen die Ergebnisse der WB-Analysen (zu beachten sind vor allem die gegensätzlichen Änderungen im pFAK-Niveau). Ferner ist denkbar, dass der ITGB4-KD zu einer erhöhten Anzahl von TAM führt, weil der tumor-fördernde Einfluss der TAM benötigt werden könnte, um die durch den ITGB4-KD vermehrte *anoikis* zu überleben. Dieser Effekt könnte dann wiederum im Selektin-KO unterbleiben, weil Selektine benötigt werden, damit Leukozyten den Blutstrom verlassen.

Hinweise, die für diese Hypothese sprechen, gibt es bereits für Prostatakarzinomzellen. An wenige Tage alten s.c. Xenografttumoren der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 konnte nach ITGB4-KD eine vermehrte Infiltration des Tumorbetts mit CD45-positiven Leukozyten nachgewiesen werden. In Selektin-KO Mäusen konnte diese vermehrte Infiltration nicht gezeigt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe, Doktorarbeit von Sandra Hanika). Bei den CD45-positiven Leukozyten könnte es sich um TAM handeln.

Solche Analysen zu der Zusammensetzung des Tumorstromas in WT- und Selektin-KO-Mäusen nach ITGB4-KD bzw. unter Kontrollbedingungen müssten dringend auch mit PaCa5061-Zellen durchgeführt werden. Vielleicht ließe sich die pathophysiologische Erklärung des beobachteten Synergismus aus ITGB4-KD und Selektin-KO hierdurch um die Dimension der möglicherweise veränderten Zusammensetzung der Tumorbegleitzellen (TAM) erweitern.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu erklären, weshalb eine Depletion von Integrin $\beta 4$ (ITGB4) auf humanen Pankreasadenokarzinomzellen zu einer Wachstumsverzögerung in Xenograft-Mausmodellen führt, insbesondere dann, wenn die Versuchstiere E- und P-Selektin-defizient sind (wohingegen die Selektindefizienz allein keinen wachstumsverzögernden Effekt hatte). Daher sollte der Einfluss des ITGB4 auf die Proliferation und Apoptose der Zellen untersucht werden. Zudem war bereits für das humane Prostatakarzinom das Chemokin SDF-1 identifiziert worden, über das ITGB4 das Wachstum regulieren könnte. Daher sollte auch der Einfluss von SDF-1 auf Pankreaskarzinomzellen im Kontext mit ITGB4 untersucht werden.

In vitro konnte durch den ITGB4-KD eine bis zu 85%ige Wachstumseinschränkung der Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5061 erreicht werden. Je besser der KD, desto schlechter das Wachstum der Zellen. Auch unter 3D-Wachstumsbedingungen zeigte sich eine verminderte Kolonienformation bei ITGB4-KD. Durch Kultivierung der Zellen in konditioniertem Medium (CM) zeigte sich eine Steigerung des Zellwachstums unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen. Insbesondere profitierten die ITGB4-KD-Zellen vom CM der Kontrollzellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Tumorzellen selbst lösliche Faktoren abgeben, welche das Wachstum der Zellen über einen auto- oder parakrinen Mechanismus steigern. ITGB4 scheint an der Regulation der Synthese oder Sekretion dieser Faktoren beteiligt zu sein. Anders als bei den Analysen mit Prostatakarzinomzellen stellte sich heraus, dass in den PaCa5061 Xenografts SDF-1 nicht der verantwortliche Faktor ist. Durch Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass es in den ITGB4-KD Xenografttumoren zur vermehrten Apoptose kam. Eine verminderte Proliferation der Zellen konnte anhand von Ki-67-Färbungen nicht beobachtet werden. Western Blot Analysen der Xenografttumore zeigten, dass der ITGB4-KD und die Selektindefizienz Auswirkungen auf das mTOR-, HER2- und FAK-*signaling* haben. Ein Faktor, der für die gemachten Beobachtungen verantwortlich sein könnte, ist der vascular endothelial growth factor (VEGF). Da die Expression dieses Faktors auch über das ITGB4 *downstream signaling* (mTOR, HER2, FAK) reguliert wird, ist es plausibel, dass das Wachstum durch VEGF beeinflusst wird. Weitere Forschung ist jedoch notwendig, um exakt zu identifizieren, welche ITGB4-abhängigen Faktoren im Medium wachstumfördernd sind und weshalb diese Faktoren im Selektin-*knockout* so wichtig werden.

6 Abstract

The aim of this thesis was to clarify why a depletion of integrin $\beta 4$ (ITGB4) on human pancreatic adenocarcinoma cells leads to a delayed growth in xenograft-mousemodels, particularly when the mice were e- and p-selectin deficient (whereas a selectin-deficiency alone didn't lead to a delayed growth). Thus it was proposed to study the effect of ITGB4 on the proliferation and apoptosis of the cells. Furthermore a chemokine SDF-1 was identified that could be responsible for the regulation of growth by ITGB4 in prostatic carcinoma cells, so that the effect of SDF-1 on pancreatic adenocarcinoma cells in context with ITGB4 should be studied.

An ITGB4-knockdown (KD) lead to a growth-reduction of up to 85% in the pancreatic adenocarcinoma cellline PaCa5061. The higher the KD was, the lower was the growth of the cells. Even under 3D conditions a reduced colonyforming was observable. By cultivation of the cells in conditioned medium (CM) the growth under 2D and 3D conditions was increased. The greatest profit in cellgrowth was seen in ITGB4-KD-cells with CM of control-cells. This leads to the conclusion that the cancer cells secrete soluble factors, which increase the growth by an auto- or paracrine mechanism. ITGB4 seems to be involved in the regulation of the synthesis of these factors. In contrast to the observations in prostatic carcinoma cells, SDF-1 is not the responsible factor in PaCa5061 xenografts. Through immunohistochemistry it was shown that the ITGB4-KD xenografts had an increased rate of apoptosis. A reduced proliferation by staining against Ki-67 was not verifiable. WB analysis of the xenografttumors showed an effect of ITGB4-KD and selectin-deficiency on the mTOR-, HER2- and FAK-signaling. One factor that could be responsible for the observations is the vascular endothelial growth factor (VEGF). Because the expression of this factor is regulated by the ITGB4 downstream signaling (mTOR, HER2, FAK), it is plausible that the growth is effected by VEGF. Further research is necessary to identify which ITGB4-associated factors in the medium are promoting growth and why these factors become so important in the selectin-knockout.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP1	<i>eIF-4E-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CM	<i>conditioned medium</i> , konditioniertes Medium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTC	<i>circulating tumorcell</i> , zirkulierende Tumorzelle
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12, auch SDF1
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, auch <i>stromal cell-derived factor 1 eceptor</i> (SDF-1-Rezeptor)
d	Tag
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTC	<i>disseminated tumorcell</i> , disseminierte Tumorzelle
DTT	Dithiothreitol
E- / P-Selektin	Endothelzell- / platelet-Selektin
ECM	<i>extracellular matrix</i> , Extrazelluläre Matrix (auch EZM)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
eIF-4E	<i>eucaryotic translation initiation factor 4E</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
GSK3b	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , erb-B2, c-erbB2
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
HSC70	<i>heat shock cognate 70</i>
i.p.	intraperitoneal
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IPMN	<i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
ITGA6B4	Integrin α6β4
ITGB4	Integrin β4 Untereinheit
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KD	<i>knockdown</i>
Ki-67	Antigen Ki-67 (Ki – Kiel)
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
m	Meter
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCN	<i>mucinous cystic neoplasm</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaN ₃	Natriumazid
NaPPi	Natriumpyrophosphat
NICE	<i>National Institute for Health and Care Excellence</i>
NP40	Nonylphenoxypropylpolyethoxyethanol
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , Adenokarzinom des Pankreas (Synonym mit Pankreaskarzinom verwendet)
pFAK	<i>focal adhesion kinase</i> (phosphoryliert)

pH2AX	Histon H2AX (phosphoryliert)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDF-1/CXCL12	<i>stromal cell-derived factor 1α</i> / CXC-Motiv-Chemokin 12
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (= Natriumlaurylsulfat)
Shc	Src homology and collagen
shITGB4	Zelllinie mit ITGB4-knockdown durch Expression von shRNA
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
Src	auch c-Src, Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TC-Platte	<i>treated cell culture</i> Platte
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	<i>vascular epithelial growth factor</i>
vs	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XTT	Tetrazolium-Salz

8 Literaturverzeichnis

Alanko J, Mai A, Jacquemet G, Schauer K, Kaukonen R, Saari M, Goud B, Ivaska J (2015) Integrin endosomal signalling suppresses anoikis, *Nat Cell Biol.* 17(11):1412-21.

Altekruse S, Kosary C, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H (2010) SEER cancer statistics review, 1975-2007, Bethesda, MD: National Cancer Institute. 7(

Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM (2001) Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Neuro-pilin-expressing Breast Carcinoma Cells, *Cancer Res.* 61(15):5736-40.

Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM (2002) Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Breast Carcinoma Invasion in an Autocrine Manner by Regulating the Chemokine Receptor CXCR4, *Cancer Res.* 62(24):7203-6.

Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhäusl W (1995) High-Glucose–Triggered Apoptosis in Cultured Endothelial Cells, *Diabetes.* 44(11):1323.

Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 95(4):1432-7.

Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial, *Journal of Clinical Oncology.* 15(6):2403-13.

Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC (2002) Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer.* 2(8):563-72.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis, *Molecular Cell*. 8(3):705-11.

Chiarugi P, Giannoni E (2008) Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells, *Biochemical Pharmacology*. 76(11):1352-64.

Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM (2002) Integrin ($\alpha 6 \beta 4$) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells, *The Journal of Cell Biology*. 158(1):165-74.

Cross DaE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature*. 378(6559):785-9.

Danen EH, Van Muijen GN, Ruiter DJ (1995) Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma, *Cancer Surv*. 24(43-65).

Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, Yung R, Parmigiani G, Dorsch M, Peacock CD, Watkins DN (2009) A Primary Xenograft Model of Small Cell Lung Cancer Reveals Irreversible Changes in Gene Expression Imposed by Culture In-Vitro, *Cancer Res*. 69(8):3364.

De Benedetti A, Harris AL (1999) eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31(1):59-72.

Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G (1999) Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation, *Current Opinion in Genetics & Development*. 9(1):49-54.

Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grutzmann R (2014) Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN, *Biomed Res Int*. 2014(474905).

Ducreux M, On Behalf of The EGC, Cuhna AS, On Behalf of The EGC, Caramella C, On Behalf of The EGC, Hollebecque A, On Behalf of The EGC, Burtin P, On Behalf of The EGC, Goéré D, On Behalf of The EGC, Seufferlein T, On Behalf of The EGC, Haustermans K, On Behalf of The EGC, Van Laethem JL, On Behalf of The EGC, Conroy T, On Behalf of The EGC, Arnold D, On Behalf of The EGC (2015) Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†, *Annals of Oncology*. 26(suppl_5):v56-v68.

Dutta U, Shaw LM (2008) A key tyrosine (Y1494) in the beta4 integrin regulates multiple signaling pathways important for tumor development and progression, *Cancer Res*. 68(21):8779-87.

Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(15):8806-11.

Evans DB, Abbruzzese JL, Rich T (1997) Cancer of the pancreas, *Cancer: principles and practice of oncology*. 6(1126-61).

Fidler IJ (1999) Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 43(1):S3-S10.

Frisch SM, Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis, *Current Opinion in Cell Biology*. 9(5):701-6.

Gambaletta D, Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, Falcioni R (2000) Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion, *Journal of Biological Chemistry*. 275(14):10604-10.

Gebauer F, Wicklein D, Stubke K, Nehmann N, Schmidt A, Salamon J, Peldschus K, Nentwich MF, Adam G, Tolstonog G, Bockhorn M, Izbicki JR, Wagener C, Schu-

macher U (2013) Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp^{-/-}/rag2^{-/-} mice, *Gut*. 62(5):741-50.

Gill BJ, West JL (2014) Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology, *Journal of Biomechanics*. 47(9):1969-78.

Gout S, Tremblay P-L, Huot J (2008) Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis, *Clinical & Experimental Metastasis*. 25(4):335-44.

Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis", *Apoptosis*. 7(3):247-60.

Groves RW, Allen MH, Barker JNWN, Haskard DO, Macdonald DM (1991) Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation, *British Journal of Dermatology*. 124(2):117-23.

Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, Giancotti FG (2006) β 4 Integrin Amplifies ErbB2 Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis, *Cell*. 126(3):489-502.

Heinemann V, Labianca R, Hinke A, Louvet C (2007) Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study, *Annals of Oncology*.

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes Dev*. 20(10):1218-49.

Hogervorst F, Kuikman I, Von Dem Borne AE, Sonnenberg A (1990) Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain, *EMBO J.* 9(3):765-70.

Howlander N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse S, Kosary C, Yu M RJ, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis D, Chen H, Feuer E, (Eds) CK (2016) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013,

Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE (2000) Genetic Progression in the Pancreatic Ducts, *The American Journal of Pathology.* 156(6):1821-5.

Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M (2007) Precursors to pancreatic cancer, *Gastroenterol Clin North Am.* 36(4):831-49, vi.

Hynes RO (2002) Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, *Cell.* 110(6):673-87.

Jae-Gahb P, Jin PY, T. WJ, F.A. VH (1999) Gene-environment interaction in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with implications for diagnosis and genetic testing, *International Journal of Cancer.* 82(4):516-9.

Juliano RL, Varner JA (1993) Adhesion molecules in cancer: the role of integrins, *Current Opinion in Cell Biology.* 5(5):812-8.

Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010, 9(9):1-51.

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S (2017) Krebs in Deutschland 2013/2014, 11(11):1-51.

Kalinina T, Gungor C, Thieltges S, Moller-Krull M, Penas EMM, Wicklein D, Streichert T, Schumacher U, Kalinin V, Simon R, Otto B, Dierlamm J, Schwarzenbach H, Effen-

berger KE, Bockhorn M, Izbicki JR, Yekebas EF (2010) Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung, *BMC Cancer*. 10(295):1-13.

Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K (2000) Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins, *Journal of Cell Science*. 113(5):869-76.

Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U (2009) E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung, *Br J Cancer*. 102(3):602-9.

Laferrière J, Houle F, Huot J (2004) Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin $\beta 4$, *Clinical & Experimental Metastasis*. 21(3):257-65.

Li DH, Xie KP, Wolff R, Abbruzzese JL (2004) Pancreatic cancer, *Lancet*. 363(9414):1049-57.

Li X-L, Liu L, Li D-D, He Y-P, Guo L-H, Sun L-P, Liu L-N, Xu H-X, Zhang X-P (2017) Integrin $\beta 4$ promotes cell invasion and epithelial-mesenchymal transition through the modulation of Slug expression in hepatocellular carcinoma, *Scientific Reports*. 7(40464).

Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL (2000) Pancreatic cancer: State-of-the-art care, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 50(4):241-68.

Lipscomb E, Mercurio A (2005) Mobilization and activation of a signaling competent $\alpha 6 \beta 4$ integrin underlies its contribution to carcinoma progression, *Cancer Metastasis Rev*. 24(3):413-23.

Lipscomb EA, Simpson KJ, Lyle SR, Ring JE, Dugan AS, Mercurio AM (2005) The $\alpha 6 \beta 4$ Integrin Maintains the Survival of Human Breast Carcinoma Cells In vivo, *Cancer Res*. 65(23):10970-6.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT, *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-75.

Lu C, Zhu F, Cho Y-Y, Tang F, Zykova T, Ma W-Y, Bode AM, Dong Z (2006) Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3, *Molecular cell*. 23(1):121-32.

Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH (2005) Precursors to invasive pancreatic cancer, *Adv Anat Pathol*. 12(2):81-91.

Mantovani A (1990) Tumor-associated macrophages, *Current Opinion in Immunology*. 2(5):689-92.

Mckendrick L, Pain VM, Morley SJ (1999) Translation initiation factor 4E, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31(1):31-5.

Mercurio AM, Rabinovitz I (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the $\alpha 6 \beta 4$ integrin, *Seminars in cancer biology*. 11(2):129-41.

Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM (2001) The $\alpha 6 \beta 4$ integrin and epithelial cell migration, *Current Opinion in Cell Biology*. 13(5):541-5.

Mercurio AM, Bachelder RE, Bates RC, Chung J (2004) Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the $\alpha 6 \beta 4$ integrin, *Seminars in cancer biology*. 14(2):115-22.

Merdek KD, Yang X, Taglienti CA, Shaw LM, Mercurio AM (2007) Intrinsic Signaling Functions of the $\beta 4$ Integrin Intracellular Domain, *Journal of Biological Chemistry*. 282(41):30322-30.

Mitra SK, Schlaepfer DD (2006) Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells, *Current Opinion in Cell Biology*. 18(5):516-23.

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, *J Clin Oncol.* 25(15):1960-6.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW (2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer, *N Engl J Med.* 350(12):1200-10.

Nguyen BP, Gil SG, Carter WG (2000) Deposition of Laminin 5 by Keratinocytes Regulates Integrin Adhesion and Signaling, *Journal of Biological Chemistry.* 275(41):31896-907.

O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM (1998) Release of cAMP Gating by the $\alpha 6 \beta 4$ Integrin Stimulates Lamellae Formation and the Chemotactic Migration of Invasive Carcinoma Cells, *The Journal of Cell Biology.* 143(6):1749-60.

Oettle H, Sinn M (2010) Chemotherapie beim Pankreaskarzinom. In: *Hepatobiliäre und Pankreastumoren.* (Hrg.) Springer Berlin Heidelberg, 380-5.

Pantel K, Alix-Panabieres C (2007) The clinical significance of circulating tumor cells, *Nat Clin Prac Oncol.* 4(2):62-3.

Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1833(12):3481-98.

Qi X-J, Wildey GM, Howe PH (2006) Evidence That Ser87 of BimEL Is Phosphorylated by Akt and Regulates BimEL Apoptotic Function, *Journal of Biological Chemistry.* 281(2):813-23.

Rabinovitz I, Mercurio AM (1997) The integrin alpha 6 beta 4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures, *Mol. Biol. Cell.* 8(15):33-41.

Richter U, Wicklein D, Geleff S, Schumacher U (2012) The interaction between CD44 on tumour cells and hyaluronan under physiologic flow conditions: implications for metastasis formation, *Histochemistry and Cell Biology.* 137(5):687-95.

Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen GM, Bondy ML, Gallinger S, Schwartz AG, Syngal S, Cote ML, Axilbund J, Schulick R, Ali SZ, Eshleman JR, Velculescu VE, Goggins M, Vogelstein B, Papadopoulos N, Hruban RH, Kinzler KW, Klein AP (2012) *ATM*; Mutations in Patients with Hereditary Pancreatic Cancer, *Cancer Discovery.* 2(1):41.

Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139, *The Journal of biological chemistry.* 275(13):9390-5.

Saiki Y, Horii A (2014) Molecular pathology of pancreatic cancer, *Pathol Int.* 64(1):10-9.

Schmid RM (2006) Pancreatic cancer, *Praxis.* 95(44):1709-12.

Schulte N (2013) Epidemiologie und Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. In: *Erkrankungen des Pankreas.* Hans G. Beger, Markus W. Büchler, Henning Dralle, Markus M. Lerch, Peter Malfertheiner, Joachim Mössner, Jürgen F. Riemann (Hrg.) Springer Berlin Heidelberg, 334-9.

Shaib Y, Davila J, Naumann C, El-Serag H (2007) The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study, *Am J Gastroenterol.* 102(7):1377-82.

Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HHF, Toker A, Mercurio AM (1997) Activation of Phosphoinositide 3-OH Kinase by the $\alpha 6\beta 4$ Integrin Promotes Carcinoma Invasion, *Cell*. 91(7):949-60.

Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijl JHG, Bakkevold KE, Takada T, Amano H, Neoptolemos JP (2005) Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer, *British Journal of Cancer*. 92(8):1372-81.

Strobel O, Werner J (2013) Langzeitverlauf nach operativer Tumorentfernung und Chemotherapie des duktales Pankreaskarzinoms. In: *Erkrankungen des Pankreas*. Hans G. Beger, Markus W. Büchler, Henning Dralle, Markus M. Lerch, Peter Malfertheiner, Joachim Mössner, Jürgen F. Riemann (Hrg.) Springer Berlin Heidelberg, 415-20.

Tennenbaum T, Weiner AK, Belanger AJ, Glick AB, Hennings H, Yuspa SH (1993) The Suprabasal Expression of $\alpha 6\beta 4$ Integrin Is Associated with a High Risk for Malignant Progression in Mouse Skin Carcinogenesis, *Cancer Res*. 53(20):4803-10.

Valastyan S, Weinberg Robert a (2011) Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms, *Cell*. 147(2):275-92.

Van Der Neut R, Krimpenfort P, Calafat J, Niessen CM, Sonnenberg A (1996) Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice, *Nat Genet*. 13(3):366-9.

Vogelstein B, Kinzler KW (2015) The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out, *N Engl J Med*. 373(20):1895-8.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF (2013) Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine, *New England Journal of Medicine*. 369(18):1691-703.

Warshaw AL, Castillo CF-D (1992) Pancreatic Carcinoma, *New England Journal of Medicine*. 326(7):455-65.

Wicklein D, Schmidt A, Labitzky V, Ullrich S, Valent P, Schumacher U (2013) E- and P-Selectins Are Essential for Repopulation of Chronic Myelogenous and Chronic Eosinophilic Leukemias in a Scid Mouse Xenograft Model, *PLOS ONE*. 8(7):e70139.

Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ (2013) Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century, *Lab Invest*. 93(9):970-82.

Wittekind C (1997) Klassifikationen des exokrinen Pankreaskarzinoms, *Visceral Medicine*. 13(suppl 1)(Suppl. 1):1-4.

Wittekind C (2013) Pathohistologische Klassifikation, Tumorstaging und R-Klassifikation des Pankreaskarzinoms. In: *Erkrankungen des Pankreas*. Hans G. Berger, Markus W. Büchler, Henning Dralle, Markus M. Lerch, Peter Malfertheiner, Joachim Mössner, Jürgen F. Riemann (Hrg.) Springer Berlin Heidelberg, 327-33.

Witz IP (2006) The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression, *Immunology Letters*. 104(1):89-93.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher für die freundliche Überlassung des Themas und für die Möglichkeit die Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tobias Lange für die engagierte Betreuung mit Anregungen und Überlegungen zu dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich ihm für die kontinuierliche Unterstützung auch nach Abschluss der Experimente danken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Vera Labitzky danken, die mir durch mehrfache Durchsicht sehr bei der Fertigstellung der Dissertation geholfen hat.

Für die umfassende Unterstützung bei der Ausführung der Laborarbeiten bedanke ich mich bei Hanna Maar und Susanne Feldhaus. Zudem möchte ich mich bei Christine Knies, Jennifer Schröder-Schwarz, Maike Märker und Tobias Gosau bedanken, an welche ich mich jederzeit bei Fragen oder Problemen wenden konnte.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Manfred Jücker für die Möglichkeit Western Blots an seinem Institut durchführen zu können bedanken und bei Dr. Florian Ewald für die freundliche Anleitung hierbei.

Außerdem möchte ich mich zutiefst bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Verlobten Kira bedanken, welche mich während des Studiums und dem Schreiben dieser Dissertation jederzeit unterstützt und motiviert haben.

10 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Erklärung

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: