

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Die Bedeutung von CD44 für die Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms in einem murinen Xenograftmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Benjamin Fritz
aus Riedlingen

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.10.2020**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Daniel Wicklein

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Fragestellung und Hypothese	6
1.2	Pankreaskarzinom	7
1.2.1	Epidemiologie	7
1.2.2	Pathologie	8
1.2.3	Stadieneinteilung	8
1.2.4	Klinik	10
1.2.5	Diagnostik	10
1.2.6	Therapie	11
1.3	Zelladhäsionsmoleküle	13
1.3.1	CD44	13
1.3.2	CD24	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Glaswaren	18
2.1.3	Chemikalien	20
2.1.4	Antikörper	23
2.1.5	Lösungen, Färbungen und Puffer	24
2.1.6	Zelllinien	27
2.1.7	Immundefiziente Tiere	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Histologische Aufarbeitung der Gewebe	28
2.2.1.1	Zuschnitt der Primärtumoren	28
2.2.1.2	Entparaffinierung und Entwässerung	28
2.2.2	Färbungen	28
2.2.2.1	HE-Färbung	28
2.2.2.2	Masson-Goldner-Färbung	29
2.2.2.3	PAS-Färbung	30
2.2.3	Immunhistochemie	31
2.2.3.1	CD44-Färbung	31
2.2.3.2	CD24-Färbung	32

2.2.3.3	CD45-Färbung	32
2.2.4	Auswertung der einzelnen Färbungen	33
2.2.5	Auszählung der Lungenmetastasen	33
2.2.6	Alu-PCR	33
3.	Ergebnisse	36
3.1	Auswertung des Tierversuchs	36
3.1.1	Auswertung für PaCa 5061	36
3.1.2	Auswertung für BxPC3	38
3.2	Auswertung der Alu-PCR	42
3.2.1	Auswertung für PaCa 5061	42
3.2.2	Auswertung für BxPC3	45
3.3	Auswertung der Metastasenzählung	49
3.3.1	Auswertung für PaCa 5061	49
3.3.2	Auswertung für BxPC3	51
3.4	Auswertung der Färbungen	53
3.4.1	HE-Färbung	53
3.4.1.1	HE in den Primärtumoren	53
3.4.1.2	HE in den Lungenmetastasen	63
3.4.2	PAS-Färbung	64
3.4.2.1	PAS in den Primärtumoren	64
3.4.2.2	PAS in den Lungenmetastasen	69
3.4.3	Masson-Goldner-Färbung	72
3.4.3.1	Masson-Goldner in den Primärtumoren	72
3.4.3.2	Masson-Goldner in den Lungenmetastasen	76
3.5	Auswertung der Immunhistochemie	77
3.5.1	Stabilität des Knockdowns	77
3.5.2	CD45-Immunhistochemie	81
3.5.2.1	CD45 in den Primärtumoren	81
3.5.2.2	CD45 in den Lungenmetastasen	85
3.5.3	CD44-Immunhistochemie	90
3.5.3.1	CD44 in den Primärtumoren	90
3.5.3.2	CD44 in den Lungenmetastasen	93
3.5.4	CD24-Immunhistochemie	93
3.5.4.1	CD24 in den Primärtumoren	93

3.5.4.2	CD24 in den Lungenmetastasen	96
4.	Diskussion	97
5.	Zusammenfassung/Summary	102
6.	Abkürzungsverzeichnis	104
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Danksagung	107
9.	Lebenslauf	108
10.	Eidesstattliche Versicherung	109

1. Einleitung

1.1 Fragestellung und Hypothese

Das Pankreaskarzinom des Menschen ist ein maligner Tumor ohne relevante Frühsymptome und dadurch assoziiert mit einer späten Detektion und einer relativ schlechten Prognose. Relevante Symptome entstehen erst bei Durchbruch der Kapsel und Infiltration des umliegenden Gewebes. Dadurch, dass bei Diagnosestellung häufig bereits Lymphknoten- und Fernmetastasen vorhanden sind und somit eine palliative Situation vorliegt, besteht Forschungsrelevanz besonders in der Früherkennung, sowie in der Behandlung einer metastasierten Erkrankung.

In der Fachliteratur ist nach wie vor umstritten, welche Bedeutung eine hohe Expression des Immunglobulin-Superfamilienproteins CD44 (CD = cluster of differentiation) im humanen Pankreaskarzinom besitzt. Ein gezielter gentechnischer Knockdown von CD44 in humanen Pankreaskarzinomzellen und deren Einsatz in einem Tiermodell zur Metastasierung könnte entscheidende Einblicke in die funktionelle Bedeutung des Moleküls für das Primärtumorwachstum und die Metastasierungsfähigkeit geben. Hypothese der Arbeit ist, dass CD44 im Pankreaskarzinom eine funktionelle Rolle für das Tumorwachstum und die Metastasierungsfähigkeit besitzt. Daher wurden mittels shRNA (small hairpin Ribonukleinsäure) humane Pankreaskarzinomzellen der Linien PaCa 5061 und BxPC3 mit 90% Knockdown von CD44 generiert und in einem subkutanen Xenograftmodell in immundefizienten Mäusen eingesetzt. Aufgabe dieser Promotionsarbeit ist die Auswertung dieses Tierexperiments und die Bewertung der Ergebnisse. Jeweils im Vergleich mit Kontrolltieren, welche mit unveränderten Karzinomzellen inokuliert wurden, wurden folgende Auswertungen vorgenommen: mittels qRT-PCR (quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion) wurde die Last an humanen Tumorzellen im Blut und Lunge der Tiere bestimmt. Zudem erfolgte eine histologische Bestimmung der Anzahl und Morphologie der Lungenmetastasen. Die subkutanen Primärtumore und Lungenmetastasen wurden histologisch/immunhistochemisch untersucht. Hierbei sollte zum einen die Stabilität des Knockdowns von CD44 in vivo bestätigt werden, zum anderen sollte die Morphologie der Tumore analysiert werden. Dazu gehörten unter anderem die allgemeine Morphologie und die Bestimmung der Nekroseareale in HE-Färbung, die Auswertung der Stromakomponente in der Masson-Goldner-Färbung, das Vorhandensein der Kohlenhydratstrukturen in der PAS-Färbung und weitere immunhistochemische Färbungen von Primärtumoren und Lungenmetastasen.

1.2 Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreaskarzinom ist die häufigste Variante unter den malignen Pankreastumoren und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Am häufigsten findet es sich im Pankreaskopf (Suttorp et al. 2016). Besonders ungünstig ist die Prognose jedoch, wenn der Tumor im Pankreaskörper oder Pankreasschwanz lokalisiert ist. Dies liegt vor allem daran, dass es in diesen Bereichen zu keinen nennenswerten Frühsymptomen kommt und der Tumor dadurch häufig erst erkannt wird, wenn er bereits in die Umgebung infiltriert hat (Bob und Bob 2013). Bei Diagnosestellung findet sich bei 85-90% der Patienten ein inoperabler Zustand oder es liegen schon Fernmetastasen vor (Suttorp et al. 2016).

1.2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2014 erkrankten insgesamt ungefähr 17.100 Menschen in Deutschland an einem Pankreaskarzinom. Die Letalität liegt nur knapp darunter, was die schlechte Prognose der Erkrankung anzeigt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Frauen bei 10% und für Männer bei 9%. Insgesamt weist das Pankreaskarzinom unter allen Malignomen die niedrigste Überlebensrate auf. Unter allen Krebserkrankungen ist es bei Frauen (8,2%) und Männern (6,8%) gleichermaßen auf Platz vier der häufigsten Krebstodesursachen. Es handelt sich um eine Erkrankung, die bevorzugt im höheren Lebensalter, jenseits der 70 Jahre auftritt (Robert-Koch-Institut 2017).

Tabelle 1: Die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für das Pankreaskarzinom in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2017).

Inzidenz	2013		2014		Prognose für 2018	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	8.750	8.690	8.550	8.580	9.500	9.500
rohe Erkrankungsrate ¹	22,2	21,1	21,6	20,8	23,5	22,9
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	14,5	10,7	13,9	10,4	14,4	11,1
mittleres Erkrankungsalter ³	72	75	72	75		
Mortalität	2013		2014		2015	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Sterbefälle	8.273	8.328	8.231	8.384	8.497	8.659
rohe Sterberate ¹	21,0	20,2	20,7	20,3	21,2	20,9
standardisierte Sterberate ^{1,2}	13,4	9,7	13,0	9,5	13,2	9,8
mittleres Sterbealter ³	73	77	73	77	73	77

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median

1.2.2 Pathologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom entsteht aus nichtinvasiven Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die gleichzeitig die häufigsten Vorläuferläsionen darstellen. Pankreaskarzinome können außerdem aus intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien sowie aus muzinös-zystischen Neoplasien hervorgehen. PanIN stellen sich als mikroskopische Läsionen dar, die nicht mittels pankreatischer Bildgebung detektiert werden können. Eingeteilt werden sie in low-grade PanIN (PanIN-1), welche häufig in höherem Alter gefunden werden können, bis high-grade PanIN (PanIN-3), welche sich vor allem in invasiven Karzinomen zeigen (Vincent et al. 2011). Makroskopisch manifestiert sich das duktales Pankreasadenokarzinom im Allgemeinen als unscharf begrenzter Tumor mit fester Konsistenz. Histologisch zeigen sich relativ gut differenzierte gangartige Drüsenstrukturen mit Schleimproduktion. Es bildet sich eine starke desmoplastische Gewebereaktion (Böcker et al. 2012). In dieser Desmoplasie finden sich Fibroblasten, inflammatorische Zellen, Endothelzellen und eine komplexe extrazelluläre Matrix. Der Tumor infiltriert Nerven und breitet sich entlang der perineuralen Nervenscheiden aus. Außerdem neigt der Tumor dazu, Lymphgefäße und kleine Venen zu infiltrieren und ist dadurch in der Lage in die regionären Lymphknoten und in die Leber zu metastasieren (Wolfgang et al. 2013). Histologische Varianten des duktales Adenokarzinoms sind das adenosquamöse Karzinom, welches sich als eine Mischung aus Drüsen- und Plattenepithelanteilen darstellt, sowie das anaplastische (undifferenzierte) Karzinom (Böcker et al. 2012).

1.2.3 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms erfolgt durch die TNM-Klassifikation. Die klinische Einteilung (siehe Tabelle 2), basierend auf der TNM-Klassifikation, dient als Entscheidungshilfe für die initial am besten geeignete Therapie anhand der Resektabilität und des Progress des Tumors (Vincent et al. 2011).

Lokalisiert oder resektabel (ca. 10%): Stadium 0-IIIB

Lokal fortgeschritten oder nicht resektabel (ca. 30%): Stadium III

Metastasiert (ca. 60%): Stadium IV

(Vincent et al. 2011)

Tabelle 2: Nachfolgend ist die TNM-Klassifikation tabellarisch aufgelistet. Hierbei steht T für den Primärtumor, N für den Nodalstatus und M für die Fernmetastasierung. Zusätzlich erfolgt eine klinische Einteilung, basierend auf der TNM-Klassifikation in fünf Stadien, von denen Stadium I und II noch weiter unterteilt werden (Vincent et al. 2011).

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (inklusive PanIN-3)
T1	Tumor auf Pankreas begrenzt; Durchmesser ≤ 2 cm
T2	Tumor auf Pankreas begrenzt; Durchmesser > 2 cm
T3	Tumor bereits organübergreifend; noch resektabel
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior; nicht mehr resektabel

N	regionäre Lymphknoten
NX	regionäre Lymphknoten können nicht bewertet werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen

M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

1.2.4 Klinik

In den meisten Fällen präsentiert sich das Pankreaskarzinom mit unspezifischen Symptomen (Wolfgang et al. 2013) und gerade in den frühen Stadien ist es klinisch stumm. Die meisten Patienten, die sich mit Beschwerden - durch den Tumor verursacht - vorstellen, weisen bereits ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung auf (Vincent et al. 2011).

Symptome des Pankreaskarzinoms sind unter anderem:

- Gewichtsverlust (Vincent et al. 2011)
- Verschlussikterus (Vincent et al. 2011)
- lehmfarbene Stühle (Wolfgang et al. 2013)
- Übelkeit (Wolfgang et al. 2013)
- Pankreatitis (Vincent et al. 2011)
- Oberbauchmerzen mit radiären Rückenschmerzen (Wolfgang et al. 2013)
- tiefe/oberflächliche Venenthrombose (Vincent et al. 2011)
- neu aufgetretener Diabetes mellitus (Wolfgang et al. 2013)
- Thrombophlebitis migrans (Wolfgang et al. 2013)

1.2.5 Diagnostik

Neu aufgetretene Oberbauch- und Rückenschmerzen, ein neu aufgetretener schmerzloser Ikterus sowie eine Pankreatitis unklarer Genese sind Indikationen für die Abklärung eines Pankreaskarzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom gehören die Oberbauchsonographie, die Endosonographie, die Multidetektor-Computertomographie sowie die Magnetresonanztomographie in Kombination mit der Magnetresonanz-Cholangiopräankreatikographie zu den diagnostischen Maßnahmen der ersten Wahl. Die beiden zuletzt genannten Maßnahmen besitzen die höchste Sensitivität zur Erkennung eines malignen Geschehens des Pankreas. Laborchemisch sollte der Tumormarker CA19-9 bestimmt werden, der einen möglichen Hinweis auf die Höhe der Tumorlast gibt (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Zur präoperativen Ausbreitungsdiagnostik und zur Beurteilung der systemischen Tumorausbreitung gehören die Multidetektor-

Computertomographie, die Endosonographie, die Abdomensonographie und eine Röntgen-Thorax-Untersuchung (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.2.6 Therapie

Die chirurgische Therapie des Pankreaskarzinoms erfolgt in kurativer Absicht, wobei einige Resektabilitätskriterien beachtet werden müssen. Die Resektion ist gleichzeitig die einzige kurative Möglichkeit zur Behandlung des Tumors (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Allerdings sind nur 20% der Patienten bei Diagnosestellung potenziell resektabel. Eine chirurgische Intervention ist nur bei komplett resektablen Tumoren sowie bei grenzwertig-resektablen Tumoren angezeigt (Rossi et al. 2014).

Als grenzwertig resektable Tumore gelten die im folgenden Genannten:

- es dürfen keine Fernmetastasen vorliegen
- Infiltration der V. mesenterica superior/Pfortader mit oder ohne Stenosierung
- Ummauerung der oben genannten Venen ohne Ummauerung der Arterien
- kurzstreckiger Tumorthrombus in oben genannten Venen, sofern proximal und distal geeignete Abschnitte zur sicheren Resektion und Rekonstruktion bestehen
- Ummauerung der A. gastroduodenalis bis hin zur A. hepatica, allerdings ohne Ausdehnung bis zum Truncus coeliacus
- Ummauerung der A. mesenterica superior, allerdings nur bis maximal 180° der gesamten Gefäßzirkumferenz

(Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

Zielsetzung der chirurgischen Intervention ist eine R0-Situation, also eine Entfernung des Tumors im Gesunden. Allerdings gibt es keine einheitliche Literaturempfehlung bezüglich des Ausmaßes des Sicherheitsabstands. Ziel sollte also der größtmöglich erreichbare Sicherheitsabstand sein. Sollten Fernmetastasen, dazu gehören auch nicht-regionale Lymphknotenmetastasen und eine Peritonealkarzinose, festgestellt werden, sollte eine chirurgische Therapie des duktales Pankreaskarzinoms unterlassen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Je nach Lokalisation und Größe des Tumors gibt es verschiedene Operationsverfahren mit anschließender Lymphadenektomie (Rossi et al. 2014).

- (pyloruserhaltene) klassische Whipple-Operation
- (subtotale) Pankreaslinksresektion
- totale Duodenopankreatektomie

(Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

Bei oben genannter Lymphadenektomie sollen mindestens zehn regionäre Lymphknoten reseziert werden, die dann im Verhältnis von befallenen zu entfernten Lymphknoten auf dem histopathologischen Befund angegeben werden sollen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Bestimmte Patienten, insbesondere solche mit grenzwertig resektablen Tumoren, können von einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabin profitieren (Rossi et al. 2014). Eine postoperative Chemotherapie kann mit Gemcitabin oder 5-Fluorouracil (5-FU) durchgeführt werden. Beide Therapien haben eine signifikante Zunahme des Überlebens (Rossi et al. 2014), bei gleichzeitig relativ gering ausgeprägten Nebenwirkungen, gezeigt. Im Falle einer 5-FU-Bolusgabe zeigten sich mehr Mukositiden als bei einer Gemcitabintherapie. Das mediane Überleben unter diesen Chemotherapien liegt bei bis zu 24 Monaten. Das 5-Jahresüberleben mit adjuvanter Chemotherapie liegt bei ca. 20%, eine alleinige chirurgische Therapie nur bei ca. 10%. Die Dauer der postoperativen Chemotherapie ist nach Leitlinie für sechs Monate angesetzt und sollte innerhalb von sechs Wochen postoperativ begonnen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

1.3.1 CD44

CD44 ist ein transmembranöses Glykoprotein, dessen Großteil sich extrazellulär befindet. Seit der ersten Entdeckung auf Lymphozyten konnte es in den meisten menschlichen Geweben gefunden werden. Neben der reinen Zelladhäsion hat CD44 noch weitere Funktionen:

- Abbau von Hyaluronat
- Aktivierung von Lymphozyten
- Auffinden von Lymphknoten
- Myelopoese und Lymphopoese
- Zytokinfreisetzung
- Angiogenese

(Sneath und Mangham 1998)

Der intrazelluläre, carboxyterminale Anteil des Moleküls interagiert mit dem Zytoskelett der Zelle. Extrazellulär befindet sich sowohl ein variabler Mittelteil, als auch das aminoternale Ende, welches für die Bindung von Hyaluronsäure zuständig ist (Sneath und Mangham 1998).

Das Gen für CD44 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert. Es enthält diverse Exons, zu denen sowohl konstante, als auch variable Anteile gehören (siehe Abbildung 1), die für eine Vielzahl von Proteinen kodieren. Der Vorgang zur Expression dieser verschiedenen Proteine wird als alternatives Splicing bezeichnet. Individuelle Zellen sind dazu in der Lage, das Muster ihrer CD44-Expression so zu verändern, wie es gerade benötigt wird. Die am häufigsten produzierte Isoform wird als CD44s (s für standard) bezeichnet und hat ein Molekulargewicht von 37 kDa. Diese Isoform zeichnet sich auch dadurch aus, dass in der mRNA keine variablen Exons vorkommen. Insgesamt gibt es neun variable Exons, die mit v2-v10 bezeichnet werden. Das Exon v1 findet sich nicht in menschlichen Zellen. CD44v (v für variant) kann ein oder mehrere variable Regionen enthalten (Sneath und Mangham 1998).

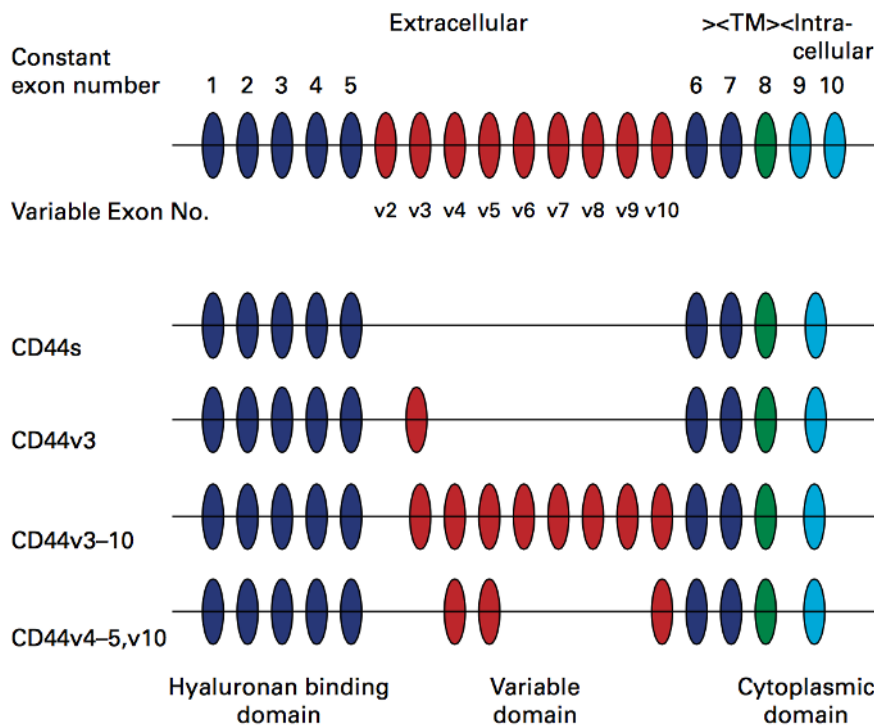


Abbildung 1: Genomstruktur von CD44 (Sneath und Mangham 1998).

Durch das Hinzufügen einer Glykosaminoglykanseitenkette steigt das Molekulargewicht von CD44s auf bis zu 80-100 kDa. Diese variable Glykolysierung hat Auswirkungen auf die Funktion des Moleküls. Die Seitenketten bestehen aus einer Aneinanderreihung von Disaccharideinheiten und sind negativ geladen. Dadurch werden positive Ionen angezogen, wodurch sich ein osmotisches Potential bildet. Zu diesen Seitenketten zählen Heparansulfat und Chondroitinsulfat. CD44s besitzt nur einen geringen Anteil Chondroitinsulfat, während die Isoform CD44v3-v10 (Keratinocyten) hauptsächlich mit Heparansulfat glykosyliert ist (Sneath und Mangham 1998).

Im Jahre 1989 konnte durch Stamenkovic et al. bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl an Tumorzelllinien und solide Tumoren CD44 exprimieren. Im Jahre 1991 konnten Günthert et al. feststellen, dass ein nicht-metastasierender Tumor durch Einbringen einer Isoform von CD44 metastasierende Eigenschaften erlangte (Sneath und Mangham 1998). In normalen duktalem Zellen des Pankreas lässt sich die Isoform CD44v6 als einziges Splicingprodukt finden, welche auch von Pankreaskarzinomzellen exprimiert wird. In den malignen Zellen zeigte sich jedoch, dass eine Vielzahl weiterer Isoformen (über)exprimiert wird (Sneath und Mangham 1998). Eine Überexpression von CD44 korreliert mit einem Tumorprogress, sowie mit einer Metastasierungsfähigkeit in vielen Tumorarten, darunter auch im Pankreaskarzinom. Das Vorhandensein von CD44 im Pankreaskarzinom ist aufgrund von Fernmetastasierung und aggressivem Verhalten mit einer schlechten

Prognose für den Patienten assoziiert (Li et al. 2015). Es bedarf noch einer Reihe weiterer Studien mit Standardisierung der Methoden, größerer Fallzahlen und längerem klinischem Follow-up bei der Erforschung von CD44 in malignen Tumoren. Einige Beobachtungen konnten zeigen, dass CD44 in bestimmten Zellen nicht zur Karzinogenese oder zur Ausbildung von Metastasen benötigt wird. Plattenepithelkarzinome der Lunge behalten das gleiche CD44-Expressionsmuster wie das ursprüngliche Flimmerepithel, während bei allen anderen Bronchialkarzinomen eine Herunterregulierung oder ein kompletter Verlust von CD44 zu verzeichnen war. Gibt man einer CD44-negativen Zelllinie eines malignen Melanoms die Möglichkeit zur Expression von CD44 wird die Tumorgenese gefördert. Es ist auch interessant, dass Melanozyten und Nävi innerhalb eines Epithels, das CD44 exprimiert, selbst kein CD44 exprimieren. Beim Mammakarzinom konnte eine Abhängigkeit der Expression von CD44 von Hormonen gezeigt werden (Sneath und Mangham 1998).

1.3.2 CD24

CD24 ist ein glykosylphosphatidylinositol-verankertes Membranprotein. Es besitzt ein Molekulargewicht von 30 bis 70 kDa. Von diesem Gewicht ist nur ein geringer Teil auf die ursprüngliche 27 bis 30 Aminosäuren umfassende Peptidkette zurückzuführen, der größte Anteil kommt durch die umfangreiche N- und O-Glykosylierung zustande. CD24 lässt sich auf hämatopoetischen Zellen, beispielsweise auf B-Vorläuferzellen und neutrophilen Granulozyten (Baumann et al. 2005, Aigner et al. 1997), sowie in neuronalem Gewebe und in bestimmten epithelialen Geweben (Keratinocyten, Tubulusepithel der Niere) finden (Baumann et al. 2005), dagegen fehlt das Adhäsionsmolekül bei normalen T-Lymphozyten und Monozyten (Aigner et al. 1997). Desweiteren ist bekannt, dass es an P-Selektin, exprimiert von Thrombin-aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen, sowie an L1, einem Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, auf Nervenzellen und lymphatischen Zellen, bindet (Baumann et al. 2005). P-Selektin (CD62P) ist ein Ca^{2+} -abhängiges endogenes Lektin, welches auf Gefäßendothel und Thrombozyten vorkommt (Aigner et al. 1997). CD24 scheint eine Rolle in der Karzinogenese und in der Progression einiger Karzinomtypen zu spielen. Eine Expression von CD24 ist ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Überleben beim Mammakarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom. Auch im Pankreaskarzinom konnte eine verstärkte Ausbildung des Moleküls, sowie eine Verstärkung der Metastasierung in vivo detektiert werden. Im Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass eine CD24-Expression die

Tumorzellproliferation stimuliert, die Bindung an P-Selektin, Fibronectin und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix initiiert, sowie die Zellbeweglichkeit und Invasion begünstigen kann (Baumann et al. 2005).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: In nachfolgender Tabelle erfolgt eine Auflistung der verwendeten Geräte mit Gerätebezeichnung und Herstelleranschriften.

Gerätebezeichnung	Hersteller
HE Färbeautomat Shandon Varistain 24-4	Thermo ELECTRON CORPORATION, Waltham, Massachusetts, USA
Light Cycler 480 II	Roche Diagnostics, verschiedene Standorte
Microtom Microm HM430	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop Axioplan	Carl ZEISS GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
PCR Cooler	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Perfect Spin Zentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH, Carl- Thiersch-Straße 2b, 91052 Erlangen
Rollmischer Assistent 348 RM 5	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Stettener Straße 22-24, 97647 Sondheim v. d. Rhön
Rührgerät RCT basic – safety control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Scanner Axio Scan.Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Königsallee 9-21, 37081 Göttingen
Steamer Pascal	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Vortex REAX	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Straße 12, 91126 Schwabach
Waage PE2000	Mettler Waagen GmbH, 63 Gießen 2
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, 30938 Burgwedel
Wasserbad	MEDAX GmbH & Co. KG, Haberstraße 23, 24537 Neumünster/Conrad & Co.

	Laborbedarf/Glasbläserei, Meyer-Delius-Platz 5, Hamburg 62
Wärmeplatte	MEDAX GmbH & Co. KG, Haberstraße 23, 24537 Neumünster
Wärmeschrank	Wilke & Witzel, Medizintechnik, Barkhausenweg 7, 22339 Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Tabelle 4: In nachfolgender Tabelle erfolgt eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Glaswaren mit Bezeichnung, Bestellnummer und Herstelleranschriften.

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Combitips advanced 0,5ml	0030089.421	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Deckgläser 21x26mm #1	Art.: 9161021	Menzel-Gläser B.V & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, 38116 Braunschweig
Deckgläser 24x32mm #1	Art.: 9161032	Menzel-Gläser B.V & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, 38116 Braunschweig
Deckgläser 24x50mm #1	Art.: 620511	Menzel-Gläser B.V & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, 38116 Braunschweig
Deckgläser 22x50mm #1	Art.: 9161028	Menzel-Gläser B.V & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, 38116 Braunschweig
Deckgläser 22x32mm #1,5	Art.: 6228288	Menzel-Gläser B.V & Co. KG, Saarbrückener Straße 248, 38116 Braunschweig
Deckgläser 24x60mm #1	Art.-Nr.: H878	Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5,

		76185 Karlsruhe
Multipipette/Repeater (X) Stream	---	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Multiwell Plate 96 white	04729692001	Roche Deutschland, verschiedene Standorte
Objektträger beschichtet, HistoBond®	Ref.: 0810000	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Am Wöllerspfad 4, 97922 Lauda-Königshofen
Objektträger unbeschichtet, Assistent®	42406010	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Stettener Straße 22-24, 97647 Sondheim v. d. Rhön
Pipetten verschiedener Größe	---	Finnpipette®, Labsystems
Pipettenspitzen 100-1000µl	Ref.: 70.762.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
Pipettenspitzen 500-2500µl	Cat.-No.: 022492071	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Pipettenspitzen 0,5-5ml	Z740085-200EA	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken- Straße 14, 21147 Hamburg
Pipettenspitzen 20µl	Ref.: 70.1116	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
Pipettenspitzen 200µl	Ref.: 70.760.002	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000µl	Ref.: 70.762	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5ml	Ref.: 72.704	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588

		Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5ml	Ref.: 72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht
Sealing Foils	04729757001	Roche Deutschland, verschiedene Standorte

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 5: In nachfolgender Tabelle erfolgt eine Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Bezeichnung, Bestellnummer und Herstelleranschriften.

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
ABC-AP VECTASTAIN	Cat.-No.: AK-5000	VECTOR LABORATORIES INC., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, USA
Antikörper (AK) Diluent	Ref.: S0809	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
Azophloxin	1B103	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., 73257 Köngen
Aqua. dest.	---	eigene Destillation
Citronensäure-Monohydrat	CAS-No.: 5949-29-1 1.00244.1000	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
ddH ₂ O	03315843001	Roche Deutschland, verschiedene Standorte
Eisessig	C.I.-Nr.: 42685 1.00063.1000	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Eosin (Erythrosin B)	CAS-No.: 16423-68-0 1.15936.0025	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293

		Darmstadt
Essigsäure 0,2%	---	selbst angesetzt
Ethanol 50%	---	selbst angesetzt
Ethanol 70%	---	selbst angesetzt
Ethanol 96%	Batch: 20171204 Art.: 2206.5000	Th. Geyer GmbH & Co. KG, CHEMSOLUTE®, Dornierstraße 4-6, 71272 Renningen
Ethanol absolut	Batch: 708430 Art.: 2212.5000	Th. Geyer GmbH & Co. KG, CHEMSOLUTE®, Dornierstraße 4-6, 71272 Renningen
Eukitt®	---	O. Kindler GmbH, Ziegelhofstraße 214, 79110 Freiburg
Hämalaun	1.09249.2500	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
HCL 1N	---	selbst angesetzt
HCL 2N	Batch: 25.2781306 Art.: 860.1000	Th. Geyer GmbH & Co. KG, CHEMSOLUTE®, Dornierstraße 4-6, 71272 Renningen
Kalium-Bisulfit	CAS-No.: 16731-55-8 1.05057.0500	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Kapa SYBR FAST qPCR Kit for Light Cycler 480	Ref.: KK4611	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken- Straße 14, 21147 Hamburg
Lichtgrün	10965	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., 73257 Köngen
NaCl (Natriumchlorid)	JTBF01898010166 0278	J.T. Baker

NaOH 10N (Natriumhydroxid)	UN 1823 0402	J.T. Baker
Orange G	C.I.-Nr.: 16230 S.-Nr.: 39 1B 221	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., 73257 Köngen
Perjodlösung 0,8%	Art.: 524 820 B906324	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Permanent Red	Ref.: ZUC001-125	Zytomed Systems GmbH, Anhaltinerstraße 16, 14163 Berlin
Phosphorwolframsäure (Phosphormolybdänsäure)	CAS-No.: 51429-74-4 1.00532.0100	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Ponceau de Xylidine	C.I.-Nr.: 16150 S.-Nr.: 95 1B 207	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., 73257 Köngen
Primer (siehe Alu-PCR)	---	Eurofins Genomics, Anzigerstraße 7a, 85560 Ebersberg
Protease (Proteinase, bakteriell, Type XXIV)	P8038-1G	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken- Straße 14, 21147 Hamburg
Säurefuchsin	7629	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Schiffssches Reagenz	C.I.-Nr.: 42500 1.09033.0500	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Target Retrieval Solution	Ref.: S1699	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
Trizma® Base	PCode: 1002304899 T1503-1KG	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken-

		Straße 14, 21147 Hamburg
Tween® 20	P1379-1L	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Georg-Heyken-Straße 14, 21147 Hamburg
Weigerts-Eisenhämatoxylin A	Ref.: 2E-032	WALDECK GmbH & Co. KG, Havixbecker Straße 62, 48161 Münster
Weigerts-Eisenhämatoxylin B	Ref.: 2E-052	WALDECK GmbH & Co. KG, Havixbecker Straße 62, 48161 Münster
Xylolersatz	Best.-Nr.: 1-019614-5 HS200-5 (XEM)	DiaTec, Rheinstraße 2, 96052 Bamberg

2.1.4 Antikörper

Tabelle 6: In nachfolgender Tabelle erfolgt eine Auflistung der verwendeten Antikörper mit Bezeichnung, Bestellnummer und Herstelleranschriften.

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
CD24 (mAb SWA-11 IgG2a)	---	von Altevogt
CD44 mouse anti human	Cat.-No.: 550392	BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131
CD45 rat anti mouse	Cat.-No.: 550539	BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131
goat anti mouse	Ref.: E0433	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
goat serum	Ref.: X0907	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
mouse IgG2a	Ref.: X0943	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg

mouse IgG2b	Ref.: X0944	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg
rabbit anti rat-Biotin	312-065-048	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridge House, St. Thomas' Place, Cambridgeshire Business Park, Ely, Cambridgeshire, CB7 4EX, UK
rabbit IgG	ab37415	Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0FL, UK
rat IgG2b	Cat.-No.: 400622	BioLegend, 9727 Pacific Heights Blvd., San Diego, CA 92121, USA
swine anti rabbit-Biotin	Ref.: E0353	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg

2.1.5 Lösungen, Färbungen und Puffer

ABC-AP-Lösung

2,5ml TBS

+ 1 Tropfen A

+ 1 Tropfen B

Azophloxinlösung

100ml aqua dest.

+ 0,5g Azophloxin

+ 2ml Eisessig

Citratpuffer

2000ml aqua dest.

+ 4,2028g Citronensäure-Monohydrat

+ ca. 10ml 10N NaOH (bis pH 6 erreicht ist)

Goldner I

88ml 0,2% Essigsäure

+ 10ml Masson-Gebrauchslösung

+ 2ml Azophloxinlösung

Goldner II

100ml aqua dest.

+ 3g Phosphorwolframsäure

+ 2g Orange G

Goldner III

100ml aqua dest.

+ 0,2ml Eisessig

+ 0,1g Lichtgrün

Hämalaun nach Meyer

250ml aqua dest.

+ 250ml Hämalaun

Kaliumbisulfit 10%

100ml aqua dest.

+ 10g Kaliumbisulfit

Massonlösung A

100ml aqua dest.

+ 1ml Eisessig

+ 1g Säurefuchsin

Massonlösung B

100ml aqua dest.

+ 12ml Eisessig

+ 1g Ponceau de Xylidine

Masson-Gebrauchslösung

2 Teile Massonlösung B

+ 1 Teil Massonlösung A

Perjodsäure 0,8%

100ml aqua dest.

+ 0,8g Perjodsäure

Permanent Red

1ml Puffer (zugehörig)

+ 16µl Permanent Red

SO₂-Wasser

200ml aqua dest.

+ 10ml 10% Kaliumbisulfit

+ 10ml 1N HCL

TBS (Saliner Tris-HCl-Puffer)

Ansatz für 10 Liter (in aqua dest.)

200ml 2N HCl (oder 400ml 1N HCl)

+ 87,09g NaCl

+ 60,57g Trizma Base

einstellen mit HCl auf pH 7,6

TBS-T (Saliner Tris-HCl-Puffer mit Tween 20 versetzt)

2000ml TBS-Ansatz

+ 2ml Tween 20

2.1.6 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden zwei Zelllinien verwendet. Zum einen BxPC3 (duktales Pankreasadenokarzinom, erworben bei ATCC) und zum anderen PaCa 5061 (duktales Pankreasadenokarzinom, im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf etabliert). An beiden Zelllinien wurde ein CD44 Knockdown (kd) durchgeführt, der mit der luc-Gruppe (Kontrollgruppe) der jeweiligen Zelllinie und mit der luc-Gruppe und dem Knockdown der jeweils anderen Zelllinie verglichen wurde.

2.1.7 Immundefiziente Tiere

Übernahme des Versuchs nach bereits abgeschlossenem Tierversuch, so dass die Gewebeproben bereits paraffiniert vorlagen (siehe Ergebnisse).

Tabelle 7: Insgesamt lagen 33 Primärtumoren zur Auswertung vor, die in nachfolgender Tabelle mit dem jeweiligen Anteil an den verwendeten Zelllinien dargestellt sind.

	PaCa 5061 luc	PaCa 5061 CD44 kd	BxPC3 luc	BxPC3 CD44 kd
Anzahl	6 Stück	7 Stück	10 Stück	10 Stück

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Aufarbeitung der Gewebe

Übernahme des Versuchs mit bereits paraffinierten Primärtumoren, sowie bereits geschnittenen Lungen in HE-Färbung.

2.2.1.1 Zuschnitt der Primärtumoren

Zuschnitt der Primärtumoren mit dem Mikrotom. Anfertigung von ca. 15 Objektträgern pro Tumorblock für die nachfolgenden Färbungen, dabei wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 4µm geschnitten und daraufhin in einem auf 40°C erwärmten Wasserbad zum Entfalten gebracht. Danach erfolgte die Aufbringung auf die Objektträger und Trocknung in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zur Weiterverarbeitung aus dem Brutschrank genommen.

2.2.1.2 Entparaffinierung und Entwässerung

Ablauf vollautomatisch im HE Färbeautomat Shandon Varistain 24-4 (siehe HE-Färbung).

2.2.2 Färbungen

2.2.2.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung erfolgte automatisiert in einem dafür vorgesehen Automaten. Zuerst wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe nächste Seite) entparaffiniert und für jeweils zwei mal zwei Minuten in aqua dest. behandelt. Danach erfolgte die Färbung mit Hämalaun für drei Minuten mit anschließender erneuter Spülung in aqua dest. für zwei Minuten. Als nächstes kamen die Schnitte für fünf Minuten in Leitungswasser und daraufhin weitere drei Minuten zur Färbung in Eosin. Kurze Spülung für 30 Sekunden in aqua dest. und anschließende Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (siehe nächste Seite) ab Ethanol 70%. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

absteigende Alkoholreihe (entparaffinieren):

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Ethanol absolut: 3 min

Ethanol absolut: 5 min

Ethanol 96%: 5 min

Ethanol 70%: 5 min

Ethanol 50%: 5 min

aufsteigende Alkoholreihe (entwässern):

Ethanol 70%: 15 sec

Ethanol 96%: 30 sec

Ethanol 96%: 30 sec

Ethanol absolut: 5 min

Ethanol absolut: 5 min

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Diese Routinefärbemethode dient als Übersichtsfärbung. Hämalaun färbt alle sauren/basophilen Bestandteile blau. Dazu gehören z.B. DNA, Zellkerne, Ribosomen. Eosin färbt basische/eosinophile Bestandteile rot. Dazu gehören unter anderem Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien und Kollagen (<http://flexikon.doccheck.com/de/Hämatoxylin-Eosin-Färbung>).

2.2.2.2 Masson-Goldner-Färbung

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte bis Ethanol 96%. Danach erfolgte die Inkubation in Weigerts Eisenhämatoxylin (besteht aus gleichen Teilen Lösung A und B) für drei bis fünf Minuten. Kurzes Spülen in aqua dest. und Differenzierung in 1% Salzsäurealkohol. Danach werden die Schnitte für zehn bis 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Daraufhin erfolgte die Färbung in Goldner I für fünf bis sieben Minuten. Zwei kurze Spülungen in 1% Essigsäure. Dann Färbung in Goldner II für zehn Minuten bis zur Entfärbung des Bindegewebes. Erneutes zweimaliges kurzes Spülen in 1%

Essigsäure. Als Nächstes erfolgte die letzte Färbung in Goldner III für zehn Minuten mit anschließender dreimaliger kurzer Spülung in 1% Essigsäure. Die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte bei dieser Färbung nicht im Automaten, sondern von Hand in einzelnen Küvetten nach folgendem Schema (siehe unten). Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

Ethanol 70%: 1-2 sec

Ethanol 96%: 1-2 sec

Ethanol 96%: 5 min

Ethanol absolut: 5 min

Ethanol absolut: 5 min

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Ergebnis der Färbung: Kerne – braunschwarz; Zytoplasma – ziegelrot; Muskelgewebe – blassrot; Erythrozyten und Fibrin – orange; Bindegewebe und Schleim – grün

2.2.2.3 PAS-Färbung

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte bis aqua dest. und anschließende zehnminütige Inkubation in 0,8% Perjodlösung. Es folgte eine gründliche Spülung in aqua dest. mit nachfolgender Inkubation in Schiff-Reagenz im abgedunkelten Raum für 20-30 Minuten. Dann folgte die Spülung in drei Küvetten mit SO₂-Wasser für zwei Minuten pro Küvette und nachfolgend fließendes Wässern unter Leitungswasser für 20 Minuten. Kurzes Spülen in aqua dest. und Gegenfärbung für zehn Sekunden in Hämalaun 1:1. Danach erneutes fließendes Wässern unter Leitungswasser für fünf Minuten. Erneutes kurzes Spülen in aqua dest. und anschließendes Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

Ergebnis der Färbung: Kohlenhydrate/Glykogen – rosa bis violett; Zellkerne – blau

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 CD44-Färbung

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbung auf CD44 wurden die Schnitte in üblicher Weise im Automaten entparaffiniert. Anschließend erfolgte eine Vorbehandlung im Citratpuffer im Wasserbad bei 85°C mit pH 6 für zehn Minuten. Nach einer zwanzigminütigen Abkühlphase auf Eis erfolgte eine Spülung in TBS-T für je zweimal fünf Minuten und anschließend eine Spülung in TBS für fünf Minuten. Als Nächstes wurden die Schnitte mit goat serum (X0907; 1:10 in TBS verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer blockiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das goat serum abgekippt und der Primärantikörper auf die Schnitte pipettiert. Der Primärantikörper (anti-CD44-Antikörper; 550392) wurde zuvor 1:100 in AK Diluent verdünnt. Für die Positivkontrolle wurde ein Zellpellet der Linie HT29 verwendet. Auf die Isotypenkontrolle wurde mouse IgG2b (X0944; zuvor 1:40 in AK Diluent verdünnt) pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Im Anschluss erfolgte ein Abkippen der Lösungen und erneute Spülung nach oben genanntem Schema mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Bei diesem Schritt war unbedingt darauf zu achten, dass die Isotypenkontrollen getrennt gespült wurden. Als Nächstes erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Hierfür wurde goat anti mouse (E0433; 1:200 in TBS verdünnt) verwendet. Der Sekundärantikörper wurde auf alle Schnitte inklusive Isotypenkontrolle pipettiert. Anschließend erfolgte wieder ein Abkippen der Lösungen und Spülen der Schnitte in TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Nach dieser Spülphase folgte die Inkubation der Schnitte mit ABC-AP, welches mindestens 30 Minuten zuvor aus einem Kit nach Anleitung mit TBS angesetzt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach Ablauf der Zeit und erneuter Spülung mit bekanntem Schema wurden die Schnitte mit Permanent Red für 15 Minuten entwickelt. Kurze Spülung für drei Minuten unter Leitungswasser und ein bis zwei Minuten in aqua dest., mit nachfolgender Gegenfärbung in Hämalaun für fünf Sekunden. Es folgte direkt eine Spülung unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten und ein bis zwei Minuten in aqua dest., Entwässerung im Automaten und Eindeckeln mit Eukitt.

2.2.3.2 CD24-Färbung

Nach der Entparaffinierung der Schnitte nach bekanntem Schema im Automaten erfolgte zunächst eine Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten) mit anschließender Vorbehandlung mit Protease XXIV (gelöst in TBS) im Wasserbad bei 37°C für zehn Minuten. Es folgte fließendes Wässern für fünf Minuten unter Leitungswasser und nachfolgend erneute Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Anschließend erfolgte das Aufbringen des Primärantikörpers (anti-CD24-Antikörper; mAb SWA-11 IgG2a), der zuvor 1:5 in AK Diluent verdünnt wurde, sowie das Aufbringen der Isotypenkontrolle (mouse IgG2a; X0943), zuvor 1:3,6 in AK Diluent verdünnt, in einer Feuchtkammer auf die Schnitte und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Für die Positivkontrolle wurde Kolonkarzinom und Mammakarzinom verwendet. Abkippen der Schnitte und erneute Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten), wobei darauf zu achten war, dass die Isotypenkontrollen getrennt gespült wurden. Der nächste Schritt beinhaltete die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (goat anti-mouse; P0447; 1:200 in TBS verdünnt) auf allen Schnitten für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Anschließend erfolgte wieder ein Abkippen der Lösungen und Spülen der Schnitte in TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Nach dieser Spülphase folgte die Inkubation der Schnitte mit ABC-AP, welches mindestens 30 Minuten zuvor aus einem Kit nach Anleitung mit TBS angesetzt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach Ablauf der Zeit und erneuter Spülung mit bekanntem Schema wurden die Schnitte mit Permanent Red für acht Minuten entwickelt. Spülung für fünf Minuten unter Leitungswasser und ein bis zwei Minuten in aqua dest., mit nachfolgender Gegenfärbung in Hämalaun für fünf bis zehn Sekunden. Es folgte direkt eine Spülung unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten und ein bis zwei Minuten in aqua dest., Entwässerung im Automaten und Eindeckeln mit Eukitt.

2.2.3.3 CD45-Färbung

Es erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte im Automaten und eine Vorbehandlung der Schnitte in Target Retrieval Solution (pH 6) für zweimal vier Minuten in der Mikrowelle auf höchster Stufe. Danach Abkühlung auf Eis und Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Anschließend wurde der Primärantikörper (anti-

CD45-mouse-Antikörper; 550539), welcher zuvor 1:25 in AK Diluent verdünnt wurde, auf die Schnitte pipettiert. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um Mausmilz. Für die Isotypenkontrolle wurde rat IgG2b (400622; 1:400 in AK Diluent verdünnt) verwendet. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach ausreichender Einwirkzeit wurde die überschüssige Lösung abgekippt und es folgte eine erneute Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten), wobei darauf zu achten war, dass die Isotypenkontrollen getrennt gespült wurden. Es folgte das Aufbringen des Sekundärantikörpers auf alle Schnitte mit rabbit anti rat-Biotin-Antikörper (312-065-048; 1:100 in TBS verdünnt) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Anschließendes Abkippen der überschüssigen Lösung und erneute Spülung mit TBS-T (zweimal fünf Minuten) und TBS (einmal fünf Minuten). Nach dieser Spülphase folgte die Inkubation der Schnitte mit ABC-AP, welches mindestens 30 Minuten zuvor aus einem Kit nach Anleitung mit TBS angesetzt wurde, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Nach Ablauf der Zeit und erneuter Spülung mit bekanntem Schema wurden die Schnitte mit Permanent Red für 15 Minuten entwickelt. Spülung für drei Minuten unter Leitungswasser und ein bis zwei Minuten in aqua dest., mit nachfolgender Gegenfärbung in Hämalaun für fünf Sekunden. Es folgte direkt eine Spülung unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten und ein bis zwei Minuten in aqua dest., Entwässerung im Automaten und Eindeckeln mit Eukitt.

2.2.4 Auswertung der einzelnen Färbungen

Die Bewertung der einzelnen Färbungen erfolgte lichtmikroskopisch.

2.2.5 Auszählung der Lungenmetastasen

Die Lungenschnitte wurden in HE-Färbung mäanderförmig unter dem Lichtmikroskop auf eventuell vorhandene Metastasen untersucht und gleichzeitig ausgezählt.

2.2.6 Alu-PCR

Ziel und Zweck der Alu-PCR ist die absolute Quantifizierung humaner Tumorzellen aus Mausblut und -gewebe mittels Alu-Sequenz basierter real-time Polymerase-Kettenreaktion

(PCR). Als Ergebnis lässt sich eine Aussage über die zirkulierenden Tumorzellen der einzelnen Tiere machen. Die verwendeten Alu-Primer binden an die Sequenzen der humanen Tumorzellen, welche sich nicht in den murinen Zellen finden.

Bei der Real-Time PCR erfolgt die Detektion, im Gegensatz zur konventionellen PCR, während des PCR-Prozesses, sodass die anschließende Gelelektrophorese entfällt.

Tabelle 8: Im folgenden findet sich eine kurze Darstellung des PCR-Programms mit Zyklusanzahl (cycle), Temperatur (temperature) und Zeit (time).

	cycle	temperature	time
pre-incubation	1	95°C	5 min
amplification	40	95°C	10 sec
		67°C	10 sec
		72°C	10 sec
melting curve	1	95°C	5 sec
		65°C	1 min
		97°C	continuous
cooling	1	40°C	30 sec

Angewendet wird die SYBR-Green-Methode. Das SYBR-Gen interkaliert in die doppelsträngige DNA und löst ein Fluoreszenzsignal aus. Die Zunahme des Signals nach jedem Zyklus ist proportional zur Menge der synthetisierten dsDNA.

Zuerst muss eine Extraktion der genomischen DNA erfolgen. Es wird die DNA aus 1×10^6 Zellen, der in die Maus injizierten Zelllinie, benötigt.

Anschließend erfolgt das Erstellen einer Standardreihe mittels Pipettierschema (Tabelle 9). Als Background wird die Kontroll-DNA einer nicht tumortragenden Maus verwendet.

Tabelle 9: Pipettierschema für die Standardreihe.

	DNA aus Zellen (µl) + Background Kontroll-DNA (µl)	absolute Zellzahl
A	12,5µl + 50µl	2000

B	2µl aus A + 18µl	200
C	2µl aus B + 18µl	20
D	2µl aus C + 18µl	2
E	2µl aus D + 18µl	0,2
F	2µl aus E + 18µl	0,02
G	2µl aus F + 18µl	0,002
H	- + 20µl	0

Als nächstes erfolgte die Erstellung eines Mastermixes, welcher als Reaktionsansatz dient.

Tabelle 10: Mastermix-Komponenten, bestehend aus Kapa SYBR FAST, Primer forward, Primer reverse und ddH₂O.

Mastermix-Komponente	Volumen
ddH ₂ O	2,6µl
Alu forward (100 pmol/µl)	0,2µl
Alu reverse (100 pmol/µl)	0,2µl
Kapa SYBR FAST Light Cycler 480	5,0µl
Gesamtvolumen Mastermix je Sample	8,0µl

Es erfolgte das Beladen der 96-well Platte nach folgendem Pipettierschema:

1. Schritt: pro well 2µl DNA vorlegen
2. Schritt: Zugabe von 8µl Mastermix je well

außerdem werden die Standardreihen und Kontrollen pipettiert.

Anschließendes Verschließen mit einer Sealing Foil und anzentrifugieren der 96-well Platte, sowie Start der PCR mit der Software LightCycler® 480.

Tabelle 11: Primer mit den dazugehörigen Sequenzen.

Primer (100 pmol/µl)	Sequenz 5' -> 3'
Alu forward	TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA
Alu reverse	GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung des Tierversuchs

3.1.1 Auswertung für PaCa 5061

PaCa 5061 CD44-Knockdown (CD44 kd)

Nachfolgend ist die Auswertung des Tierversuchs für die Zelllinie PaCa 5061 dargestellt. Diese beinhaltet Daten zum Überleben und zum Tumorgewicht. Es erfolgt eine gesonderte Darstellung der CD44-Knockdowngruppe (CD44 kd) und der Kontrollgruppe (luc-Gruppe).

Für die CD44-Knockdowngruppe betrug die minimale Überlebenszeit 42 Tage, das maximale Überleben lag bei 62 Tagen mit einem Durchschnittsüberleben von 55 Tagen und einem Median von 58 Tagen. Die Standardabweichung betrug 6,52 Tage mit einer Varianz von 42,48.

Das minimale Tumorgewicht betrug 0,19 Gramm, das maximale Tumorgewicht lag bei 1,19 Gramm bei einem Durchschnittsgewicht von 0,82 Gramm und einem Median von 0,83 Gramm. Die Standardabweichung betrug 0,36 Gramm mit einer Varianz von 0,13.

Tabelle 12: Überleben und Tumorgewicht für die einzelnen Tiere der PaCa 5061 CD44-Knockdowngruppe aus dem Xenograftmodell.

Tiernummer	Zelllinie	Überleben (d)	Tumorgewicht (g)
175-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	42	0,62
195-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	52	0,69
199-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	56	0,19
200-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	58	1,18
200-2-15	PaCa 5061 CD44 kd	58	1,19
200-3-15	PaCa 5061 CD44 kd	58	1,02
202-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	62	0,83

PaCa 5061 Kontrollgruppe (luc)

Für die luc-Kontrollgruppe betrug die minimale Überlebenszeit 64 Tage, das maximale Überleben lag bei 127 Tagen mit einem Durchschnittsüberleben von 98 Tagen und einem Median von 104 Tagen. Die Standardabweichung betrug 23,39 Tage mit einer Varianz von 546,95.

Das minimale Tumorgewicht betrug 0,96 Gramm, das maximale Tumorgewicht lag bei 2,06 Gramm bei einem Durchschnittsgewicht von 1,34 Gramm und einem Median von 1,22 Gramm. Die Standardabweichung betrug 0,42 Gramm mit einer Varianz von 0,17.

Tabelle 13: Überleben und Tumorgewicht für die einzelnen Tiere der PaCa 5061 luc-Kontrollgruppe aus dem Xenograftmodell.

Tiernummer	Zelllinie	Überleben (d)	Tumorgewicht (g)
207-1-15	PaCa 5061 luc	64	1,36
213-1-15	PaCa 5061 luc	77	0,96
223-1-15	PaCa 5061 luc	83	1,03
244-1-15	PaCa 5061 luc	104	2,06
247-1-15	PaCa 5061 luc	108	1,08
265-1-15	PaCa 5061 luc	120	1,55
282-1-15	PaCa 5061 luc	127	Abbruch

Zusammenfassung

Es zeigte sich insgesamt ein längeres Überleben der Mäuse mit der Zelllinie PaCa 5061 luc gegenüber der PaCa 5061 CD44 kd-Gruppe (Abbildung 2; $p=0,0005$, log-rank test), bei gleichzeitig größerer Masse der Tumoren in der luc-Gruppe ($p=0,0328$, t-test).

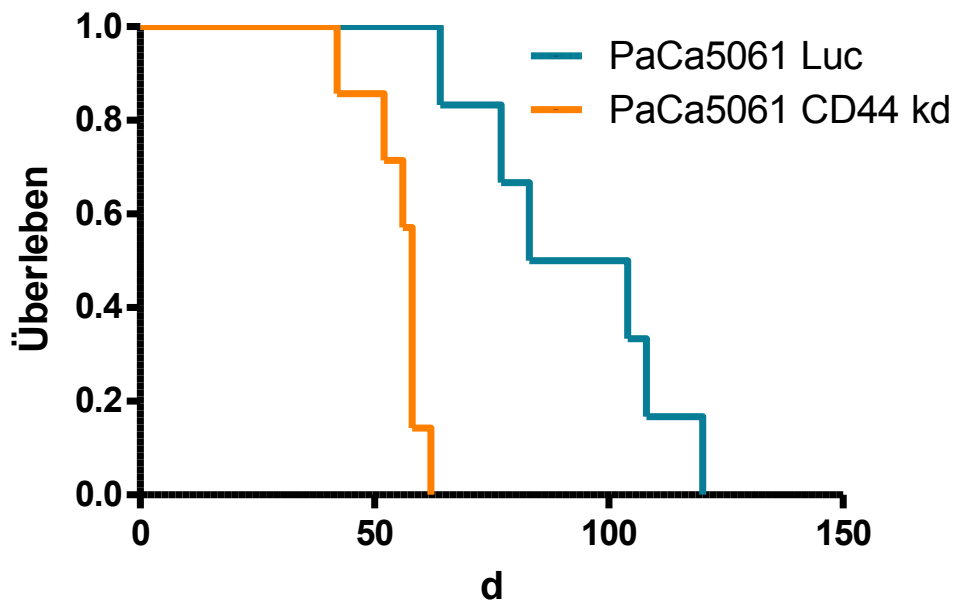


Abbildung 2: Kaplan-Meier-Kurve für das Überleben der Mäuse mit der injizierten Zelllinie PaCa 5061. Zu erkennen ist ein längeres Überleben der luc-Gruppe ($p=0,0005$, log-rank test).

3.1.2 Auswertung für BxPC3

BxPC3 CD44-Knockdown (CD44 kd)

Nachfolgend ist die Auswertung des Tierversuchs für die Zelllinie BxPC3 dargestellt. Diese beinhaltet Daten zum Überleben und zum Tumorgewicht. Es erfolgt eine gesonderte Darstellung der CD44-Knockdowngruppe (CD44 kd) und der luc-Gruppe.

Für die CD44-Knockdowngruppe betrug die minimale Überlebenszeit 77 Tage, das maximale Überleben lag bei 91 Tagen mit einem Durchschnittsüberleben von 87 Tagen und einem Median von 91 Tagen. Die Standardabweichung betrug 6,02 Tage mit einer Varianz von 36,27.

Das minimale Tumorgewicht betrug 0,28 Gramm, das maximale Tumorgewicht lag bei 1,51 Gramm bei einem Durchschnittsgewicht von 1,19 Gramm und einem Median von 1,35 Gramm. Die Standardabweichung betrug 0,39 Gramm mit einer Varianz von 0,15.

Tabelle 14: Überleben und Tumorgewicht für die einzelnen Tiere der BxPC3 CD44-Knockdowngruppe aus dem Xenograftmodell.

Tiernummer	Zelllinie	Überleben (d)	Tumorgewicht (g)
215-1-15	BxPC3 CD44 kd	77	1,51
215-2-15	BxPC3 CD44 kd	77	1,44
224-1-15	BxPC3 CD44 kd	83	1,51
233-1-15	BxPC3 CD44 kd	91	0,28
233-2-15	BxPC3 CD44 kd	91	1,44
233-3-15	BxPC3 CD44 kd	91	1,05
233-4-15	BxPC3 CD44 kd	91	1,41
233-5-15	BxPC3 CD44 kd	91	0,96
233-6-15	BxPC3 CD44 kd	91	1,28
233-7-15	BxPC3 CD44 kd	91	0,97

BxPC3 Kontrollgruppe (luc)

Für die luc-Kontrollgruppe betrug die minimale Überlebenszeit 69 Tage, das maximale Überleben lag bei 91 Tagen mit einem Durchschnittsüberleben von 83 Tagen und einem Median von 87 Tagen. Die Standardabweichung betrug 8,63 Tage mit einer Varianz von 74,4.

Das minimale Tumorgewicht betrug 0,73 Gramm, das maximale Tumorgewicht lag bei 2,30 Gramm bei einem Durchschnittsgewicht von 1,44 Gramm und einem Median von 1,35 Gramm. Die Standardabweichung betrug 0,43 Gramm mit einer Varianz von 0,19.

Tabelle 15: Überleben und Tumorgewicht für die einzelnen Tiere der BxPC3 luc-Kontrollgruppe aus dem Xenograftmodell.

Tiernummer	Zelllinie	Überleben (d)	Tumorgewicht (g)
209-1-15	BxPC3 luc	69	0,73
210-1-15	BxPC3 luc	72	1,41
214-1-15	BxPC3 luc	77	1,28
214-2-15	BxPC3 luc	77	2,30

227-1-15	BxPC3 luc	86	1,62
230-1-15	BxPC3 luc	87	1,22
234-1-15	BxPC3 luc	91	1,59
234-2-15	BxPC3 luc	91	1,87
234-3-15	BxPC3 luc	91	1,15
234-4-15	BxPC3 luc	91	1,24

Zusammenfassung

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben beider Gruppen (Abbildung 3; $p=0,1834$, log-rank test), bei etwas größeren Tumormassen in der luc-Gruppe jedoch auch letzteres ohne Signifikanz ($p=0,1791$, t-test).

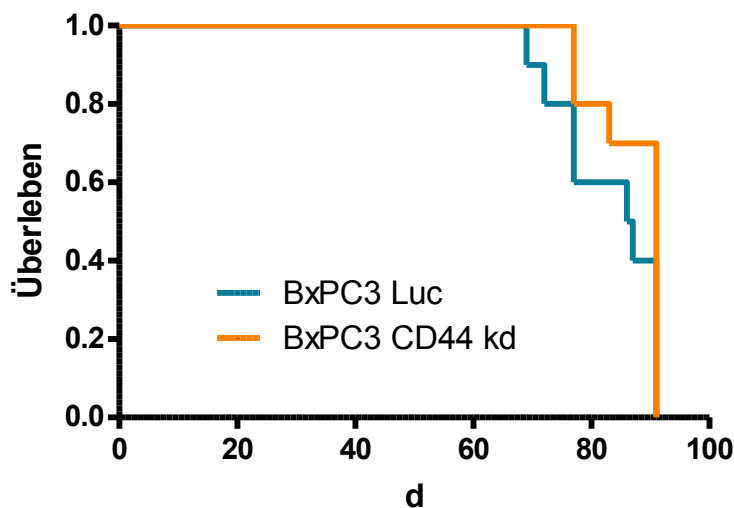


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve für das Überleben der Mäuse mit der injizierten Zelllinie BxPC3. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,1834$, log-rank test).

Nachfolgend ist in Abbildung 4 eine direkte Gegenüberstellung der Kaplan-Meier-Kurven beider Zelllinien aufgezeigt. Es zeigte sich deutlich das verkürzte Überleben von PaCa 5061 CD44 kd im Gegensatz zur Zelllinie BxPC3. Bei BxPC3 zeigten die Knockdowngruppe und die luc-Gruppe ein ähnlich langes Überleben.

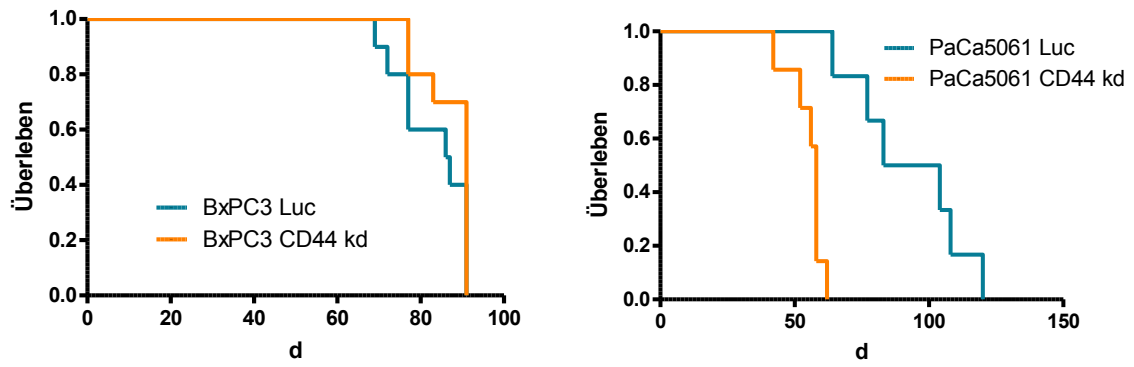


Abbildung 4: Gegenüberstellung der Kaplan-Meier-Kurven für das Überleben von BxPc3 und PaCa 5061. Man erkennt deutlich das verkürzte Überleben von PaCa 5061 CD44 kd im Gegensatz zur Zelllinie BxPc3.

3.2 Auswertung der Alu-PCR

3.2.1 Auswertung für PaCa 5061

PaCa 5061 CD44-Knockdown (CD44 kd)

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen für die Zelllinie PaCa 5061 CD44 kd betrug 28, die maximale Anzahl 509, mit einem Durchschnittswert von 248 und einem Median von 277. Die Standardabweichung betrug 168,38 Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen mit einer Varianz von 28352,62.

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut für die Zelllinie PaCa 5061 CD44 kd betrug 6, die maximale Anzahl 402, mit einem Durchschnittswert von 200 und einem Median von 261. Die Standardabweichung betrug 137,41 Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut mit einer Varianz von 18881,62.

Tabelle 16: Anzahl humaner Tumorzellen in Blut und Lunge der Tiere der PaCa 5061 CD44 kd-Gruppe, ermittelt durch die Alu-PCR.

Tiernummer	Zelllinie	Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen	Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut
175-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	65	62
195-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	277	141
199-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	28	262
200-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	339	402
200-2-15	PaCa 5061 CD44 kd	331	269
200-3-15	PaCa 5061 CD44 kd	509	261
202-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	184	6

PaCa 5061 Kontrollgruppe (luc)

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen für die Zelllinie PaCa 5061 luc betrug 0, die maximale Anzahl 2, mit einem Durchschnittswert von 1 und einem Median von 1. Die Standardabweichung betrug 0,76 Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen mit einer Varianz von 0,57.

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut für die Zelllinie PaCa 5061 luc betrug 0, die maximale Anzahl 28, mit einem Durchschnittswert von 5 und einem Median von 1. Die Standardabweichung betrug 10,13 Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut mit einer Varianz von 102,57.

Tabelle 17: Anzahl humaner Tumorzellen in Blut und Lunge der Tiere der PaCa 5061 luc-Gruppe, ermittelt durch die Alu-PCR.

Tiernummer	Zelllinie	Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen	Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut
207-1-15	PaCa 5061 luc	2	1
213-1-15	PaCa 5061 luc	1	4
223-1-15	PaCa 5061 luc	2	28
244-1-15	PaCa 5061 luc	1	0
247-1-15	PaCa 5061 luc	1	3
265-1-15	PaCa 5061 luc	0	0
282-1-15	PaCa 5061 luc	0	0

Zusammenfassung

Für PaCa 5061 CD44 kd ließen sich signifikant mehr Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen feststellen (Abbildung 5; $p=0,0006$). Dieser Unterschied konnte auch in der mikroskopischen Metastasenzählung (siehe Auswertung der Metastasenzählung) bestätigt werden. Auch konnte man einen signifikanten Unterschied in den Blutergebnissen der Alu-PCR erkennen (Abbildung 6; $p=0,0023$). Hier zeigten sich mehr zirkulierende Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten für PaCa 5061 CD44 kd. Beide Auswertungen zeigen also eine signifikant höhere Anzahl an Tumorzellen im Blut und in der Lunge der Knockdowngruppe ($p<0,05$).

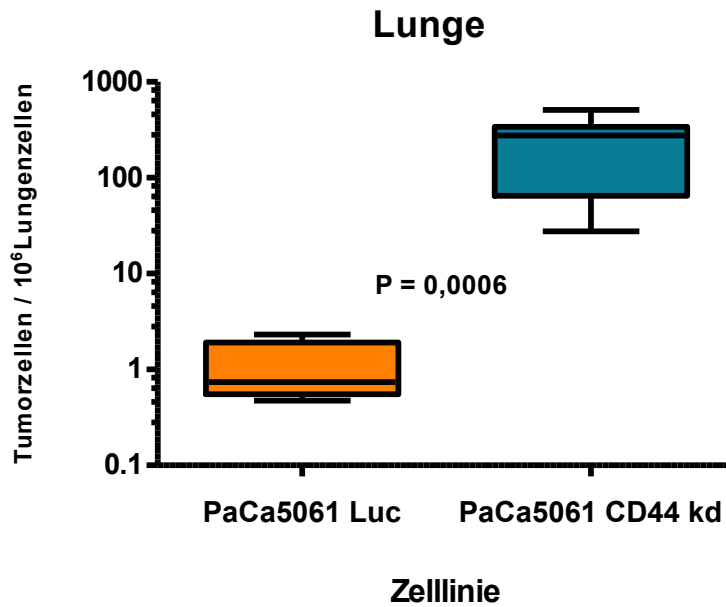


Abbildung 5: Dargestellt sind die Alu-PCR-Daten der Lungen der Mäuse für PaCa 5061. Man erkennt signifikant mehr Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen in der Knockdowngruppe ($p=0,0006$).

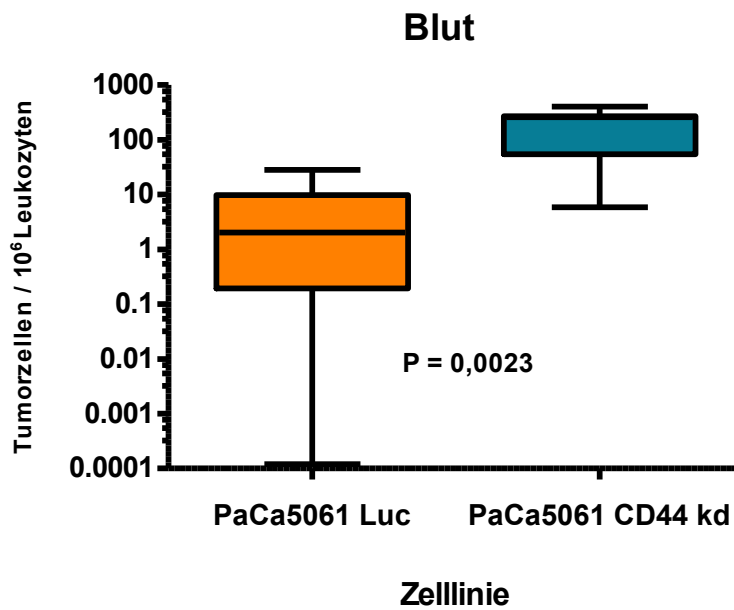


Abbildung 6: Dargestellt sind die Alu-PCR-Daten des Blutes der Mäuse für PaCa 5061. Man erkennt signifikant mehr Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten in der Knockdowngruppe ($p=0,0023$).

3.2.2 Auswertung für BxPC3

BxPC3 CD44-Knockdown (CD44 kd)

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen für die Zelllinie BxPC3 CD44 kd betrug 0, die maximale Anzahl 673, mit einem Durchschnittswert von 82 und einem Median von 15,5. Die Standardabweichung betrug 208,47 Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen mit einer Varianz von 43459,07.

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut für die Zelllinie BxPC3 CD44 kd betrug 47, die maximale Anzahl 1185, mit einem Durchschnittswert von 400 und einem Median von 204,5. Die Standardabweichung betrug 393,34 Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut mit einer Varianz von 154713,57.

Tabelle 18: Anzahl humaner Tumorzellen in Blut und Lunge der Tiere der BxPC3 CD44 kd-Gruppe, ermittelt durch die Alu-PCR.

Tiernummer	Zelllinie	Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen	Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut
215-1-15	BxPC3 CD44 kd	30	509
215-2-15	BxPC3 CD44 kd	31	104
224-1-15	BxPC3 CD44 kd	673	1185
233-1-15	BxPC3 CD44 kd	0	81
233-2-15	BxPC3 CD44 kd	57	562
233-3-15	BxPC3 CD44 kd	0	206
233-4-15	BxPC3 CD44 kd	0	161
233-5-15	BxPC3 CD44 kd	6	203
233-6-15	BxPC3 CD44 kd	25	939
233-7-15	BxPC3 CD44 kd	0	47

BxPC3 Kontrollgruppe (luc)

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen für die Zelllinie BxPC3 luc betrug 0, die maximale Anzahl 982, mit einem Durchschnittswert von 164 und einem Median von 74. Die Standardabweichung betrug 295,57 Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen mit einer Varianz von 87360,1.

Die minimale Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut für die Zelllinie BxPC3 luc betrug 6, die maximale Anzahl 5645, mit einem Durchschnittswert von 634 und einem Median von 65. Die Standardabweichung betrug 1762,03 Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut mit einer Varianz von 3104757,73.

Tabelle 19: Anzahl humaner Tumorzellen in Blut und Lunge der Tiere der BxPC3 luc-Gruppe, ermittelt durch die Alu-PCR.

Tiernummer	Zelllinie	Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen	Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut
209-1-15	BxPC3 luc	27	6
210-1-15	BxPC3 luc	57	24
214-1-15	BxPC3 luc	130	148
214-2-15	BxPC3 luc	190	231
227-1-15	BxPC3 luc	91	21
230-1-15	BxPC3 luc	159	92
234-1-15	BxPC3 luc	0	38
234-2-15	BxPC3 luc	982	109
234-3-15	BxPC3 luc	3	28
234-4-15	BxPC3 luc	0	5645

Zusammenfassung

Für BxPC3 luc ließen sich mehr Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen feststellen, dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant (Abbildung 7; $p=0,1432$). Die Blutergebnisse der Alu-PCR zeigten, dass für BxPC3 CD44 kd mehr zirkulierende Tumorzellen im Blut zu finden waren. Allerdings war dieses Ergebnis knapp nicht signifikant (Abbildung 8;

p=0,0524). Hier zeigte sich also eine erhöhte Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen in der luc-Gruppe, während im Knockdown eine höhere Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten im Blut festgestellt werden konnte.

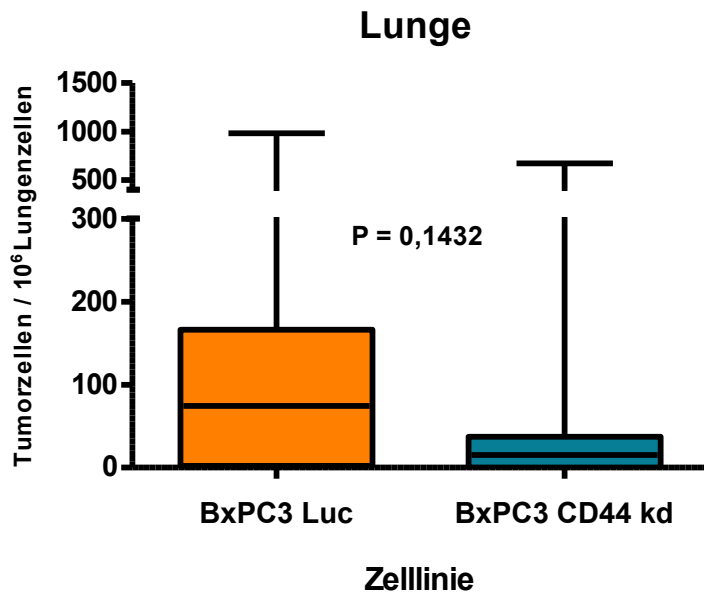


Abbildung 7: Dargestellt sind die Alu-PCR-Daten der Lungen der Mäuse für BxPC3. Man erkennt mehr Tumorzellen pro 10^6 Mauslungenzellen in der luc-Gruppe (p=0,1432).

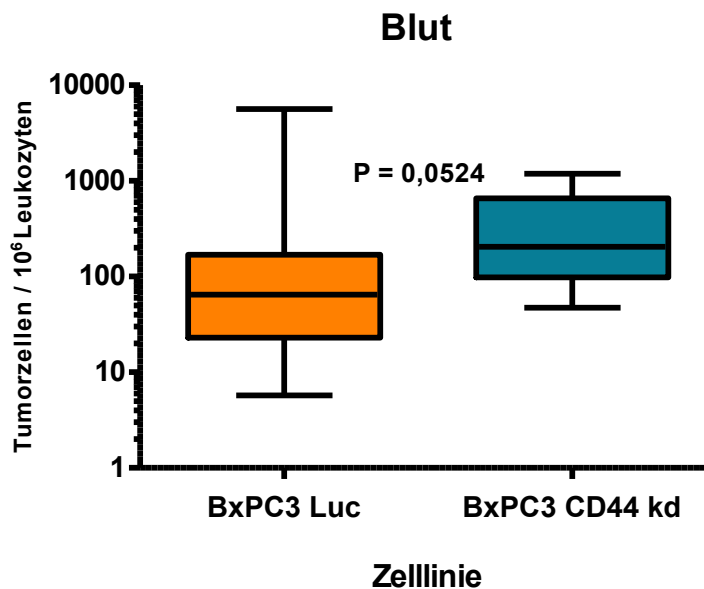


Abbildung 8: Dargestellt sind die Alu-PCR-Daten des Blutes der Mäuse für BxPC3. Man erkennt mehr Tumorzellen pro 10^6 Mausleukozyten in der Knockdowngruppe (p=0,0524).

Ein Knockdown von CD44 scheint in beiden Zelllinien eine vermehrte Bereitschaft zur Auswanderung der Zellen ins Blut zu zeigen. Für die letztendliche Ausbildung von Metastasen selbst scheint CD44 nicht essentiell zu sein, da die immunhistochemische Färbung auf CD44 in allen Lungenschnitten negativ ausfiel und sich für PaCa 5061 signifikant eine Zunahme der Metastasierung, für BxPC3 allerdings (wenn auch (knapp) nicht signifikant) eine Abnahme der Metastasierung im Knockdown zeigte.

3.3 Auswertung der Metastasenzählung

Die Gesamtzahl der Metastasen pro Tier wurde mit folgender Formel berechnet:

$(\bar{\sigma} \text{ aus Zählung} \times \text{Schnitte (gesamt)} - 20\%) \times 1,833$

als Beispiel: $(9,7 \times 290 \times 0,8) \times 1,833 = 4125$

3.3.1 Auswertung für PaCa 5061

PaCa 5061 CD44-Knockdown (kd)

Tabelle 20: Daten zur Metastasenzählung für PaCa 5061 CD44 kd (Knockdown).

Gesamtanzahl der Schnitte, die durchschnittliche Anzahl an Metastasen aus der mikroskopischen Zählung, sowie die Gesamtzahl der Metastasen, die sich aus oben beschriebener Formel (siehe 3.3) errechnet.

Tiernummer	Zelllinie	Schnitte (gesamt)	$\bar{\sigma}$ aus Zählung	Gesamtzahl
175-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	290	9,7	4125
195-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	350	8,4	4311
199-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	280	5,3	2176
200-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	330	6,4	3097
200-2-15	PaCa 5061 CD44 kd	410	23,6	14189
200-3-15	PaCa 5061 CD44 kd	390	5,6	3203
202-1-15	PaCa 5061 CD44 kd	410	3,5	2104

PaCa 5061 Kontrollgruppe (luc)

Tabelle 21: Daten zur Metastasenzählung für PaCa 5061 luc (Kontrollgruppe).

Gesamtanzahl der Schnitte, die durchschnittliche Anzahl an Metastasen aus der mikroskopischen Zählung, sowie die Gesamtzahl der Metastasen, die sich aus oben beschriebener Formel (siehe 3.3) errechnet.

Tiernummer	Zelllinie	Schnitte (gesamt)	$\bar{\sigma}$ aus Zählung	Gesamtzahl
207-1-15	PaCa 5061 luc	330	4,0	1936
213-1-15	PaCa 5061 luc	360	2,0	1056

223-1-15	PaCa 5061 luc	340	4,9	2443
244-1-15	PaCa 5061 luc	340	8,2	4088
247-1-15	PaCa 5061 luc	400	6,1	3578
265-1-15	PaCa 5061 luc	390	3,3	1887
282-1-15	PaCa 5061 luc	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden

Zusammenfassung

Der Durchschnitt der Gesamtzahl der Metastasen pro Tier lag in der Knockdowngruppe bei 4744 und damit fast doppelt so hoch als der Durchschnitt in der luc-Gruppe (\bar{x} 2498, wobei ein Tier nicht mitgezählt werden konnte), jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ($p=0,1784$; t-test, Abbildung 9). Dieses Ergebnis ließ sich aber durch die Alu-PCR signifikant untermauern (Abbildung 5; $p=0,0006$; t-test).

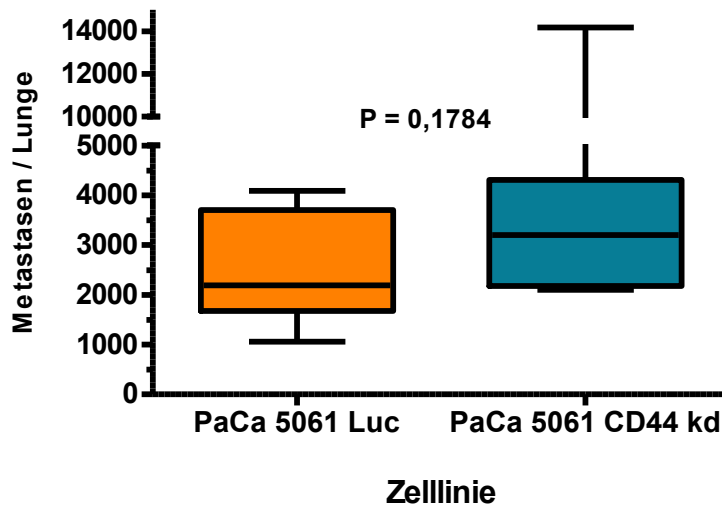


Abbildung 9: Dargestellt sind die Werte für die Metastasenzählung von PaCa 5061.

Man erkennt mehr Metastasen in der Knockdowngruppe im Vergleich zur luc-Gruppe ($p=0,1784$).

3.3.2 Auswertung für BxPC3

BxPC3 CD44-Knockdown (CD44 kd)

Tabelle 22: Daten zur Metastasenzählung für BxPC3 CD44 kd (Knockdown).

Gesamtanzahl der Schnitte, die durchschnittliche Anzahl an Metastasen aus der mikroskopischen Zählung, sowie die Gesamtzahl der Metastasen, die sich aus oben beschriebener Formel (siehe 3.3) errechnet.

Tiernummer	Zelllinie	Schnitte (gesamt)	ø aus Zählung	Gesamtzahl
215-1-15	BxPC3 CD44 kd	320	4,8	2252
215-2-15	BxPC3 CD44 kd	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
224-1-15	BxPC3 CD44 kd	430	2,7	1702
233-1-15	BxPC3 CD44 kd	380	2,4	1337
233-2-15	BxPC3 CD44 kd	400	3,2	1877
233-3-15	BxPC3 CD44 kd	390	5,3	3031
233-4-15	BxPC3 CD44 kd	270	2,0	792
233-5-15	BxPC3 CD44 kd	390	1,1	629
233-6-15	BxPC3 CD44 kd	400	2,3	1349
233-7-15	BxPC3 CD44 kd	610	0,9	805

BxPC3 Kontrollgruppe (luc)

Tabelle 23: Daten zur Metastasenzählung für BxPC3 luc (Kontrollgruppe).

Gesamtanzahl der Schnitte, die durchschnittliche Anzahl an Metastasen aus der mikroskopischen Zählung, sowie die Gesamtzahl der Metastasen, die sich aus oben beschriebener Formel (siehe 3.3) errechnet.

Tiernummer	Zelllinie	Schnitte (gesamt)	ø aus Zählung	Gesamtzahl
209-1-15	BxPC3 luc	430	10,3	6495
210-1-15	BxPC3 luc	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nicht vorhanden
214-1-15	BxPC3 luc	390	12,6	7206
214-2-15	BxPC3 luc	370	13,1	7108
227-1-15	BxPC3 luc	560	4,2	3449

230-1-15	BxPC3 luc	350	8,8	4517
234-1-15	BxPC3 luc	480	7,0	4927
234-2-15	BxPC3 luc	480	7,5	5279
234-3-15	BxPC3 luc	380	2,4	1337
234-4-15	BxPC3 luc	310	5,9	2682

Zusammenfassung

Der Durchschnitt der Gesamtzahl der Metastasen pro Tier lag in der luc-Gruppe bei 4778 und damit statistisch signifikant höher als der Durchschnitt in der Knockdowngruppe (\bar{x} 1530; $p=0,0004$; t-test). Dieses Ergebnis konnte auch mithilfe der durchgeführten Alu-PCR untermauert werden, allerdings ohne statistische Signifikanz (Abbildung 7; $p=0,1432$).

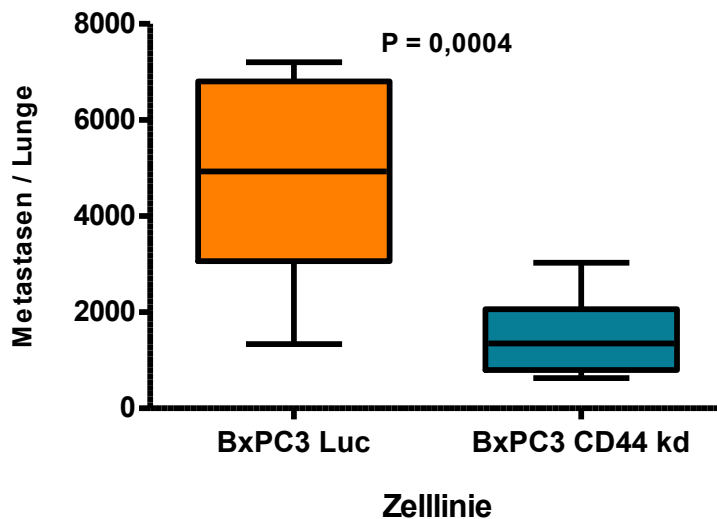


Abbildung 10: Dargestellt sind die Werte für die Metastasenzählung von BxPC3.

Man erkennt mehr Metastasen in der luc-Gruppe im Vergleich zur Knockdowngruppe ($p=0,0004$).

3.4 Auswertung der Färbungen

3.4.1 HE-Färbung

3.4.1.1 HE in den Primärtumoren

In dieser Übersichtsfärbung wurden die Primärtumoren anhand folgender Kriterien ausgewertet: Stromakomponente, Formation duktaler Strukturen, Nekrosen, Mitosen und allgemeine Anfärbung. In PaCa 5061 luc fand sich ein teilweise gut ausgeprägtes Stroma (genaueres siehe Masson-Goldner-Färbung) und viele unterschiedlich große duktale Strukturen (Abbildung 16). Es zeigte sich in dieser Zelllinie ein aggressives und ungeordnetes Erscheinungsbild, geprägt von stark nekrotischen Bereichen und vielen Mitosen. Es waren eine deutliche Kernpolymorphie und große Zellkerne mit deutlichen Nukleoli sichtbar (Abbildung 18). PaCa 5061 luc zeigte von allen Zelllinien die deutlichste Ausprägung siegelringartiger Zellen (Abbildung 14).

Für PaCa 5061 CD44 kd zeigte sich wie für PaCa 5061 luc ein ungeordnetes, aggressives Bild mit großen nekrotischen Arealen (Abbildung 11), vielen Mitosen (Abbildung 12) und ausgeprägter Kernpolymorphie (Abbildung 18). Dieses aggressive Erscheinungsbild ist also nicht auf den CD44-Knockdown zurückzuführen, da es sowohl in der luc- als auch in der Knockdowngruppe gefunden werden konnte und damit am ehesten zelllinienspezifisch ist. Es fand sich ein gut ausgeprägtes Stroma und wenige sehr kleine duktale Strukturen mit und ohne Lumen. Die weiter oben erwähnten siegelringartigen Zellbereiche fanden sich hier nicht. Die Stromakomponente für BxPC3 luc war gut ausgeprägt und es zeigten sich sehr viele unterschiedlich große duktale Formationen mit Schleimfüllung (Abbildung 13). Nekrosen und Mitosen waren weniger vorhanden und es zeigten sich viele relativ geordnet wirkende Bereiche. Auch hier bestand die Kernpolymorphie, jedoch bei deutlich differenzierterem Erscheinungsbild. Siegelringartige Zellen waren auch hier zu finden, jedoch deutlich weniger als bei PaCa 5061 luc (Abbildung 15).

Für BxPC3 CD44 kd zeigte sich die Stromakomponente dagegen sehr stark ausgeprägt und es fanden sich vornehmlich wenig unterschiedlich große duktale Strukturen (Abbildung 17). Ebenso fanden sich teilweise stark ausgeprägte Nekrosen. Mitosen waren in Teilbereichen viel, in anderen Teilbereichen weniger zu finden. Es wirkte alles undifferenziert und ungeordnet, teilweise fanden sich zwar geordnet wirkende Bereiche,

hingegen aber auch einige Bereiche mit starker Kernpolymorphie und Nukleoli (Abbildung 18). Siegelringartige Zellbereiche waren für BxPC3 CD44 kd keine zu finden. In dieser Zelllinie zeigte der Knockdown ein insgesamt weniger differenziertes Erscheinungsbild als die luc-Gruppe.

Die Tatsache, dass sich in den Knockdowngruppen insgesamt weniger duktile Strukturen darstellen ließen, lässt auf eine schlechtere Differenzierung schließen, während die luc-Gruppen in der Lage waren, viele bis sehr viele unterschiedlich große pankreasgangartige Strukturen auszubilden.

Tabelle 24: Ausprägungen der einzelnen histomorphologischen Befunde (+++ sehr stark ausgeprägt, ++ stark ausgeprägt, + leicht ausgeprägt).

	PaCa 5061 luc	PaCa 5061 CD44 kd	BxPC3 luc	BxPC3 CD44 kd
Nekrosen	+++	+++	+	++
Mitosen	+++	+++	+	(++)
duktale Strukturen	++	+	+++	+
Stroma	+	+	++	+++
Differenzierung	+	+	++	+

In den nachfolgenden Abbildungen ist eine Auswahl an beispielhaften Darstellungen der histomorphologischen Befunde aus den Primärtumoren in HE-Färbung aufgezeigt.

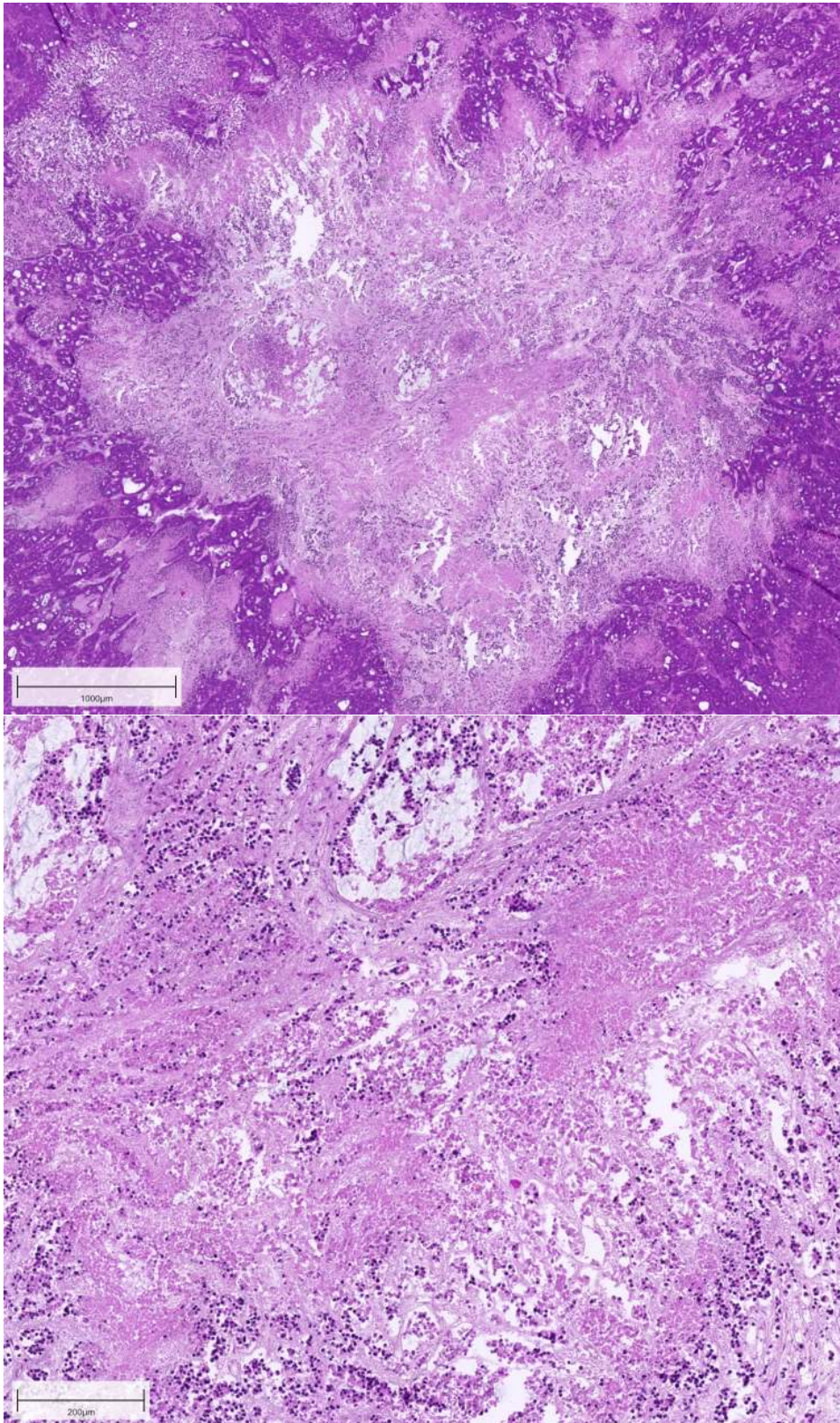


Abbildung 11: Primärtumor von PaCa 5061 CD44 kd in HE-Färbung, Maßstab 1000µm (oben) und 200µm (unten). Dargestellt ist eine große Nekrose zentral im Tumor (oben) mit stärkerer Vergrößerung (unten).

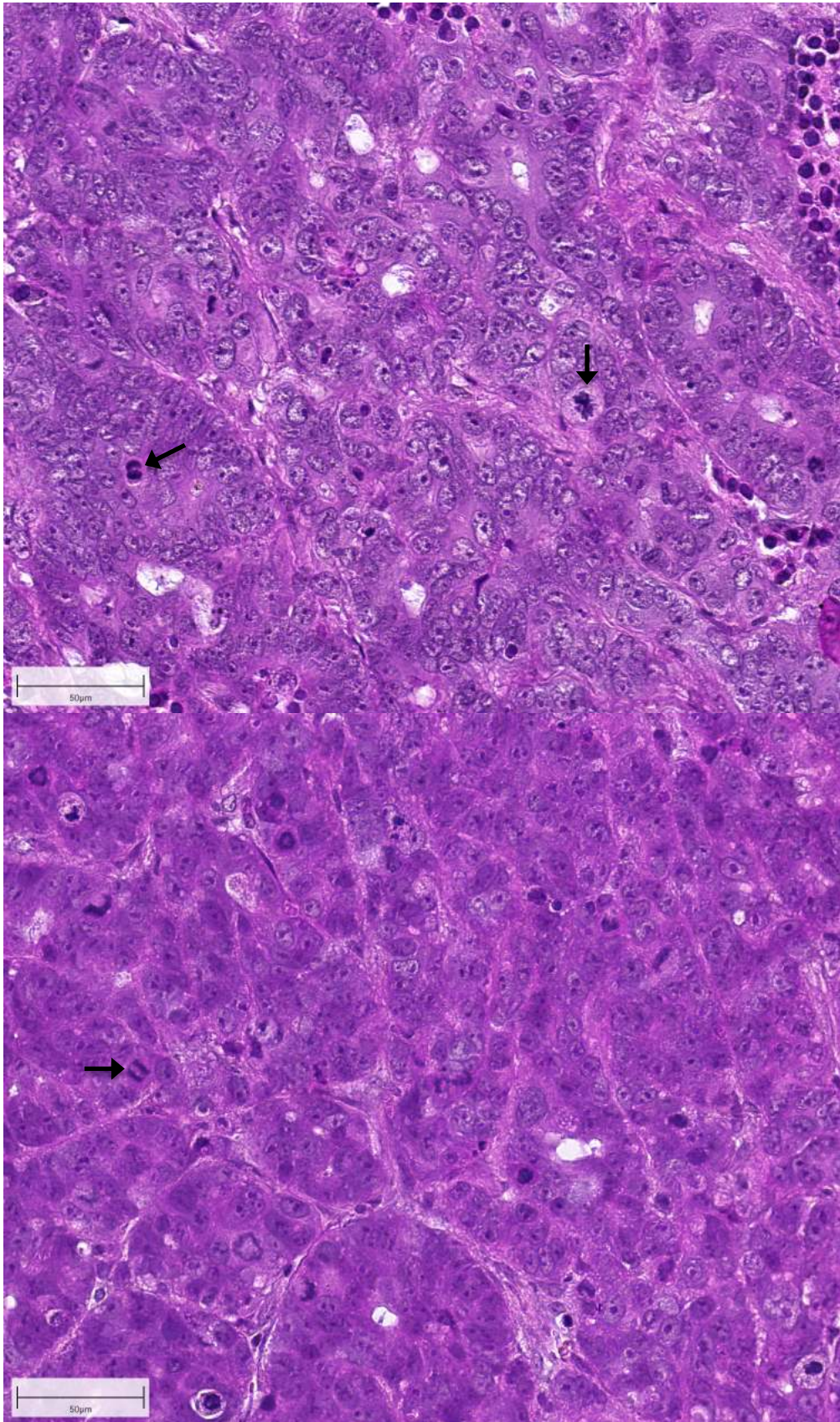


Abbildung 12: Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd in HE-Färbung, Maßstab 50µm.
Dargestellt sind zwei verschiedene Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd. Es lassen sich einige Mitosen erkennen (Pfeile).

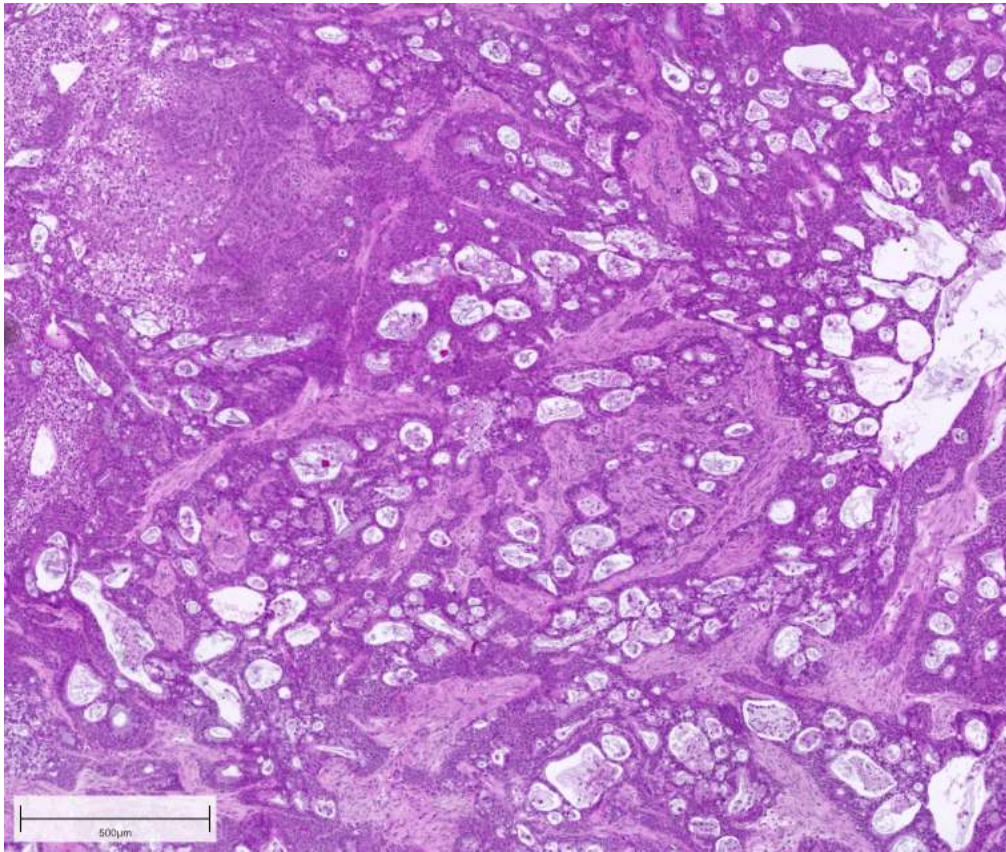


Abbildung 13: Primärtumor von BxPC3 luc in HE-Färbung, Maßstab 500μm.
Dargestellt ist ein großes Areal mit duktalem Strukturen verschiedener Größen.

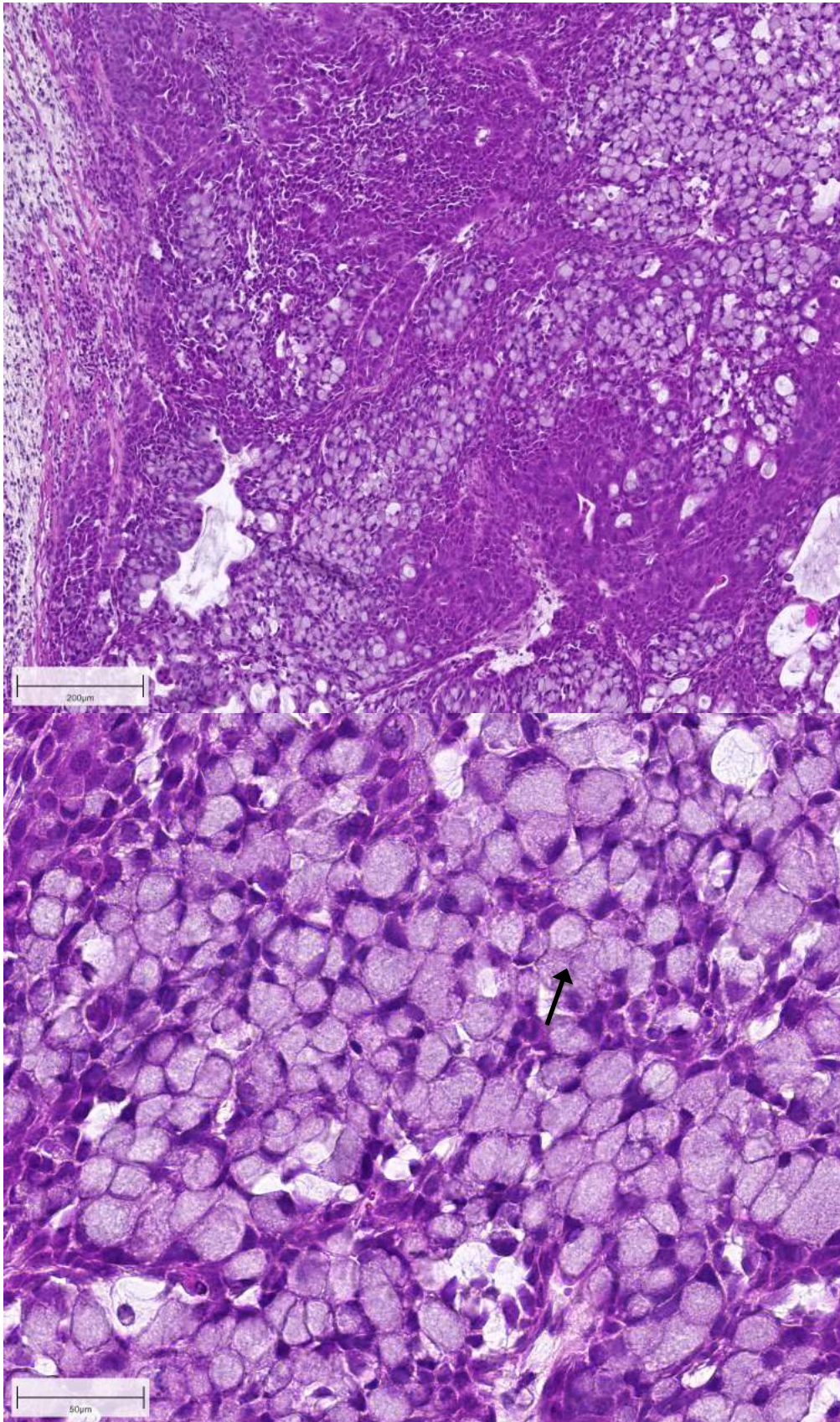


Abbildung 14: Primärtumor von PaCa 5061 luc in HE-Färbung, Maßstab 200µm (oben) und 50µm (unten). Zu sehen sind die siegelringartigen Zellen (Pfeil).

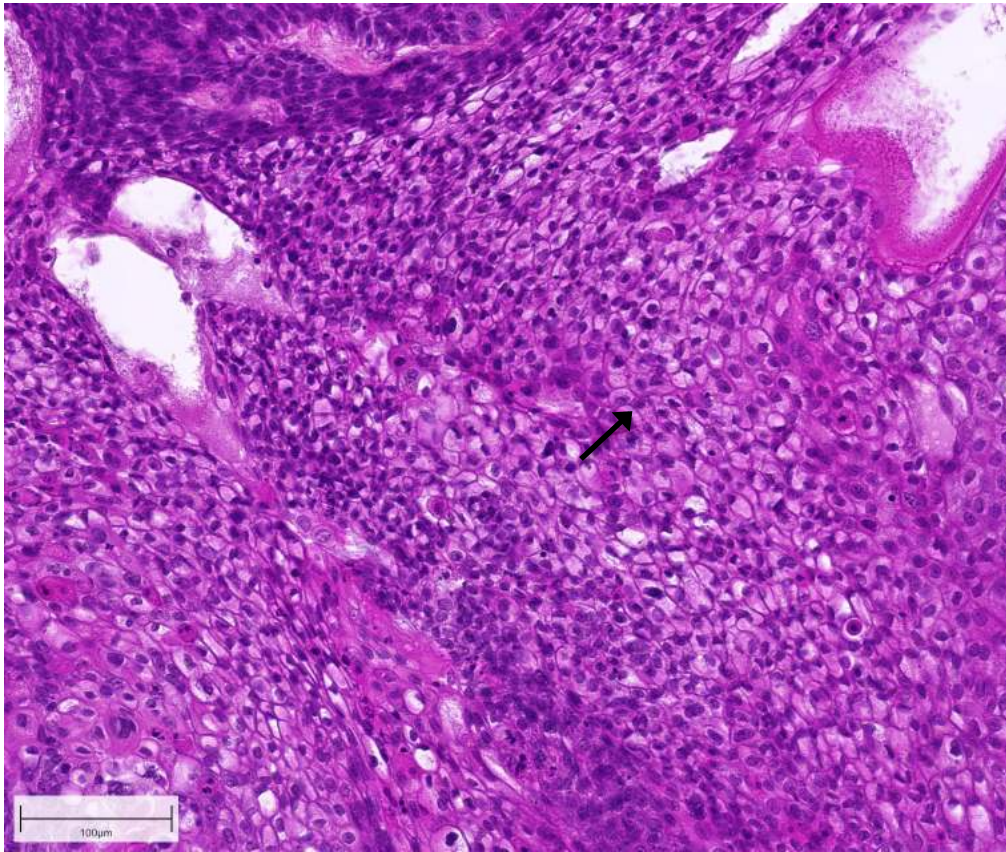


Abbildung 15: Primärtumor von BxPC3 luc in HE-Färbung, Maßstab 100µm.
Dargestellt sind auch hier die siegelringartigen Zellbereiche (Pfeil).

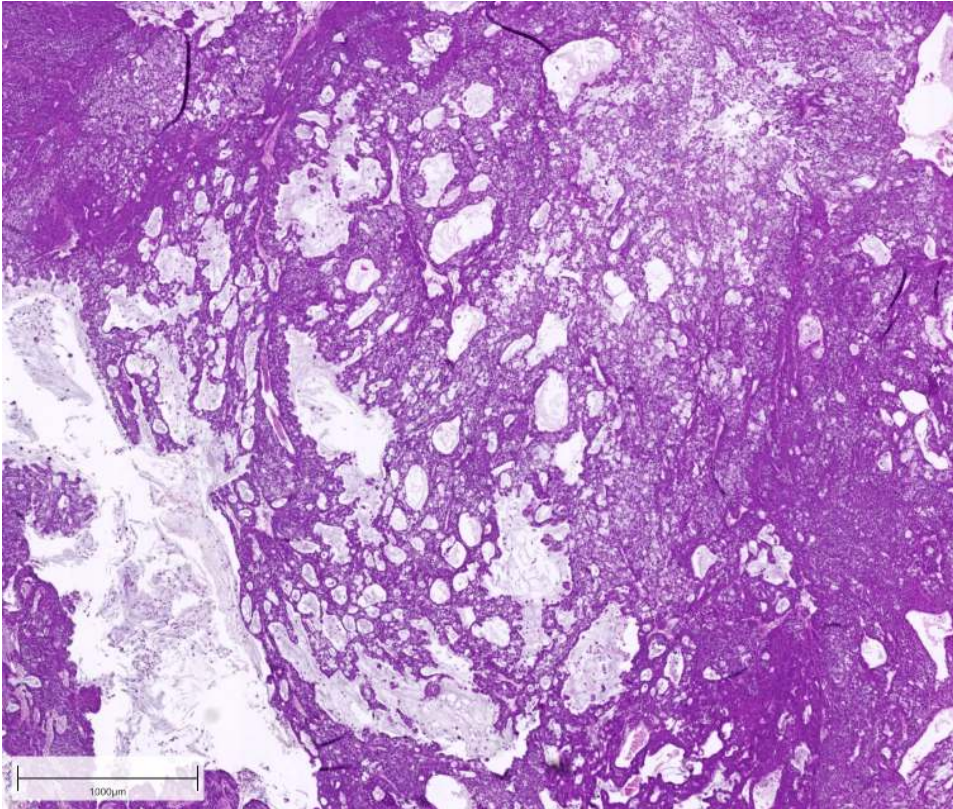


Abbildung 16: Primärtumor von PaCa 5061 luc in HE-Färbung. Maßstab 1000 μ m. Zu sehen sind einige schleimgefüllte duktale Strukturen unterschiedlicher Größe, verteilt über den gesamten Ausschnitt.

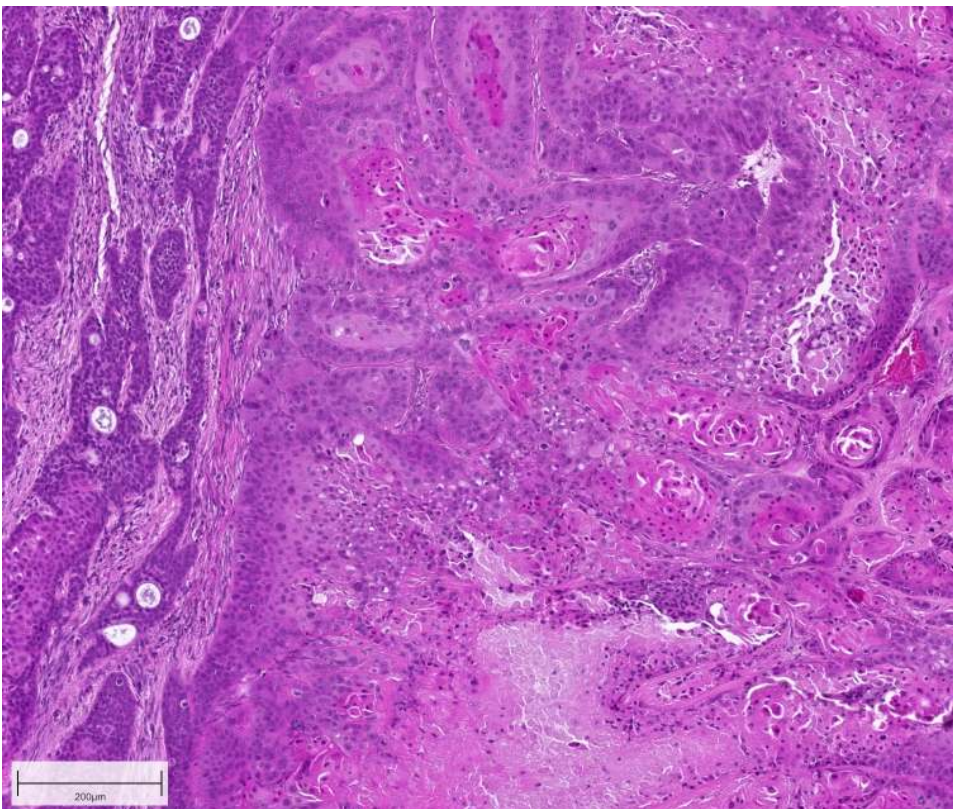
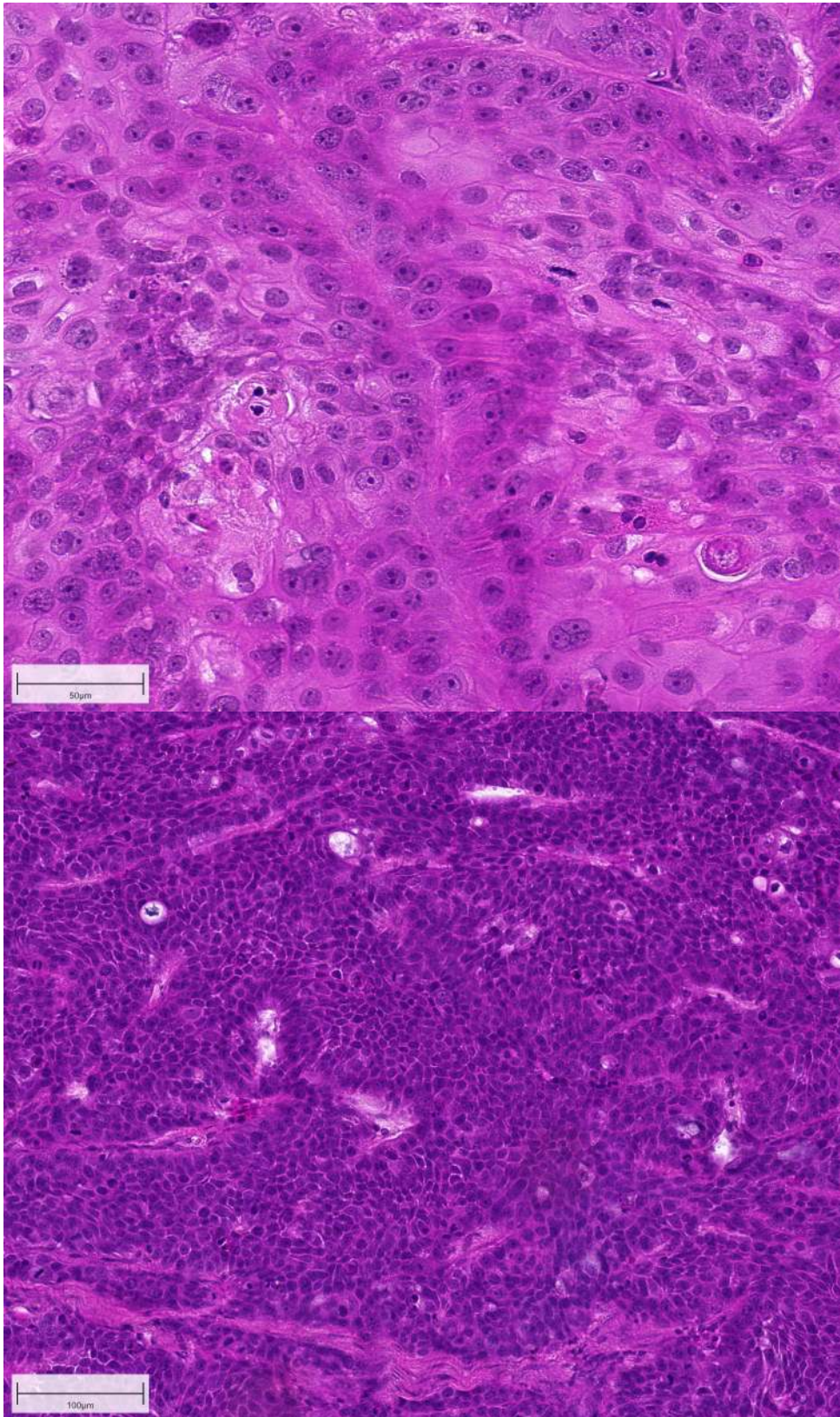


Abbildung 17: Primärtumor von BxPC3 CD44 kd in HE-Färbung. Maßstab 200 μ m. Auf der linken Seite sind dicke Stromastränge zu erkennen. Insgesamt lassen sich nur wenig duktale Strukturen erkennen.



(siehe S. 62, zugehörig zu Abbildung 18)

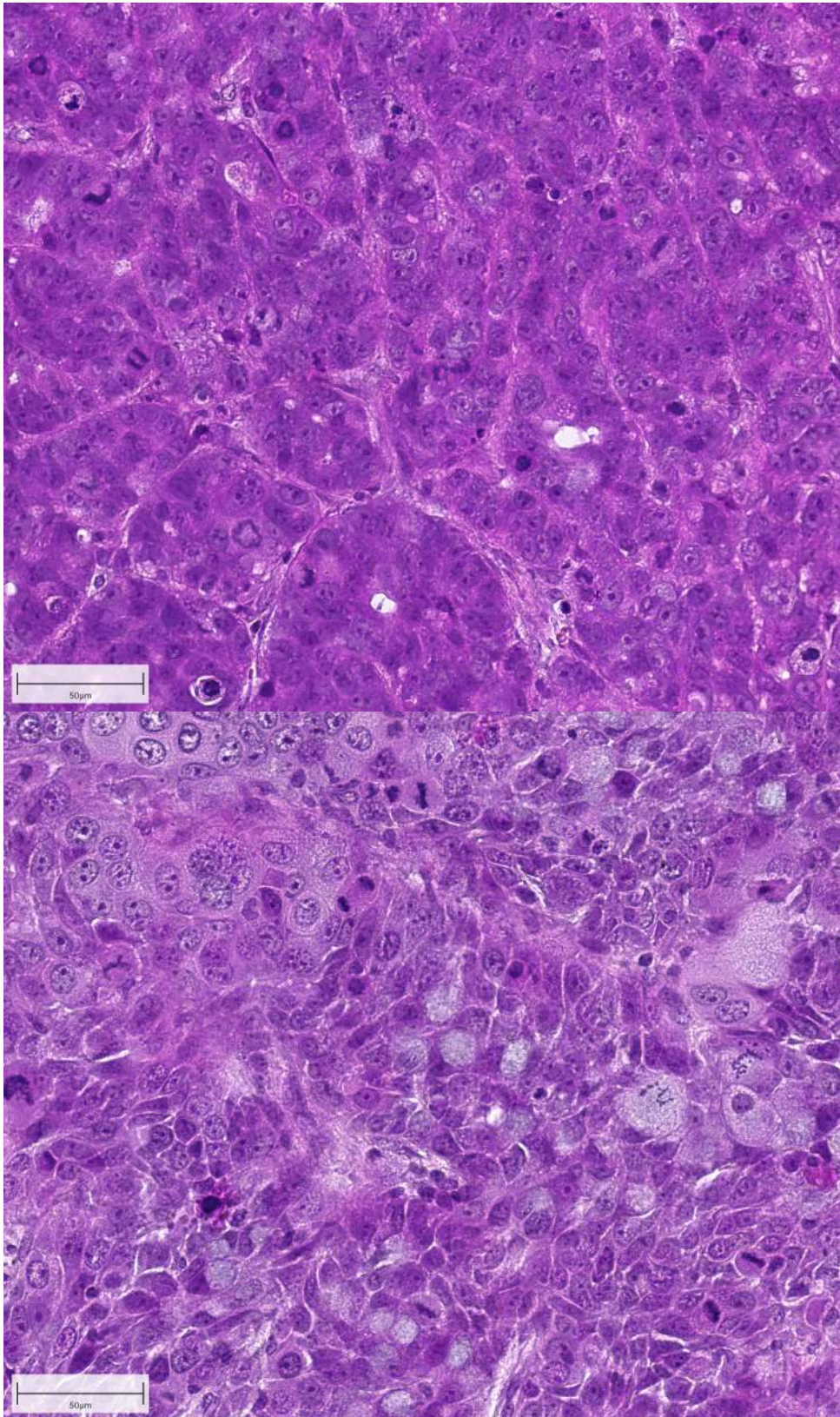


Abbildung 18: Primärtumoren von BxPC3 CD44 kd (oben S. 61, Maßstab 50µm), BxPC3 luc (unten S. 61, Maßstab 100µm), PaCa 5061 CD44 kd (oben S. 62, Maßstab 50µm) und PaCa 5061 luc (unten S. 62, Maßstab 50µm) in HE-Färbung. Dargestellt sind beispielhafte Ausschnitte von Primärtumoren aus den verschiedenen Gruppen. Man erkennt deutliche Malignitätskriterien (Kernpolymorphie, Mitosen, Nukleoli, Riesenzellen).

3.4.1.2 HE in den Lungenmetastasen

Die HE-Färbung wurde zum Auszählen der Lungenmetastasen verwendet (Abbildung 19). Für beide Zelllinien, jeweils sowohl in der luc-Gruppe, als auch im CD44-Knockdown, fanden sich Metastasen, die innerhalb jeder Gruppe unterschiedlich groß waren. Die Metastasen zeigten die bekannten Malignitätskriterien. In sehr großen Metastasen bildeten sich, ähnlich wie in den Primärtumoren, duktale Strukturen aus (Abbildung 20). Auch konnte in allen Gruppen ein heterogenes Bild des Vorhandenseins von Metastasen, sowie Unterschiede in Größe und Gestalt der Metastasen festgestellt werden. In keiner Gruppe ließ sich ein besonderes Muster (beispielsweise nur kleine oder nur große Metastasen) feststellen.

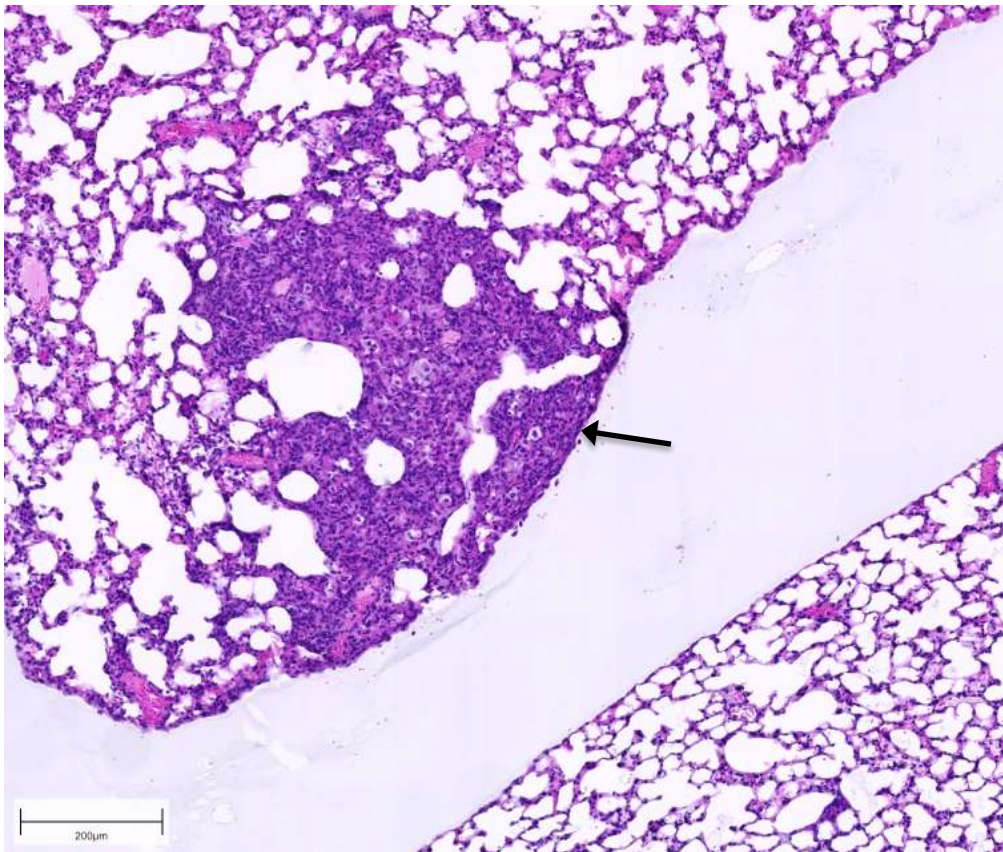


Abbildung 19: Lungenmetastase von PaCa 5061 CD44 kd in HE-Färbung, Maßstab 200µm. Dargestellt ist eine singuläre Lungenmetastase (Pfeil) eines Primärtumors von PaCa 5061 CD44 kd, umgeben von physiologischem Mauslungenparenchym.

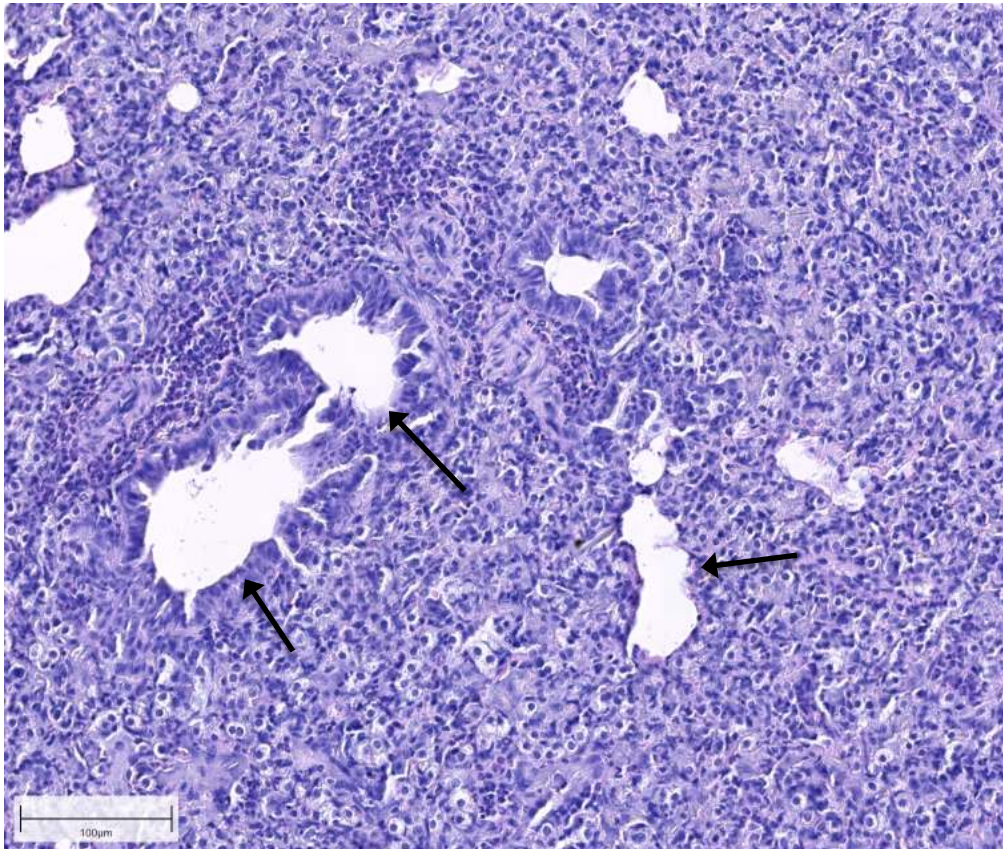


Abbildung 20: Lungenmetastase von BxPC3 luc in HE-Färbung, Maßstab 100 μ m. Dargestellt ist eine große Metastase (gesamter Ausschnitt) eines Primärtumors von BxPC3 luc. Man erkennt deutliche gangartige Strukturen innerhalb der Metastase (Pfeile).

3.4.2 PAS-Färbung

3.4.2.1 PAS in den Primärtumoren

Diese Färbung wurde zur besonderen Hervorhebung der Muzine und Kohlenhydratstrukturen verwendet, die sich unter anderem im Stroma und den duktalem Strukturen befinden, sowie zur genaueren Darstellung der schleimproduzierenden siegelringartigen Zellen, die sich vor allem in den luc-Zelllinien von PaCa 5061 und BxPC3 fanden (Abbildung 21). Je größer die gangartigen Strukturen waren, desto eher war kein Schleim im Lumen vorhanden. Die Farbintensitäten reichten von hellrosa (Stroma) bis dunkellila (Schleimfüllung).

Die Tumoren von PaCa 5061 luc zeigten insgesamt eine starke Anfärbung (Abbildung 22). Die siegelringartigen Zellen, die bereits in der HE-Färbung aufgefallen waren, färbten sich stark an und zeigten sich komplett PAS-positiv. Sie waren überall in den Präparaten zu finden und bildeten teilweise große Ansammlungen. Die luc-Gruppe von BxPC3 zeigte ein

ähnliches Anfärbemuster (Abbildung 23), jedoch waren hier weniger siegelringartige Zellen zu finden. Für BxPC3 CD44 kd fand sich eine relativ gute Anfärbbarkeit, die jedoch schwächer ausgeprägt war als in den luc-Gruppen beider Zelllinien. Es zeigten sich, wie in den anderen Gruppen auch, einige Bereiche stark angefärbt. Siegelringartige Zellbereiche waren hier keine sichtbar. Auch in den Tumoren von PaCa 5061 CD44 kd fanden sich keine siegelringartigen Zellbereiche. Hier zeigte sich auch nur eine schwache Anfärbung insgesamt. Zudem waren, ähnlich wie bei BxPC3 CD44 kd, viel weniger duktile Strukturen vorhanden. Diese gangartigen Formationen (beispielhaft in Abbildung 24) fanden sich vornehmlich in den luc-Gruppen. Tendenziell zeigten die luc-Gruppen eine stärkere Anfärbung als die Knockdown-Gruppen (Abbildungen 22 und 23), was für eine stärkere Differenzierung sprechen könnte.

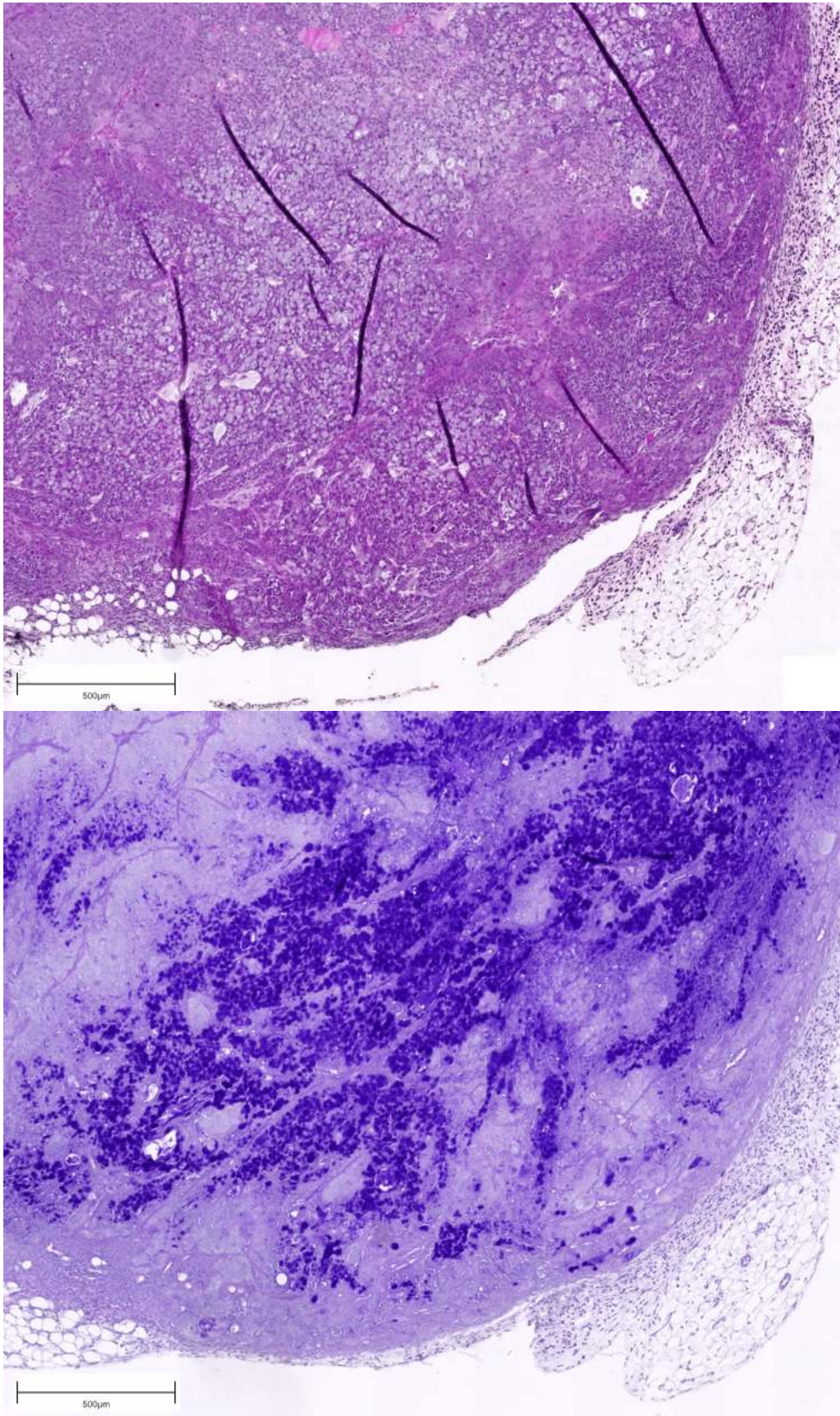


Abbildung 21: Vergleich der siegelringartigen Zellen in einem Primärtumor von PaCa 5061 luc in HE-Färbung (oben) und PAS-Färbung (unten), Maßstab 500µm. Man erkennt eine deutliche Anfärbung (dunkellila) der siegelringartigen Zellen, die bereits in der HE-Färbung auffällig waren.

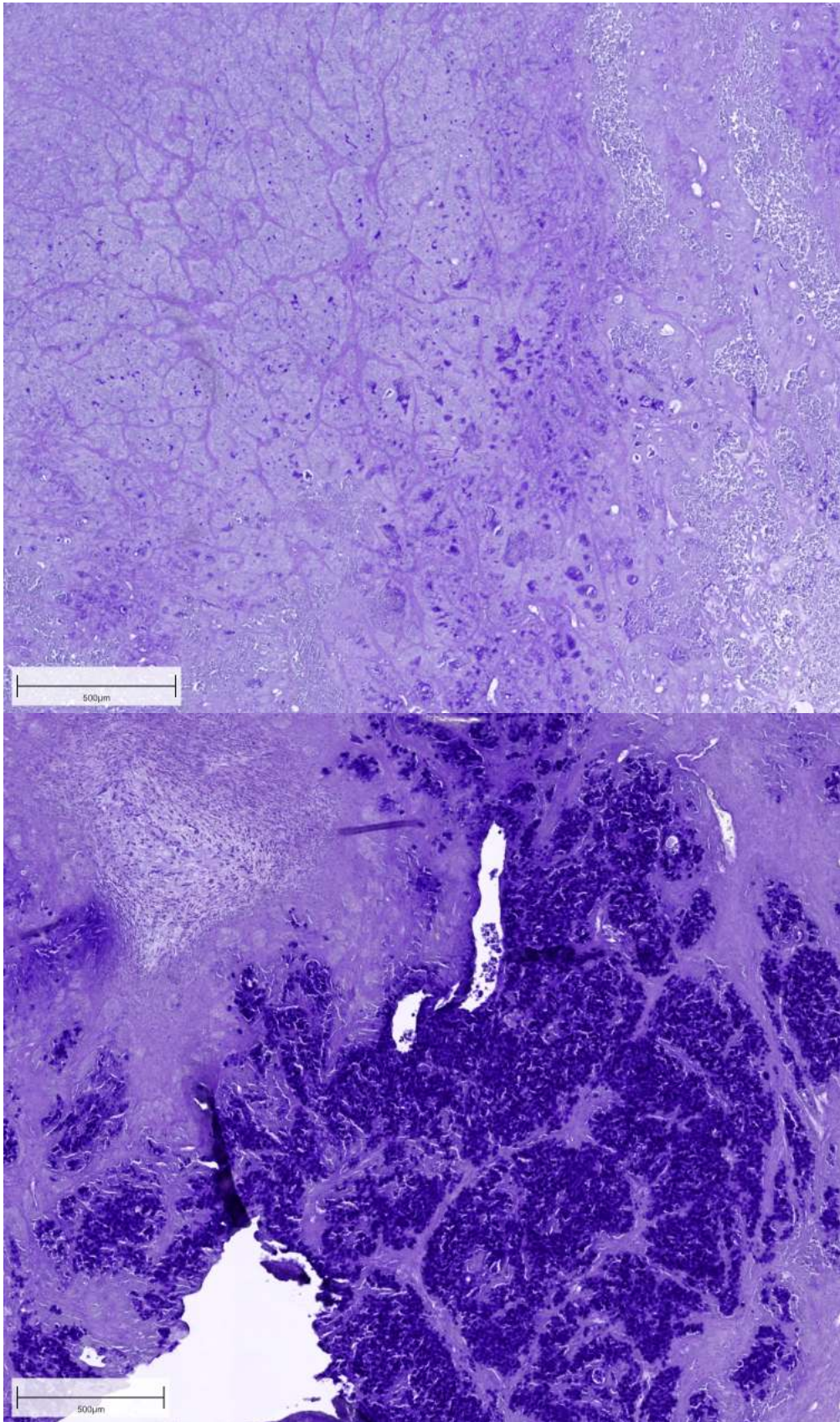


Abbildung 22: Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd (oben) und PaCa 5061 luc (unten) in PAS-Färbung, Maßstab 500µm. Dargestellt ist je ein Ausschnitt (Knockdown und luc-Gruppe) aus der Zelllinie PaCa 5061. Man erkennt den deutlichen Unterschied im Anfärbeverhalten. PaCa 5061 luc zeigte dabei eine deutlich stärkere Anfärbung (untere Abbildung).

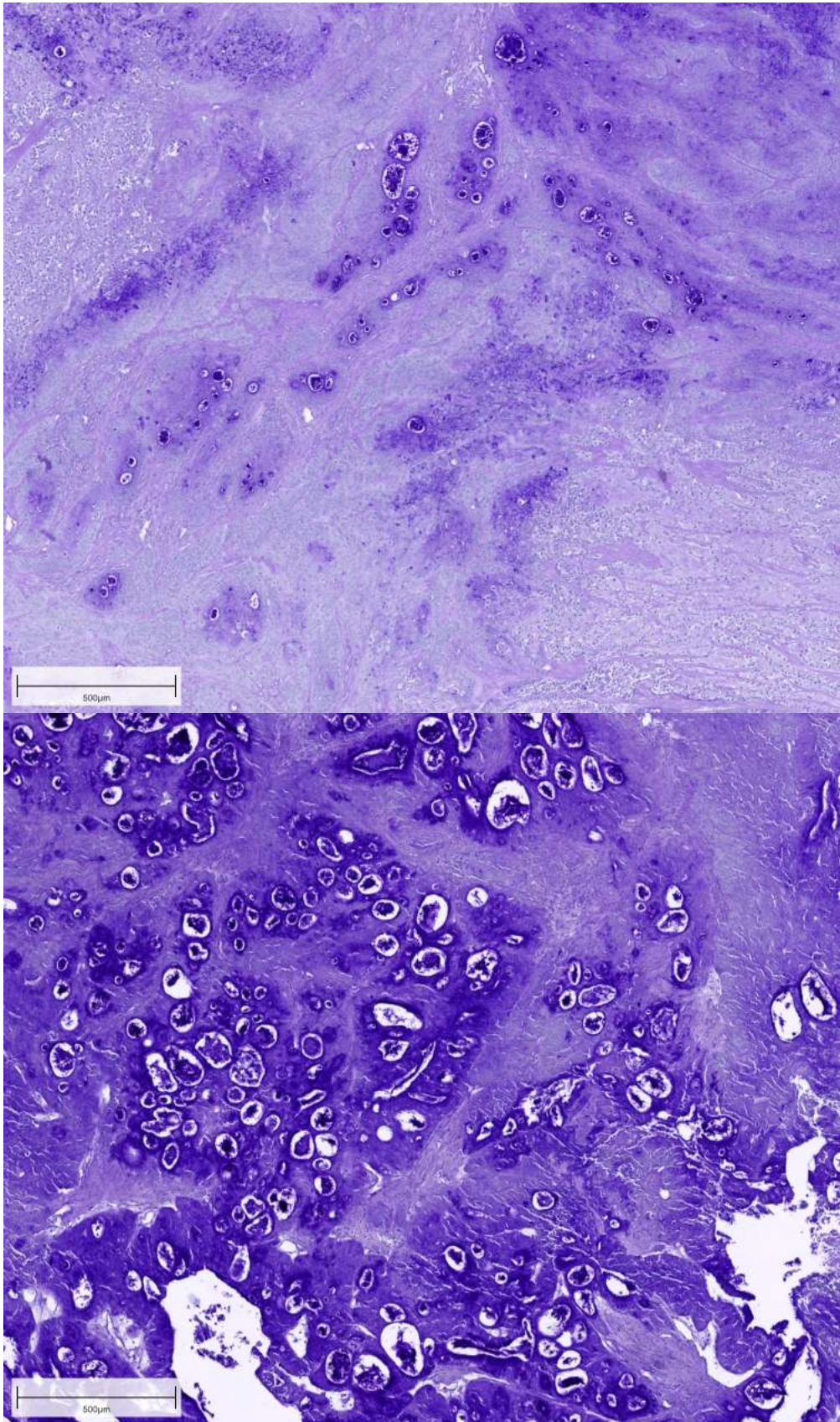


Abbildung 23: Primärtumoren von BxPC3 CD44 kd (oben) und BxPC3 luc (unten) in PAS-Färbung, Maßstab 500µm. Man erkennt den deutlichen Unterschied zwischen der Knockdown- und der luc-Gruppe, der jedoch weniger stark ausgeprägt ist als der Unterschied der PaCa 5061-Zelllinie.

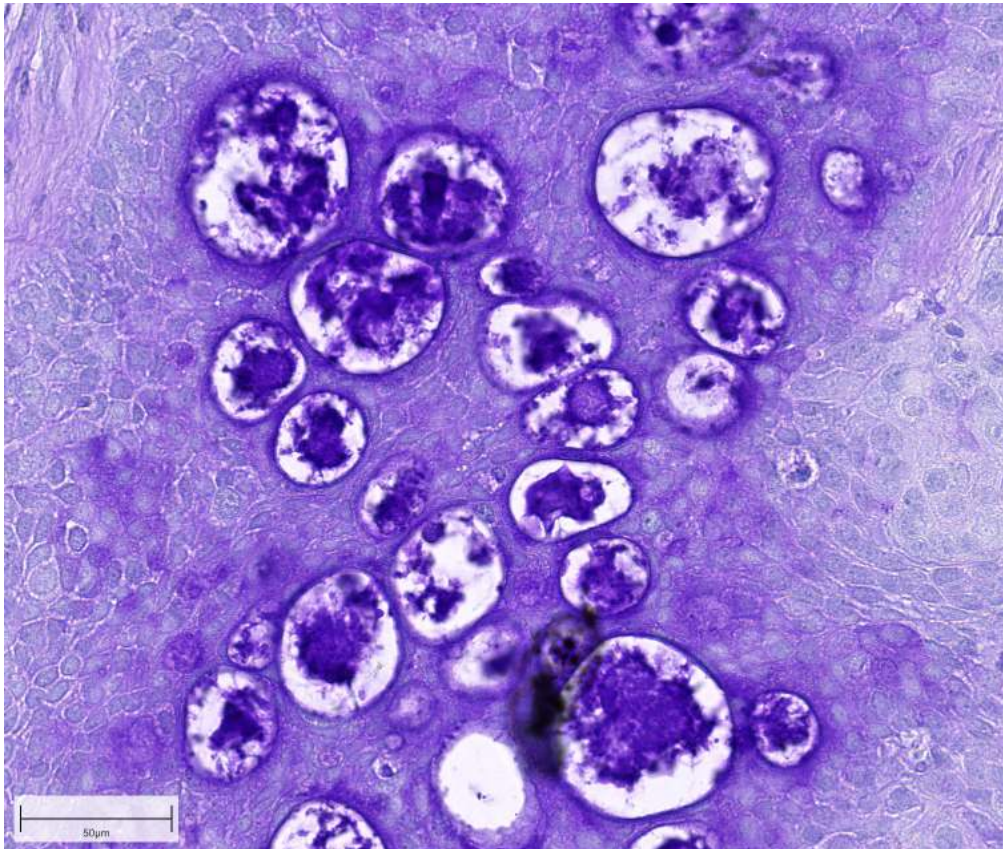


Abbildung 24: Primärtumor von BxPC3 CD44 kd in PAS-Färbung, Maßstab 50µm.
Dargestellt sind PAS-positive duktale Strukturen mit Schleimfüllung.

3.4.2.2 PAS in den Lungenmetastasen

Für beide Zelllinien (sowohl jeweils im Knockdown, als auch in der luc-Gruppe) fand sich eine schwache Anfärbung, die sich kaum vom umgebenden Lungenparenchym abhob (Abbildung 25 und 26). Vereinzelt kamen stärker angefärbte Zellen in den Metastasen vor (Abbildung 25 und 26). In den luc-Gruppen fanden sich keine Anzeichen für die siegelringartigen Zellen aus den Primärtumoren. Je größer die Metastasen waren, umso eher zeigten vermehrt Zellen eine verstärkte Anfärbung.

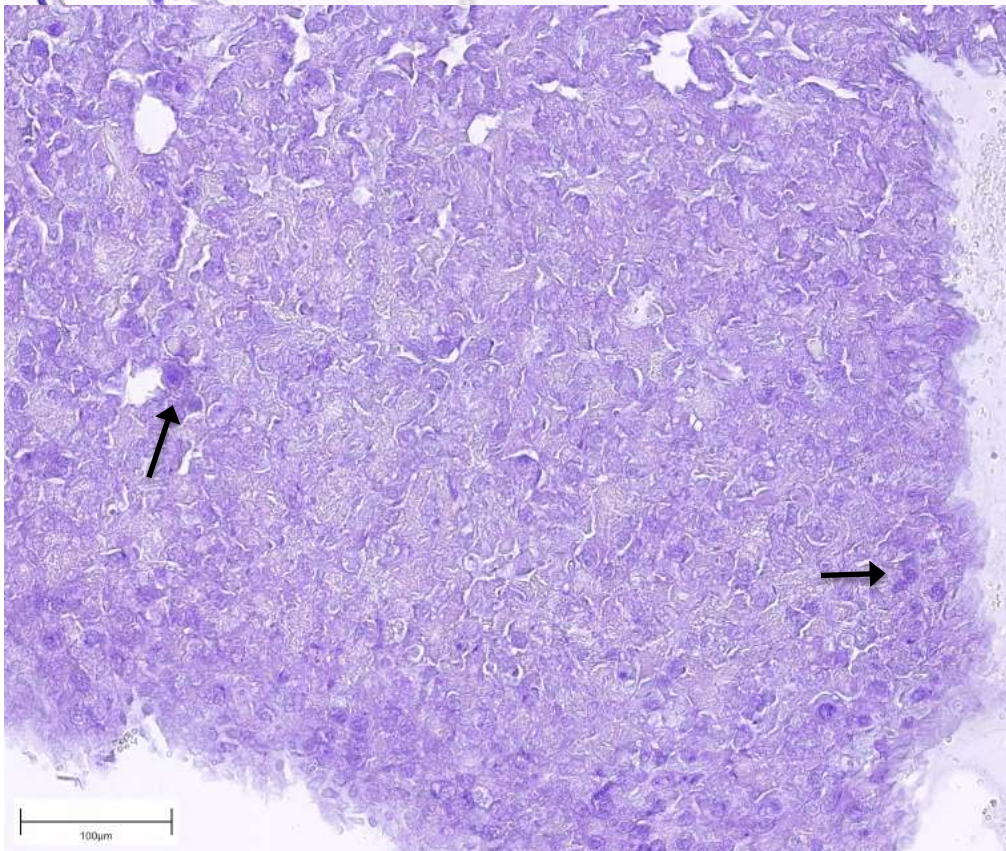
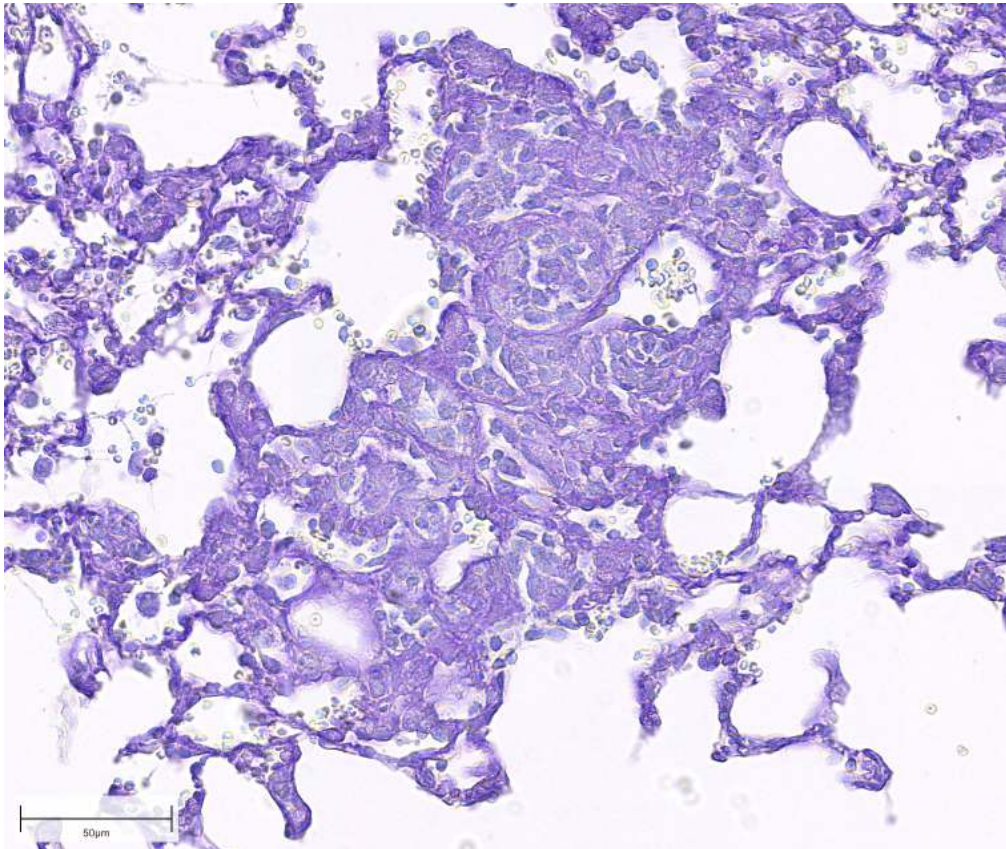


Abbildung 25: Lungenmetastasen von PaCa 5061 CD44 kd (oben) und BxPC3 CD44 kd (unten) in PAS-Färbung, Maßstab 50µm (oben) und 100µm (unten). Man erkennt jeweils eine Metastase, die sich farblich kaum vom Lungenparenchym abhebt. In der unteren Abbildung sieht man vereinzelt verstärkt angefärbte Zellen rechts unten und auf der linken Seite der Metastase (Pfeile).

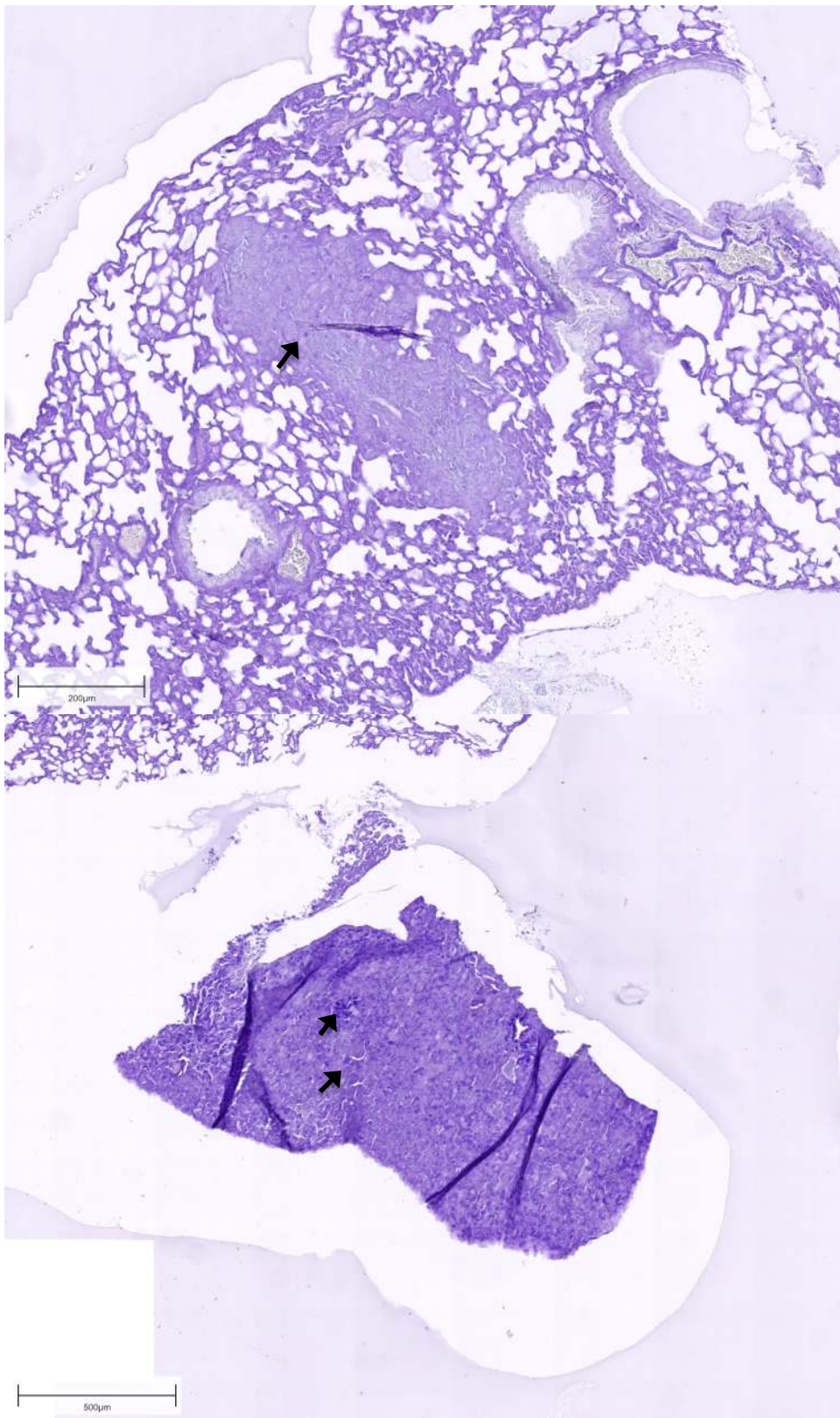


Abbildung 26: Lungenmetastasen von PaCa 5061 luc (oben) und BxPC3 luc (unten) in PAS-Färbung, Maßstab 200μm (oben) und 500μm (unten). Man erkennt jeweils eine Metastase, die sich farblich kaum vom Lungenparenchym abhebt. Insbesondere in der unteren Abbildung zeigen sich verstärkt angefärbte Zellen innerhalb der Metastase, vereinzelt auch in der oberen Abbildung (Pfeile).

3.4.3 Masson-Goldner-Färbung

3.4.3.1 Masson-Goldner in den Primärtumoren

Mit dieser Färbung erfolgte eine genauere Betrachtung des Vorhandenseins von Bindegewebe (Stroma) in den Primärtumoren und den Lungenmetastasen. Es zeigte sich eine starke bis sehr starke Ausprägung des Stromaanteils sowohl in BxPC3 luc (Abbildung 27), als auch in BxPC3 CD44 kd (Abbildung 28), wohingegen PaCa 5061 luc und PaCa 5061 CD44 kd im Verhältnis weniger Stromaanteil aufwiesen (Abbildung 29). Ein Knockdown von CD44 scheint an sich keinen Einfluss auf die desmoplastische Reaktion des Tumors zu haben, sondern stellt sich hier zelllinienspezifisch dar.

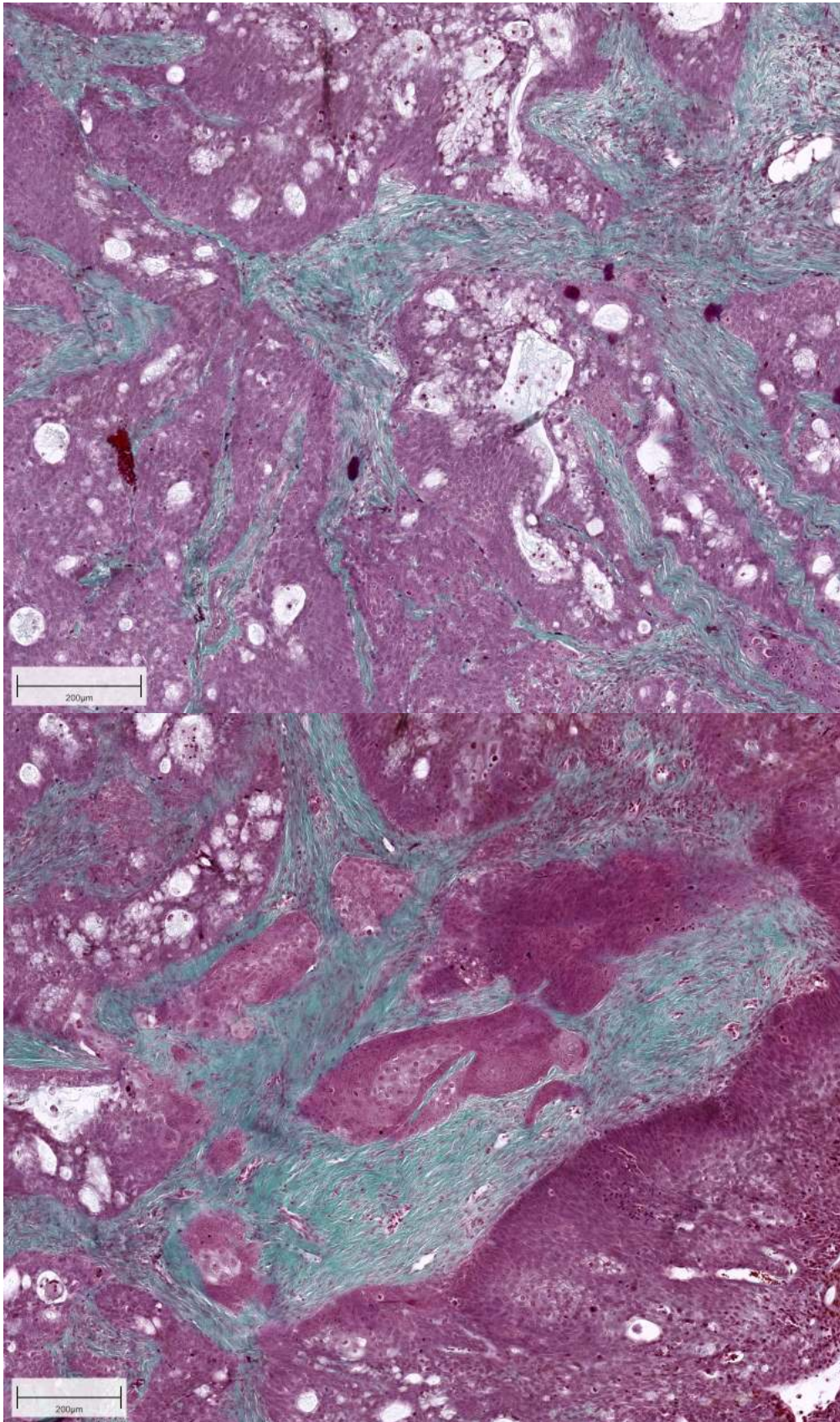


Abbildung 27: Primärtumor von BxPC3 luc in Masson-Goldner-Färbung, Maßstab 200µm. Dargestellt sind stark ausgeprägte Stromastränge (grüne Färbung) innerhalb des Tumors.

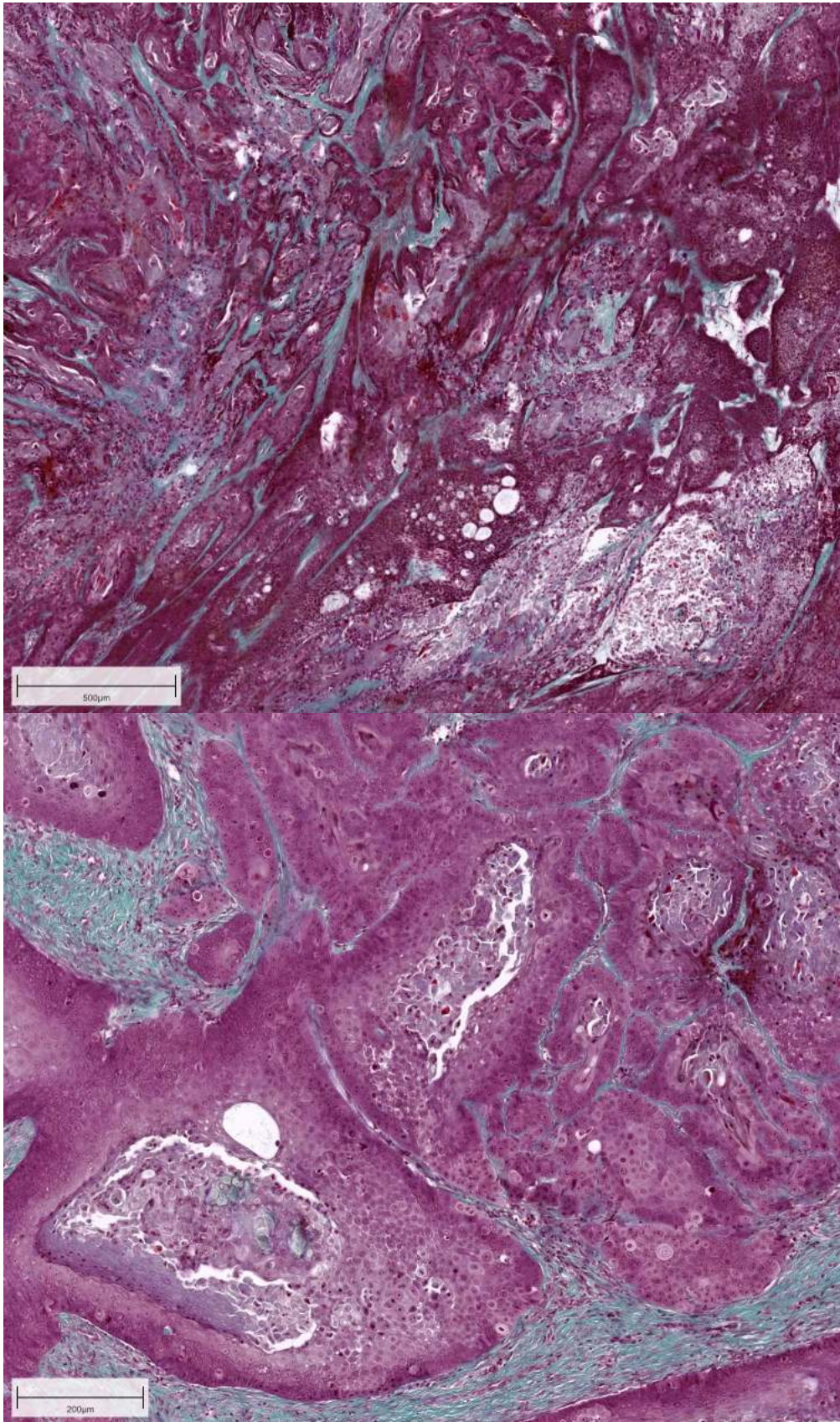


Abbildung 28: Primärtumoren von BxPC3 CD44 kd in Masson-Goldner-Färbung, Maßstab 500µm (oben) und 200µm (unten). Dargestellt sind stark ausgeprägte Stromastränge (grüne Färbung) innerhalb der Tumoren.

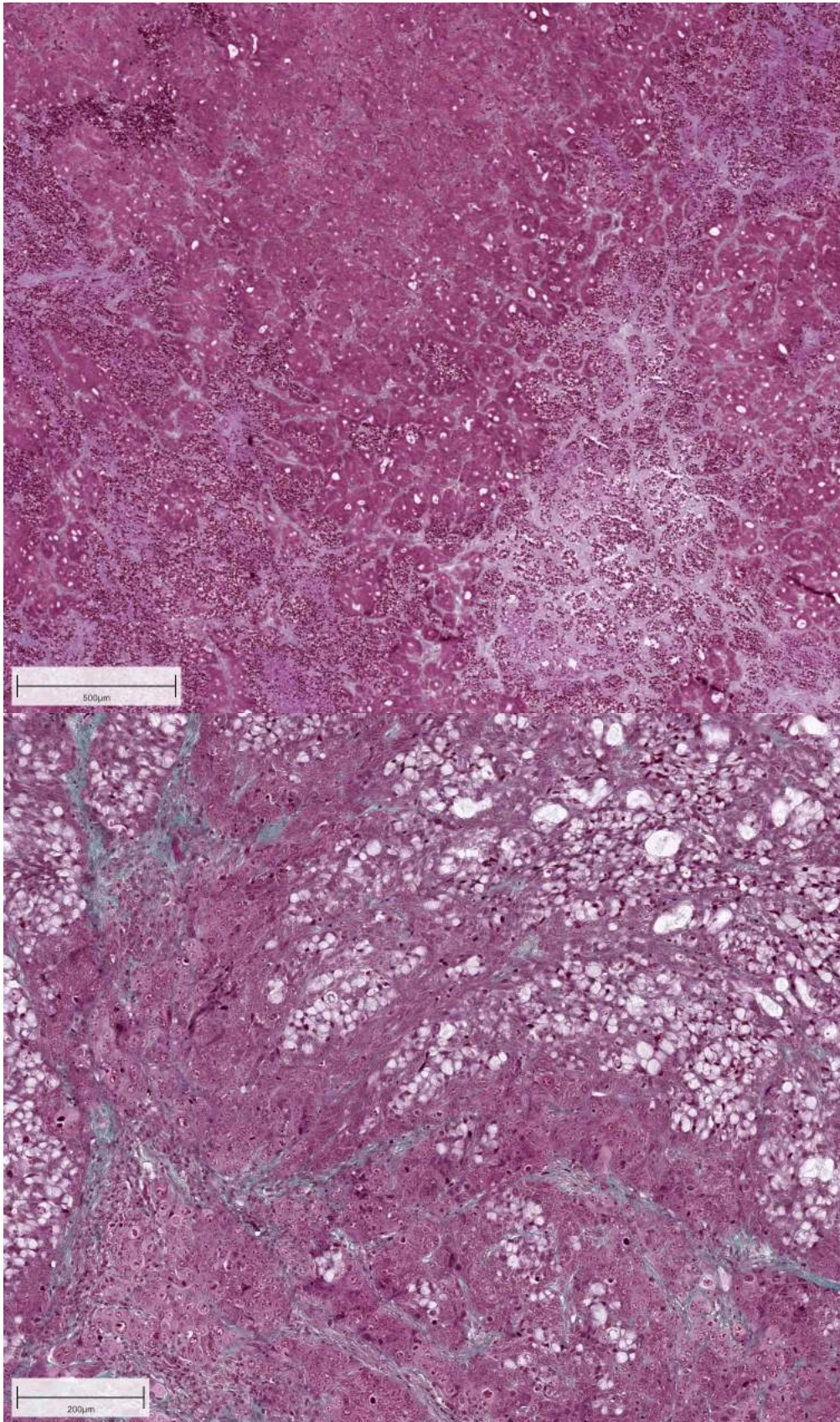


Abbildung 29: Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd (oben) und PaCa 5061 luc (unten) in Masson-Goldner-Färbung, Maßstab 500µm (oben) und 200µm (unten). Es ist deutlich weniger Stromaanteil in der Zelllinie PaCa 5061 im Vergleich zu den Abbildungen der Zelllinie BxPC3 zu erkennen.

3.4.3.2 Masson-Goldner in den Lungenmetastasen

Für beide Zelllinien (jeweils sowohl im Knockdown, als auch in der luc-Gruppe) zeigten sich nur schwache Stromastränge zwischen den Tumorzellen der Metastasen, welche kaum sichtbar waren (Abbildung 30).

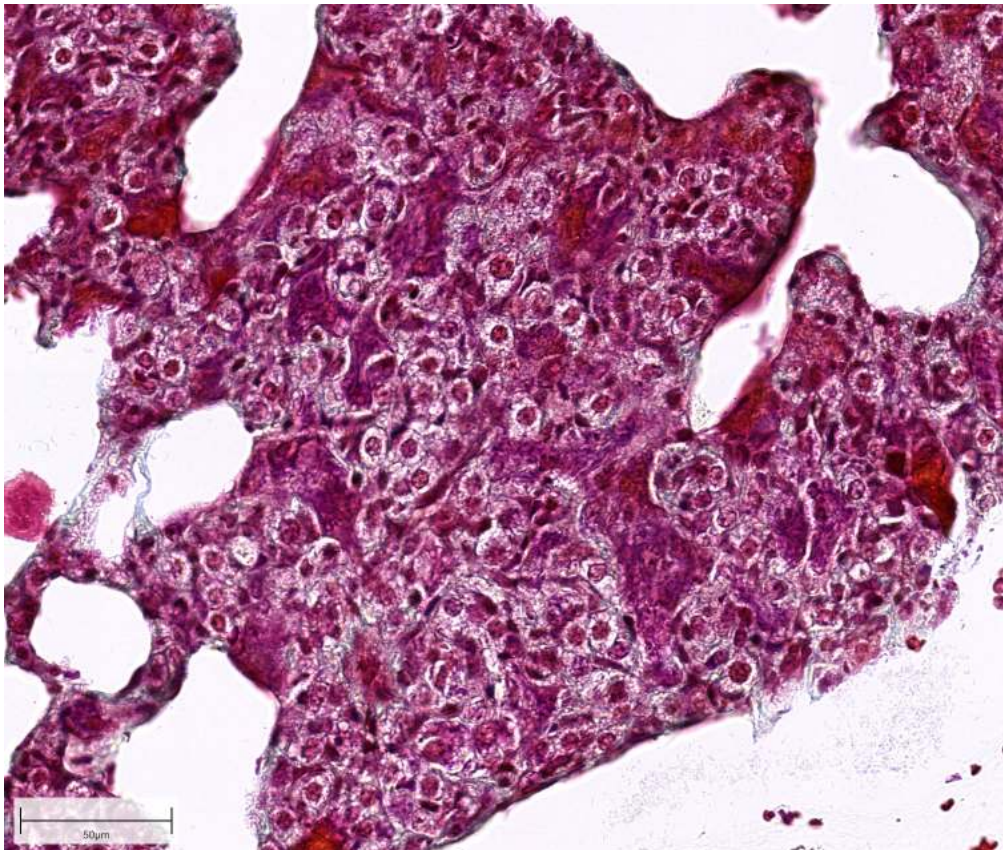


Abbildung 30: Lungenmetastase von BxPC3 CD44 kd (beispielhaft für beide Zelllinien) in Masson-Goldner-Färbung, Maßstab 50µm. Es stellten sich keine ausgeprägten Stromastränge in den Metastasen dar.

3.5 Auswertung der Immunhistochemie

3.5.1 Stabilität des Knockdowns

Bei der Auswertung der auf CD44 gefärbten Schnitte in den Primärtumoren zeigte sich, dass alle Schnitte für die Zelllinien BxPC3 CD44 kd und PaCa 5061 CD44 kd negativ ausfielen. Die Positivkontrolle zeigte ein stark positives Ergebnis, während die Isotypenkontrollen und die Negativkontrolle allesamt ein negatives Ergebnis erbrachten. Damit war die Stabilität des Knockdowns gezeigt (Abbildungen 31-33). In den jeweiligen luc-Gruppen fand sich ein positives Ergebnis (vgl. 3.5.3 CD44-Immunhistochemie). Weiterhin war der Knockdown auch in den Lungenmetastasen stabil, hier zeigte sich keine Anfärbung für die kd-Gruppen bei deutlich positiver Positivkontrolle. Allerdings konnte auch in den Lungenmetastasen der luc-Gruppen keine Anfärbung detektiert werden (vgl. 3.5.3.2 CD44 in den Lungenmetastasen).

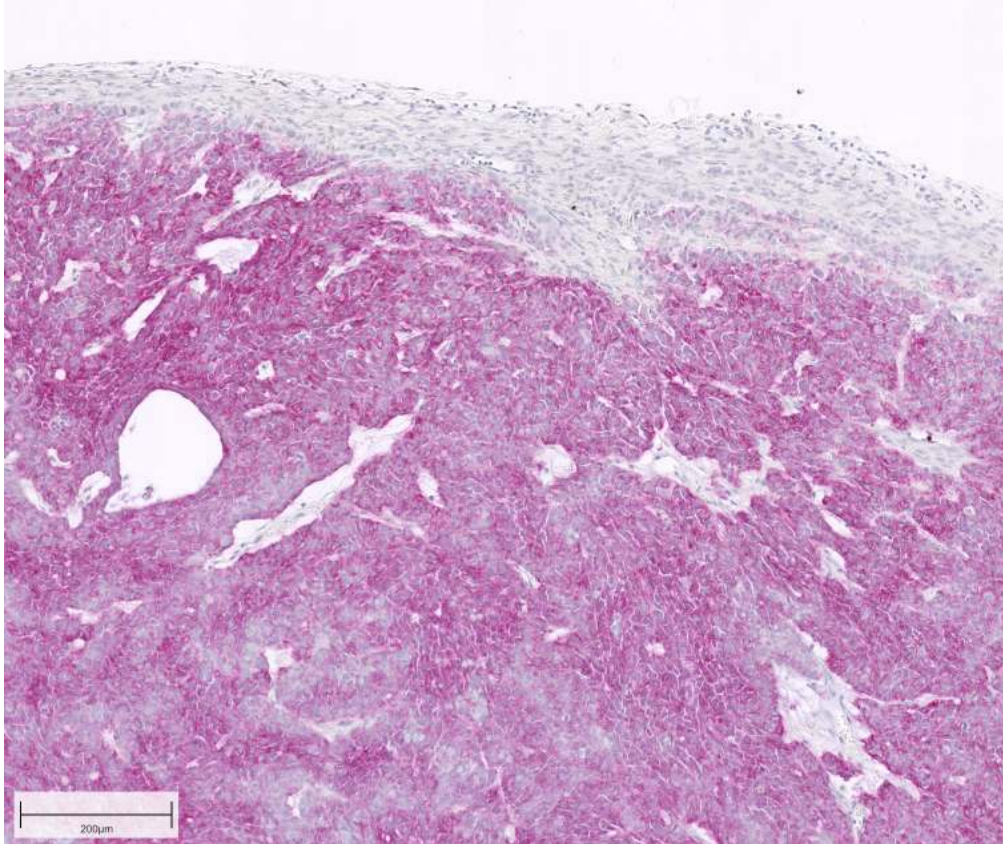
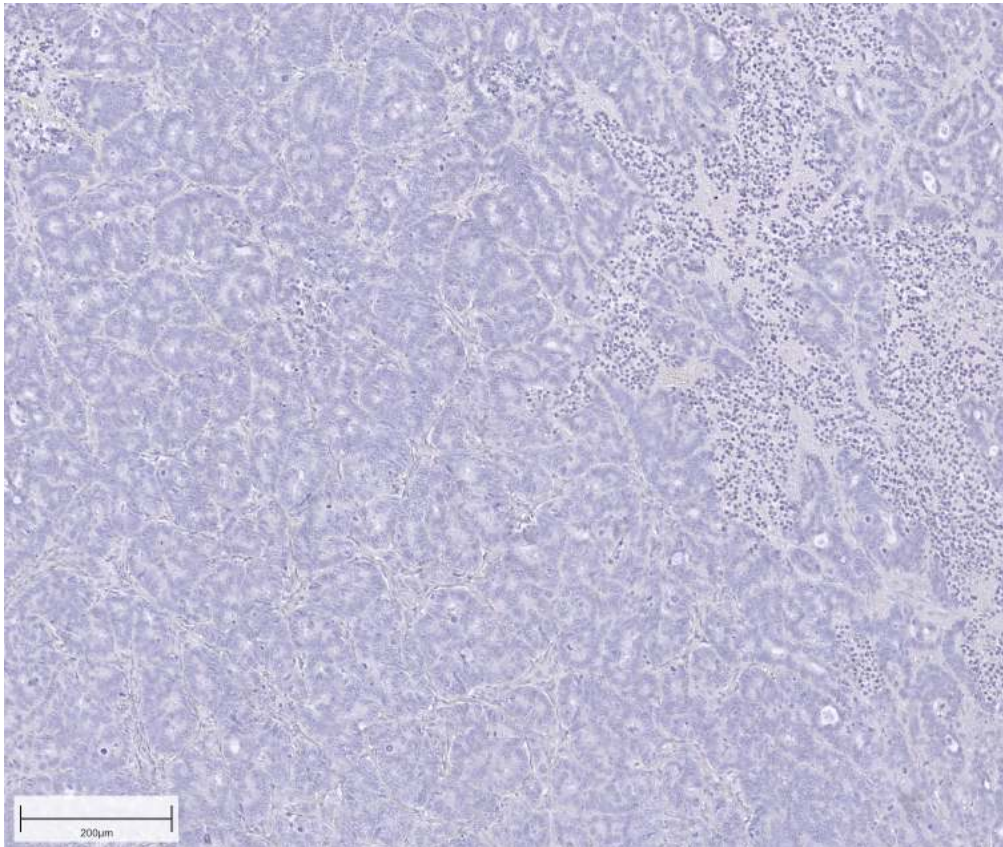


Abbildung 31: Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd (oben) und PaCa 5061 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD44, Maßstab 200µm. In der Knockdowngruppe zeigte sich keine Anfärbung von CD44, während in der luc-Gruppe eine deutliche rote Färbung auszumachen war.

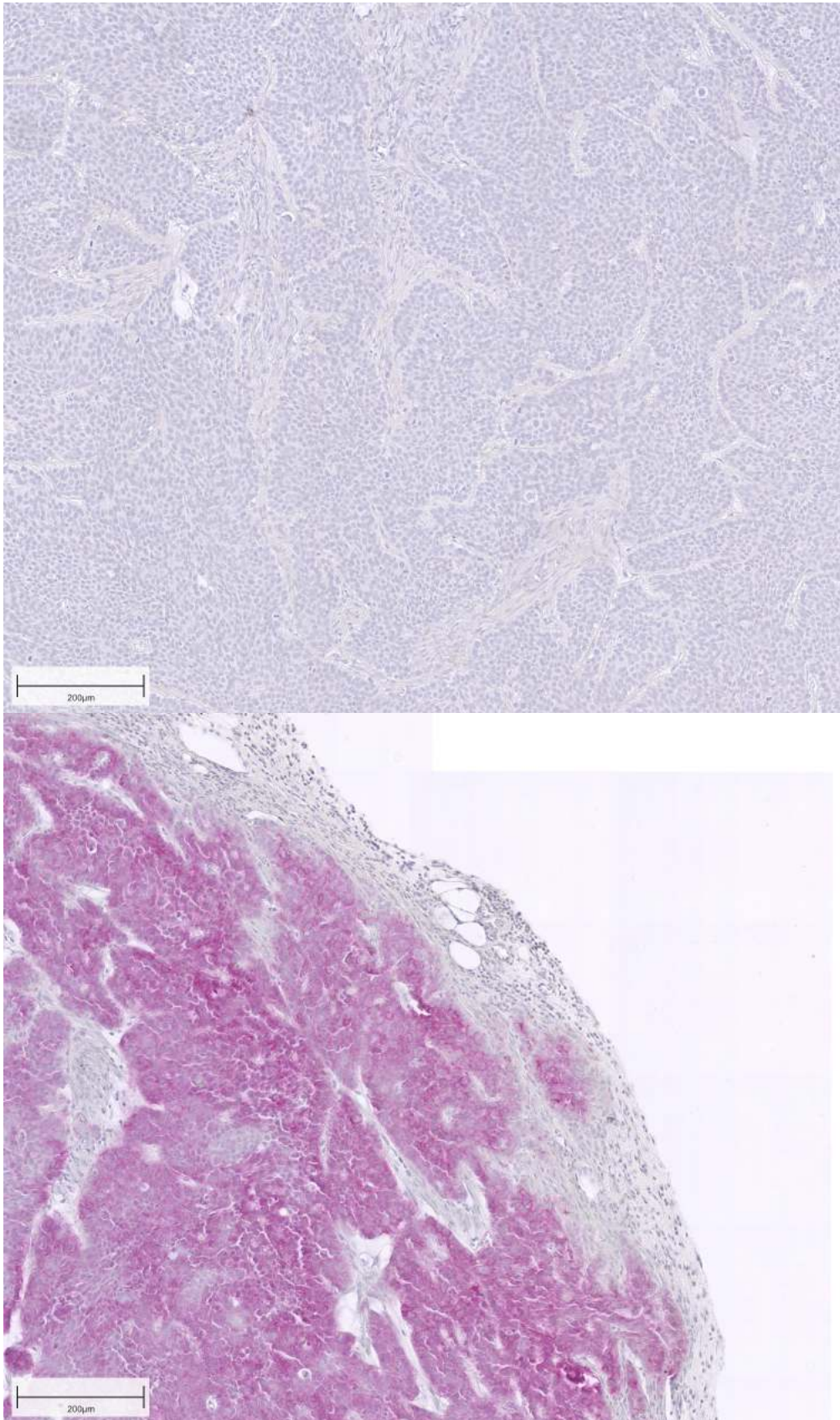


Abbildung 32: Primärtumoren von BxPC3 CD44 kd (oben) und BxPC3 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD44, Maßstab 200µm. In der Knockdowngruppe zeigte sich keine Anfärbung von CD44, während in der luc-Gruppe eine deutliche rote Färbung auszumachen war.

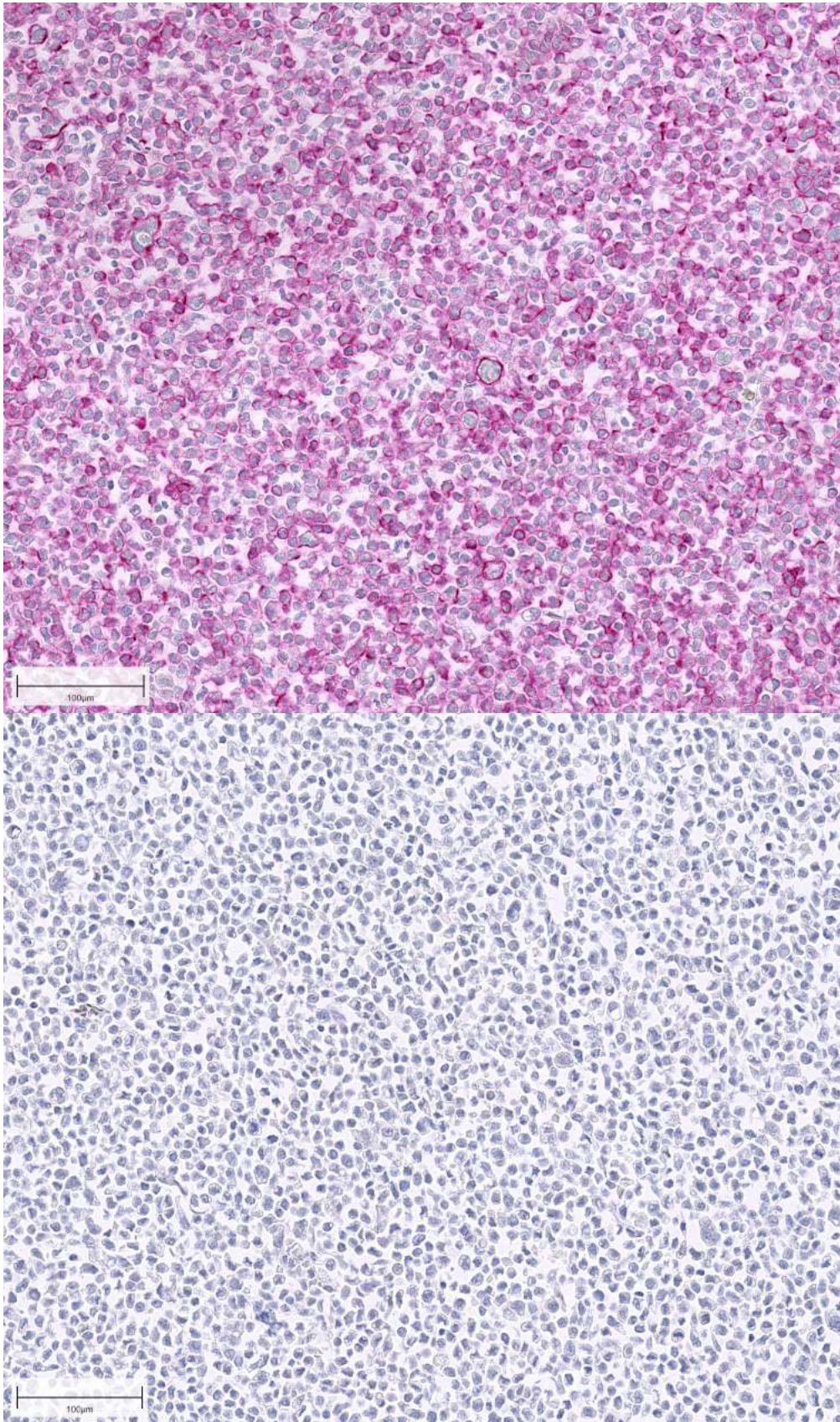


Abbildung 33: Positivkontrolle (oben) und Negativkontrolle (unten), immunhistochemische Färbung auf CD44, Maßstab 100µm. Es zeigte sich eine deutliche Anfärbung in der Positivkontrolle (Kolonkarzinomzellen HT29 in Agar, die durchflusszytometrisch CD44 positiv waren); keine Anfärbung in der Negativkontrolle.

3.5.2 CD45-Immunhistochemie

3.5.2.1 CD45 in den Primärtumoren

Mit dieser immunhistochemischen Färbung konnte die Einwanderung, beziehungsweise das Vorhandensein von Mausleukozyten in den humanen Pankreastumoren und in den Lungenmetastasen dargestellt werden. CD45 ist ein Leukozytenmarker, hier gegen murines CD45 gerichtet. In beiden Zelllinien (jeweils im Knockdown und in den luc-Gruppen) zeigte sich ein mehr oder weniger ausgeprägtes Signal von CD45. Dies war auch davon abhängig, ob Stromastränge in den Tumor hineinzogen, beziehungsweise diese auf den Präparaten mit angeschnitten waren. Es zeigte sich eine eher geringe Anfärbung in BxPC3 luc (Abbildung 36), hauptsächlich aber um den Tumor herum, sowie in Stromasträngen des Tumors. Vereinzelt angefärbte Zellen fanden sich auch im Tumorgewebe. Im Vergleich dazu zeigte sich für BxPC3 CD44 kd eine sehr starke Anfärbung, sowohl um den Tumor herum, als auch in den Stromasträngen (Abbildung 34). Es fanden sich viele vereinzelt CD45-positive Zellen an vielen Stellen des Tumors. Bei der Untersuchung der Zelllinie PaCa 5061 verhielt es sich eher umgekehrt. Hier zeigte die Knockdowngruppe (Abbildung 34) eine relativ geringere Ausprägung von CD45-positiven Zellen, diese fand sich aber, wie bei allen anderen Gruppen auch, insbesondere um den Tumor herum, sowie in den Stromasträngen. Die luc-Gruppe von PaCa 5061 (Abbildung 36) hingegen zeigte eine starke Anfärbung mit vielen CD45-positiven Zellen.

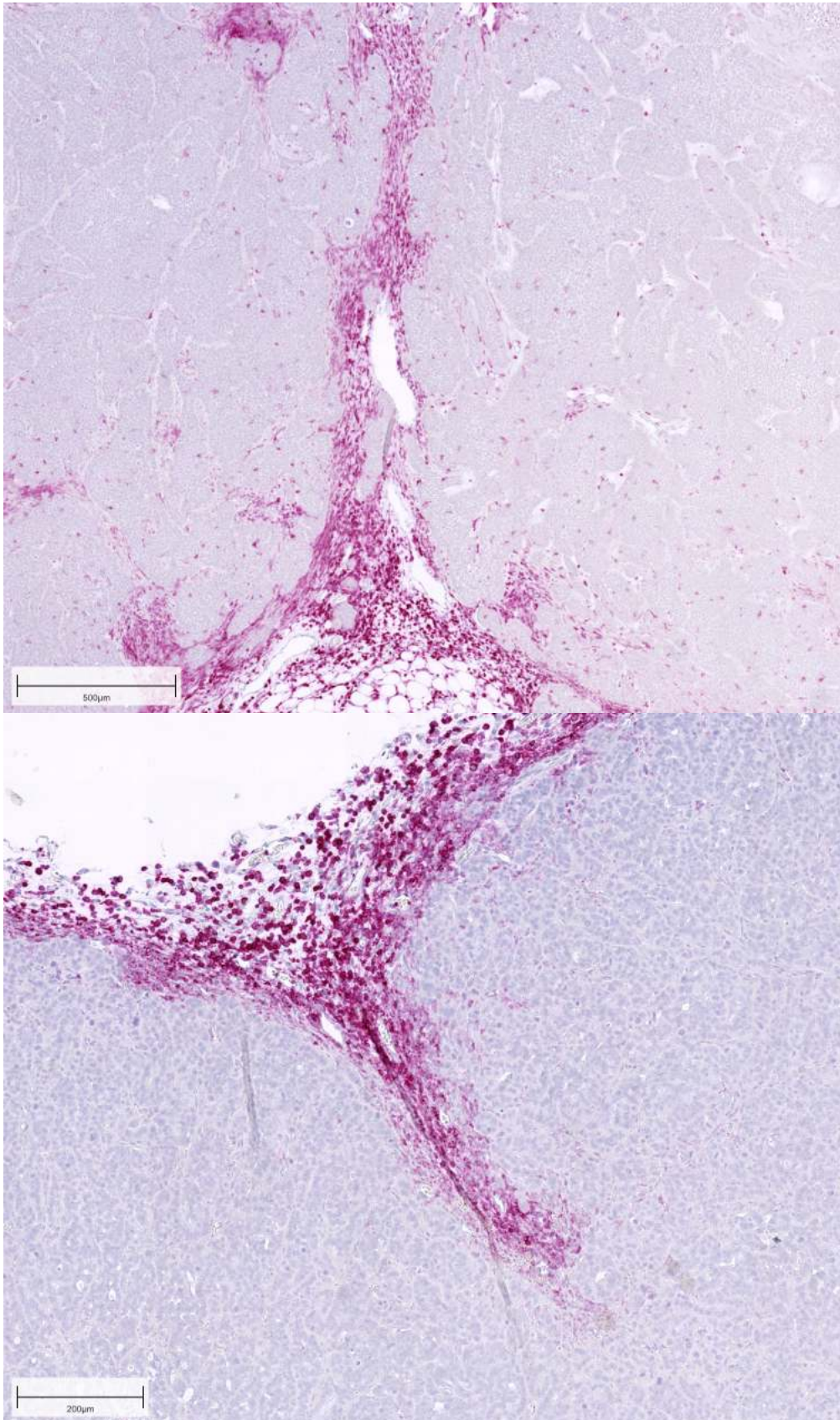


Abbildung 34: Primärtumoren von BxPC3 CD44 kd (oben) und PaCa 5061 CD44 kd (unten), immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 500µm (oben) und 200µm (unten). Abgebildet sind die Randbereiche der Tumore mit angefärbten Zellen in den Stromasträngen, die in die Tumoren ziehen. Die Anfärbung war hauptsächlich im Randbereich zu finden.

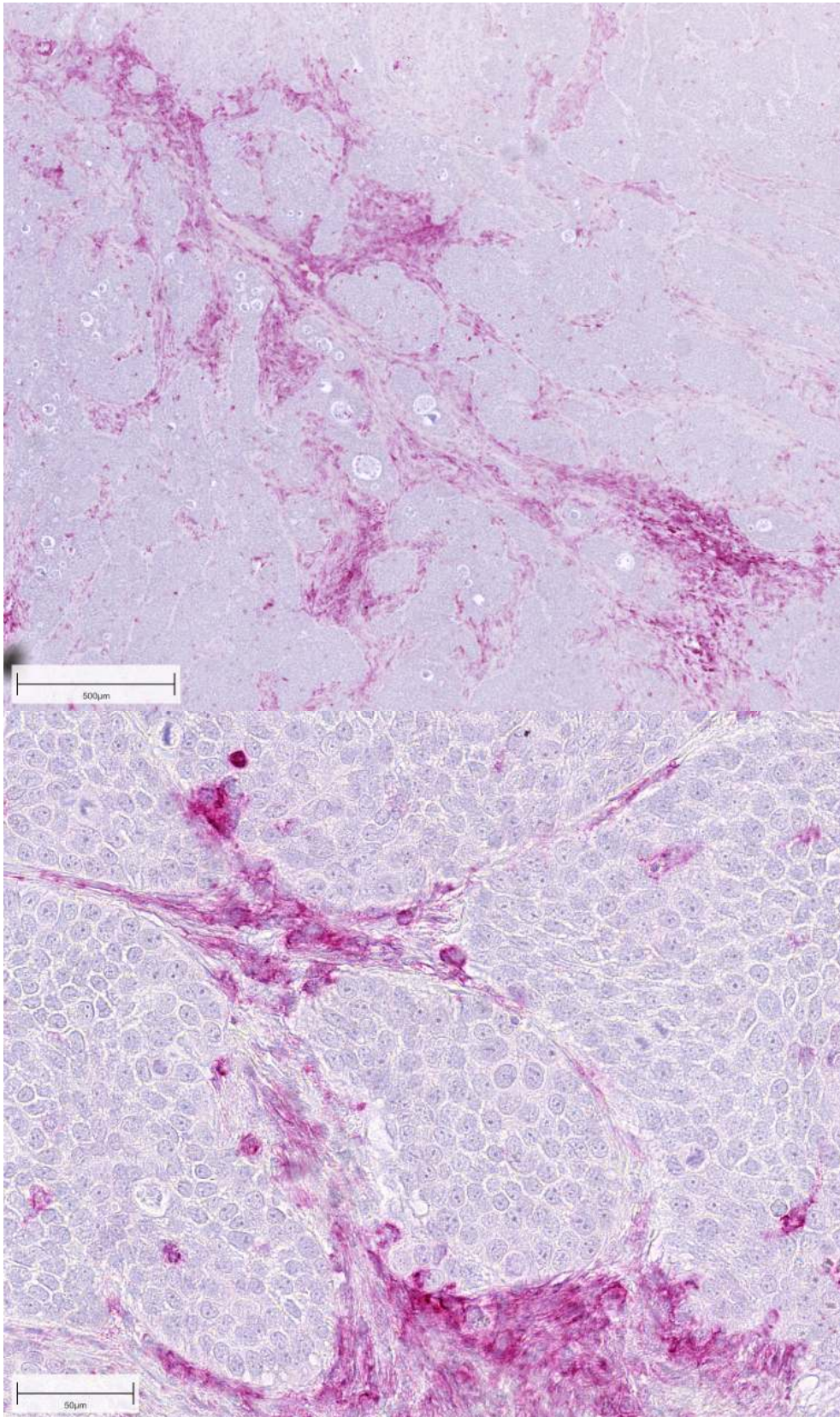


Abbildung 35: Vergrößerungsaufnahme eines Primärtumors von BxPC3 CD44 kd, immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 500µm (oben) und 50µm (unten). Es lässt sich eine deutliche Anfärbung auch innerhalb des Tumors in den Stromasträngen erkennen (oben). Auf der unteren Abbildung ist eine Nahaufnahme des Signals abgebildet.

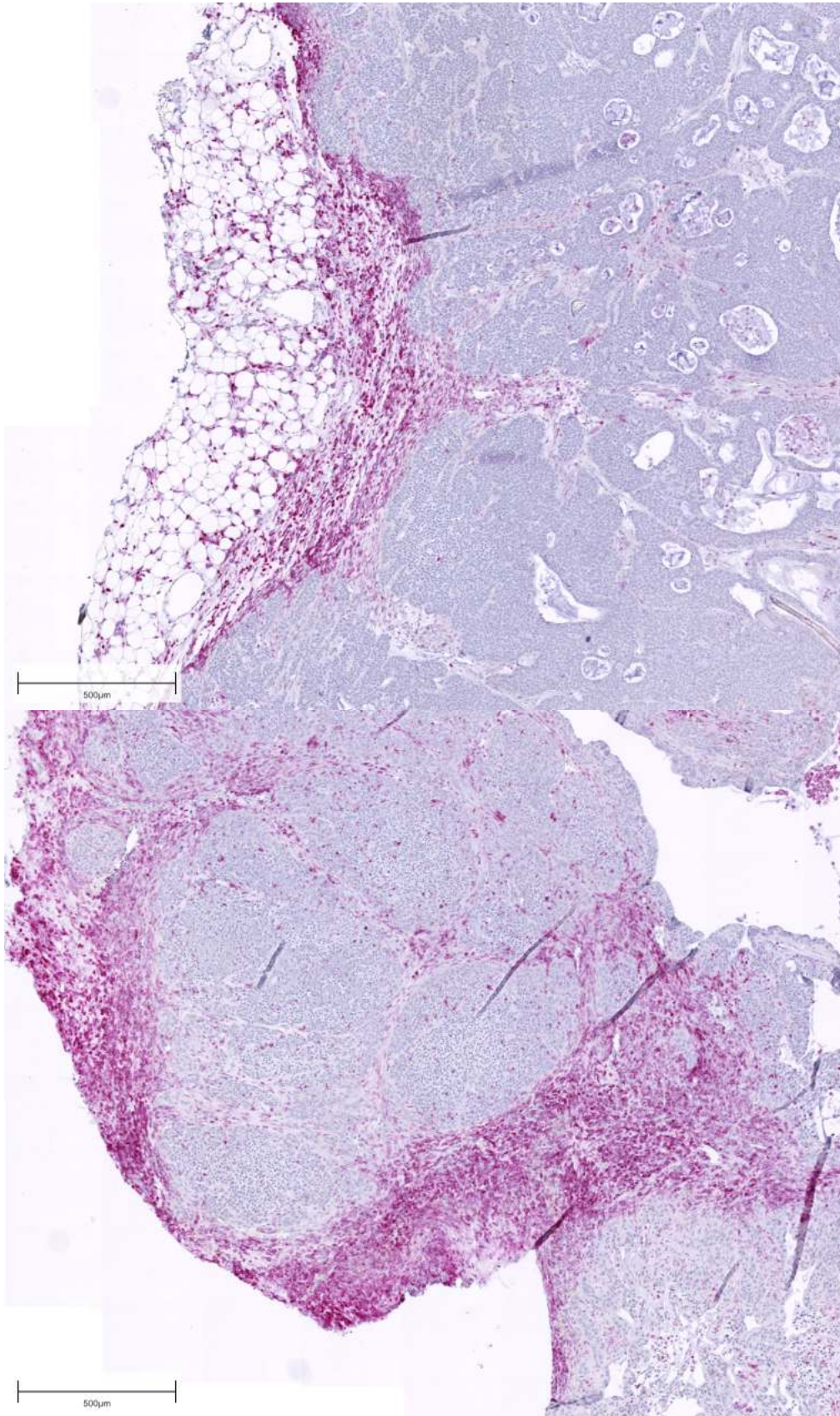


Abbildung 36: Primärtumoren von BxPC3 luc (oben) und PaCa 5061 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 500µm. Abgebildet sind Stromastränge in den Randbereichen der Tumoren, mit Anfärbung darin enthaltener Leukozyten.

Tabelle 25: Übersicht über die Stärke der Anfärbung von CD45 in den Tumoren.

	PaCa 5061 luc	PaCa 5061 CD44 kd	BxPC3 luc	BxPC3 CD44 kd
Anfärbung	++	+	+	++

3.5.2.2 CD45 in den Lungenmetastasen

Es fand sich für beide Zelllinien (jeweils im Knockdown und in den luc-Gruppen) eine Anfärbung von CD45 im Lungenparenchym und eine starke Anfärbung von CD45 in den Metastasen (Abbildungen 37-40).

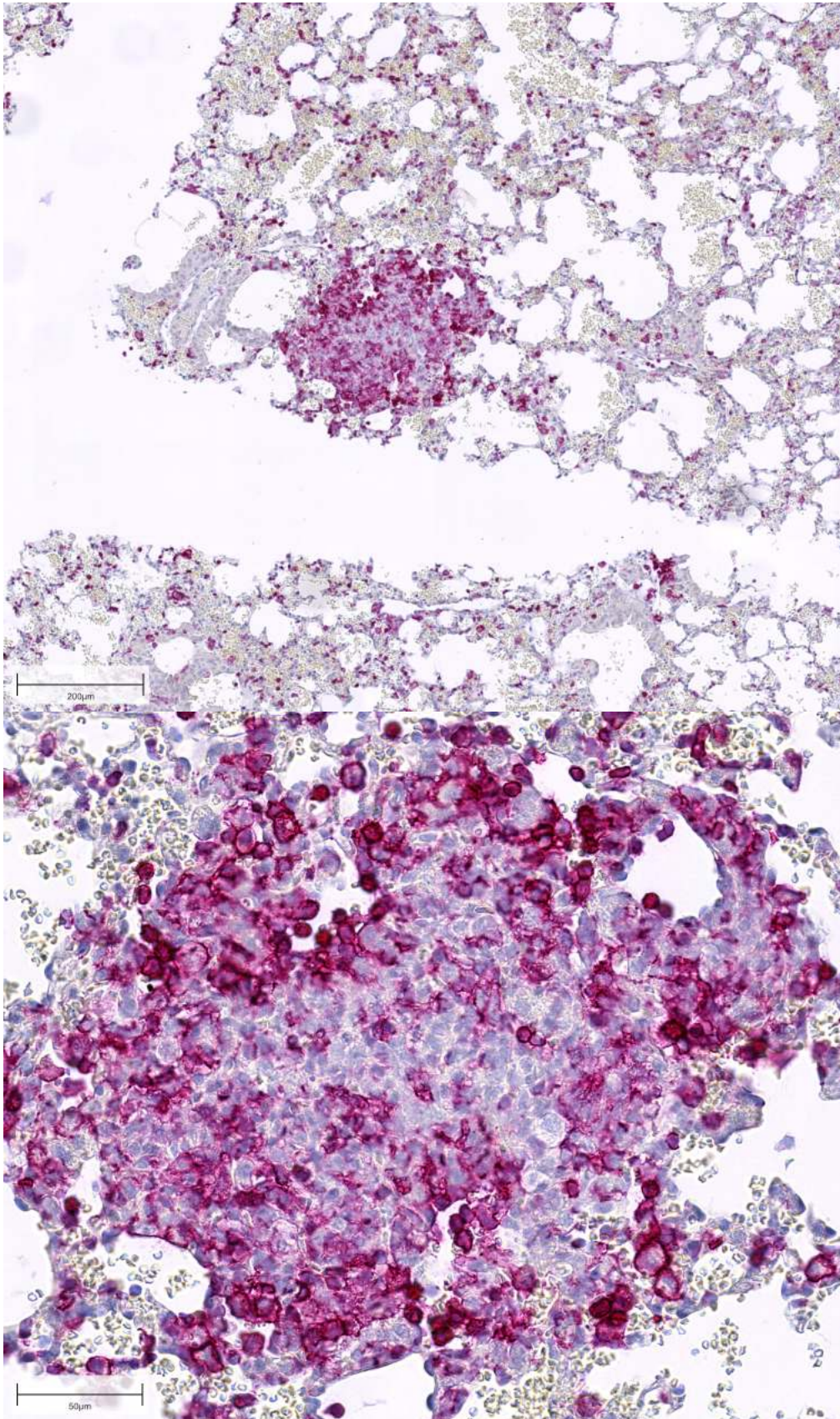


Abbildung 37: Lungenmetastase von BxPC3 CD44 kd, immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 200µm (oben) und 50µm (unten). Abgebildet ist eine Lungenmetastase eines Primärtumors von BxPC3 CD44 kd in unterschiedlicher Vergrößerung mit Infiltration von Mausleukozyten (rote Färbung).

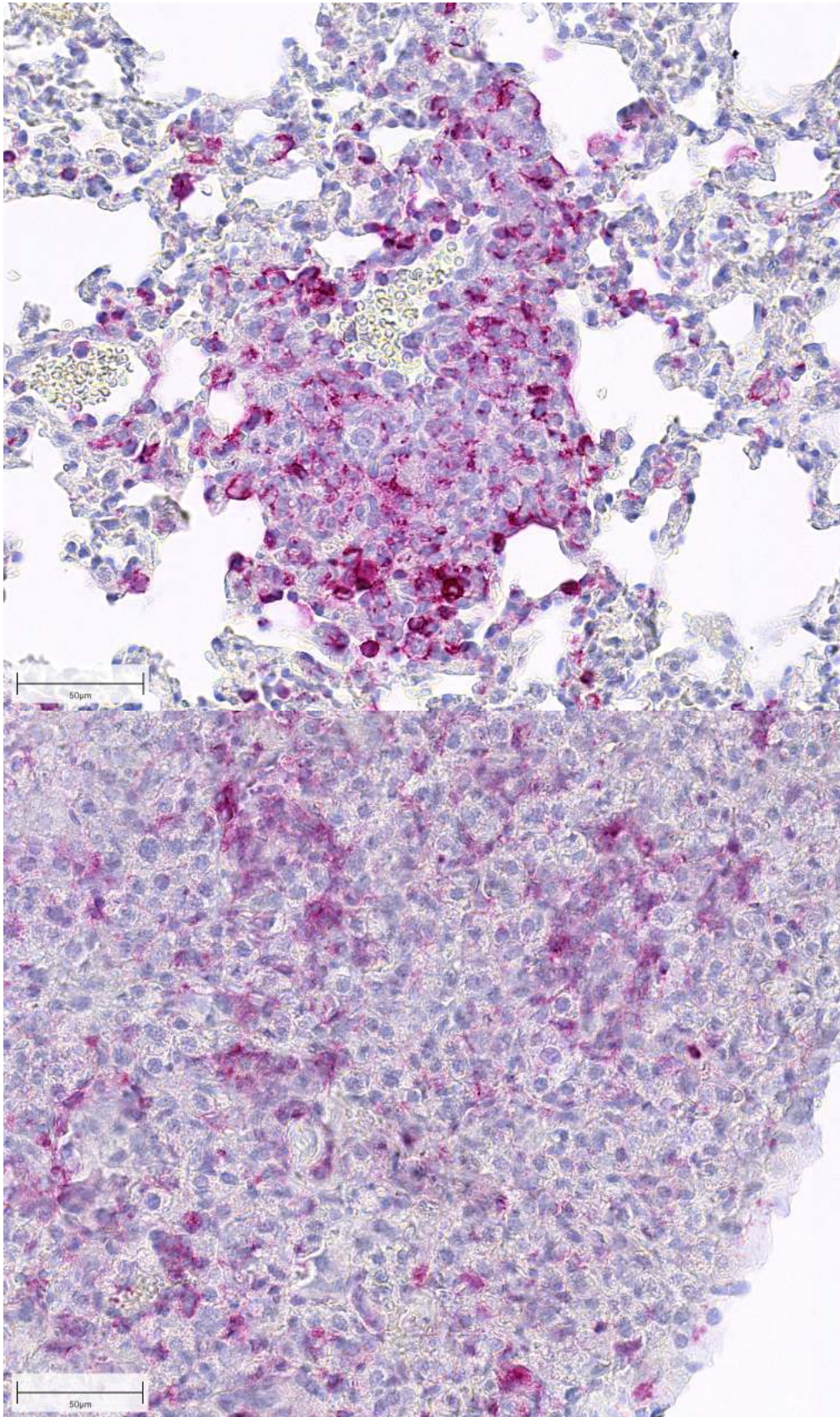


Abbildung 38: Lungenmetastasen von BxPC3 luc, immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 50µm. Abgebildet sind Lungenmetastasen verschiedener Primärtumoren von BxPC3 luc. Man erkennt die Einwanderung von Mausleukozyten in die Lungenmetastasen (rote Färbung).

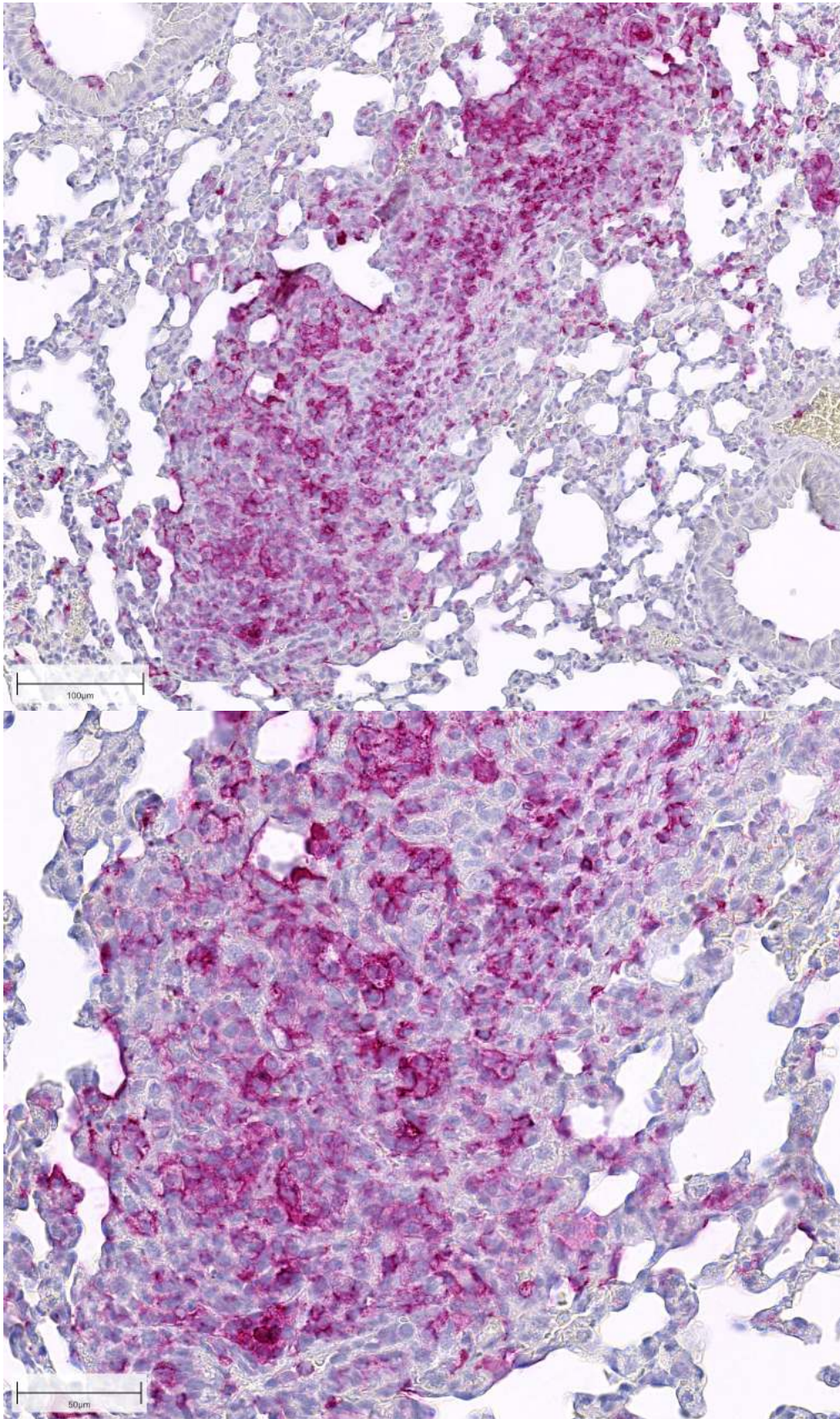


Abbildung 39: Lungenmetastase von PaCa 5061 luc, immunohistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 100µm (oben) und 50µm (unten). Abgebildet ist eine Lungenmetastase eines Primärtumors von PaCa 5061 luc in unterschiedlicher Vergrößerung mit Infiltration von Mausleukozyten (rote Färbung).

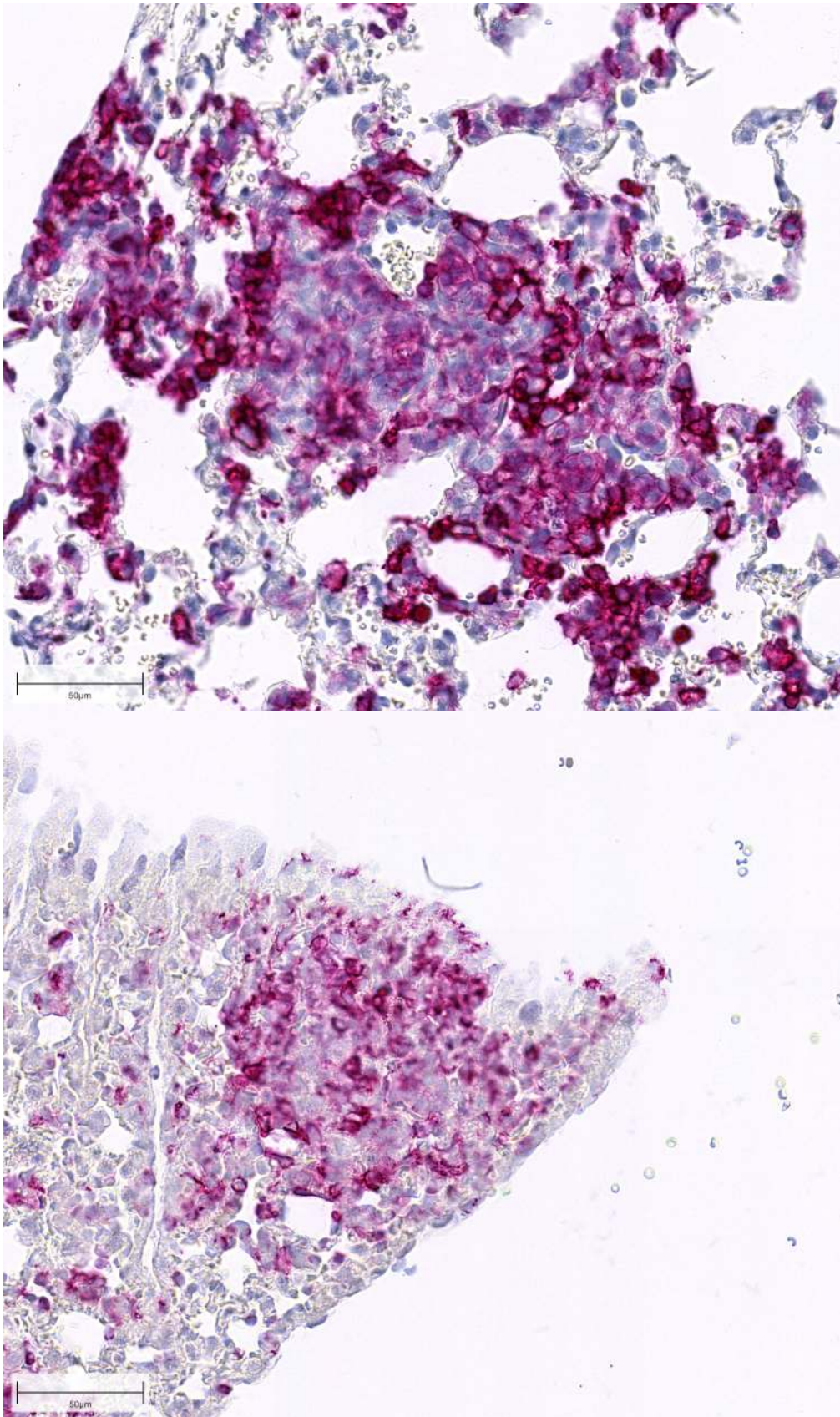


Abbildung 40: Lungenmetastasen von PaCa 5061 CD44 kd, immunhistochemische Färbung auf CD45, Maßstab 50µm. Abgebildet sind Lungenmetastasen verschiedener Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd. Man erkennt die Einwanderung von Mausleukozyten in die Lungenmetastasen (rote Färbung).

3.5.3 CD44-Immunhistochemie

3.5.3.1 CD44 in den Primärtumoren

Da der Knockdown stabil war, erfolgte hier nur die Auswertung der luc-Gruppen. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein mäßiges bis sehr starkes Signal von membranständigem CD44, insbesondere am Tumorrand (Abbildungen 41 und 42), was für eine Beteiligung an einer Invasion sprechen könnte. Zentral zeigte sich kaum ein Signal (Abbildung 43).

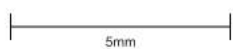
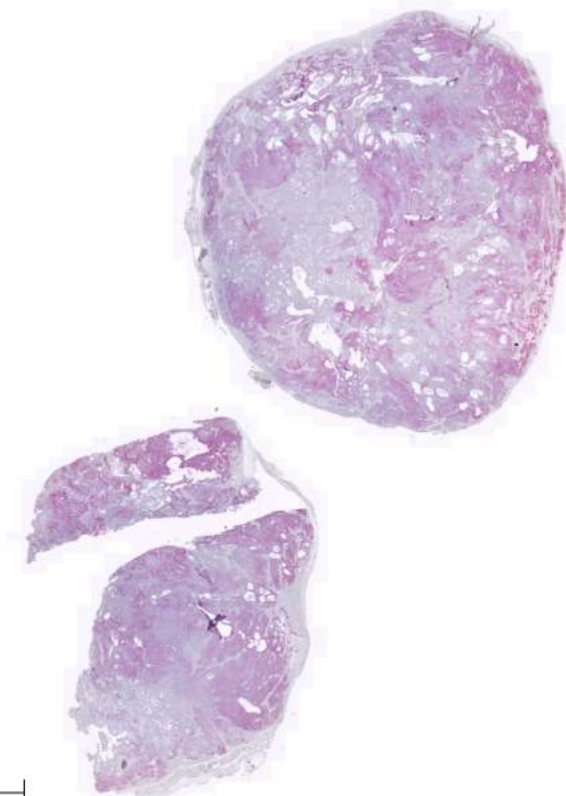
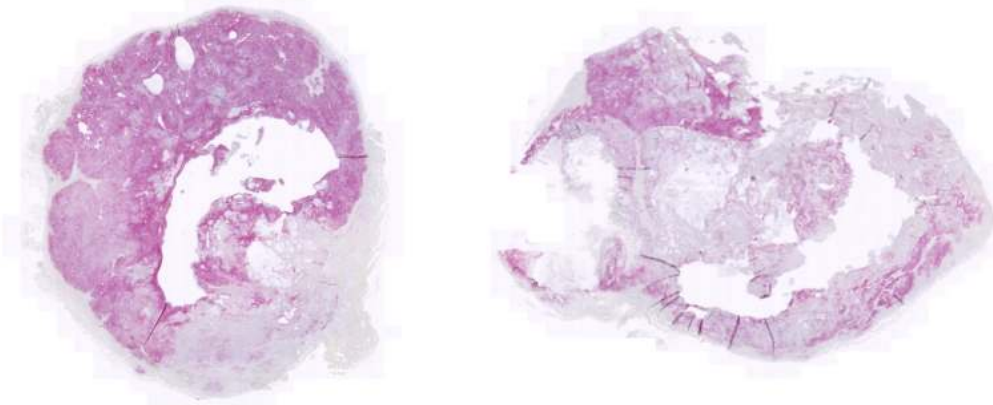


Abbildung 41: Übersicht eines Primärtumors von PaCa 5061 luc (oben) und BxPC3 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD44, Übersichtsaufnahmen. Zu erkennen ist eine verstärkte Anfärbung (rot) im Randbereich der Tumoren.

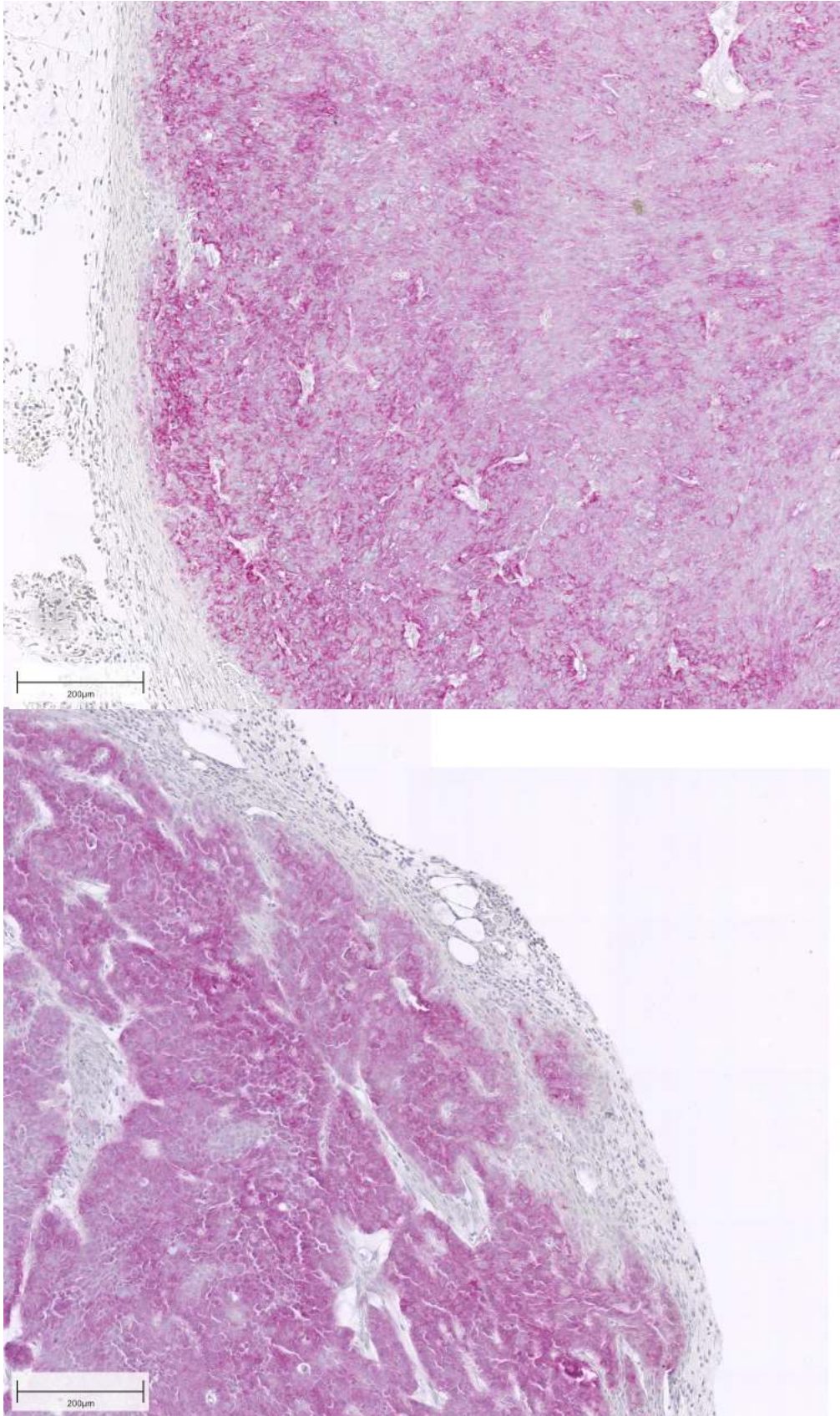


Abbildung 42: Primärtumoren von PaCa 5061 luc (oben) und BxPC3 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD44, Maßstab 200µm. Aufnahmen eines Randbezirks der Primärtumoren mit deutlicher Anfärbung von CD44.

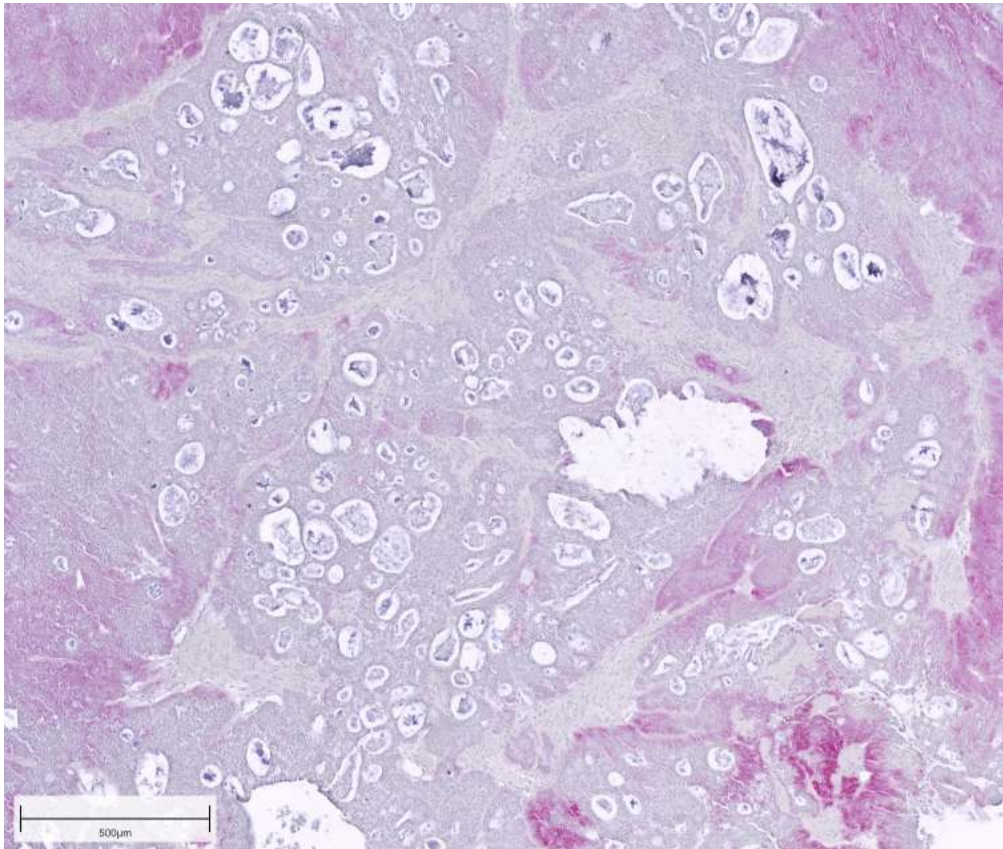


Abbildung 43: Primärtumor von BxPC3 luc, immunhistochemische Färbung auf CD44, Maßstab 500μm. Ausschnitt aus einem zentralen Bereich eines Primärtumors von BxPC3 luc. Es zeigte sich eine deutlich geringere Anfärbung von CD44 im Zentrum.

3.5.3.2 CD44 in den Lungenmetastasen

Es zeigte sich keine Anfärbung in den Metastasen, weder im Knockdown (was für eine Stabilität des Knockdowns auch nach Metastasierung spricht), noch in den luc-Gruppen, bei deutlich positiver Positivkontrolle und negativen Isotypenkontrollen.

3.5.4 CD24-Immunhistochemie

3.5.4.1 CD24 in den Primärtumoren

Für beide Zelllinien (jeweils im Knockdown und in den luc-Gruppen) fand sich eine Anfärbung von CD24. Diese variierte jedoch von gering (PaCa 5061 CD44 kd) bis stark (BxPC3 CD44 kd, BxPC3 luc, PaCa 5061 luc). Es konnte vereinzelt kernständiges CD24 ausgemacht werden, was allerdings schwer zu beurteilen war. Der Großteil des angefärbten CD24 befand sich membranständig und luminal (siehe Abbildungen 44-46).

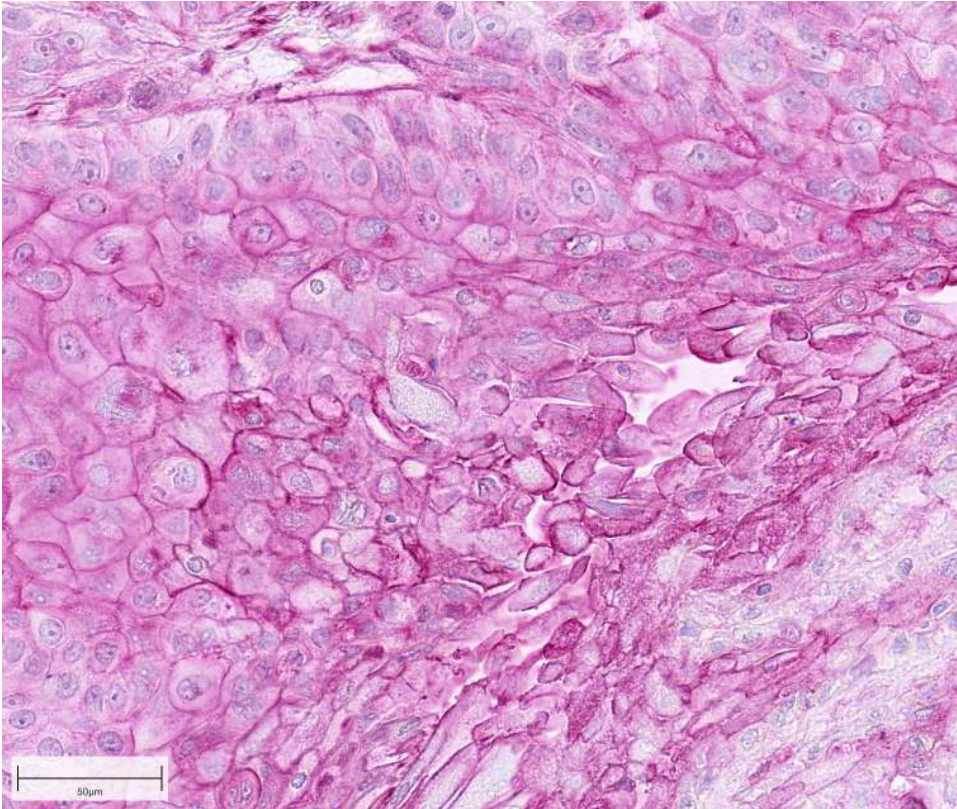


Abbildung 44: Primärtumor von BxPC3 CD44 kd, immunhistochemische Färbung auf CD24, Maßstab 50µm. Man erkennt deutlich die membranständige Anfärbung von CD24.

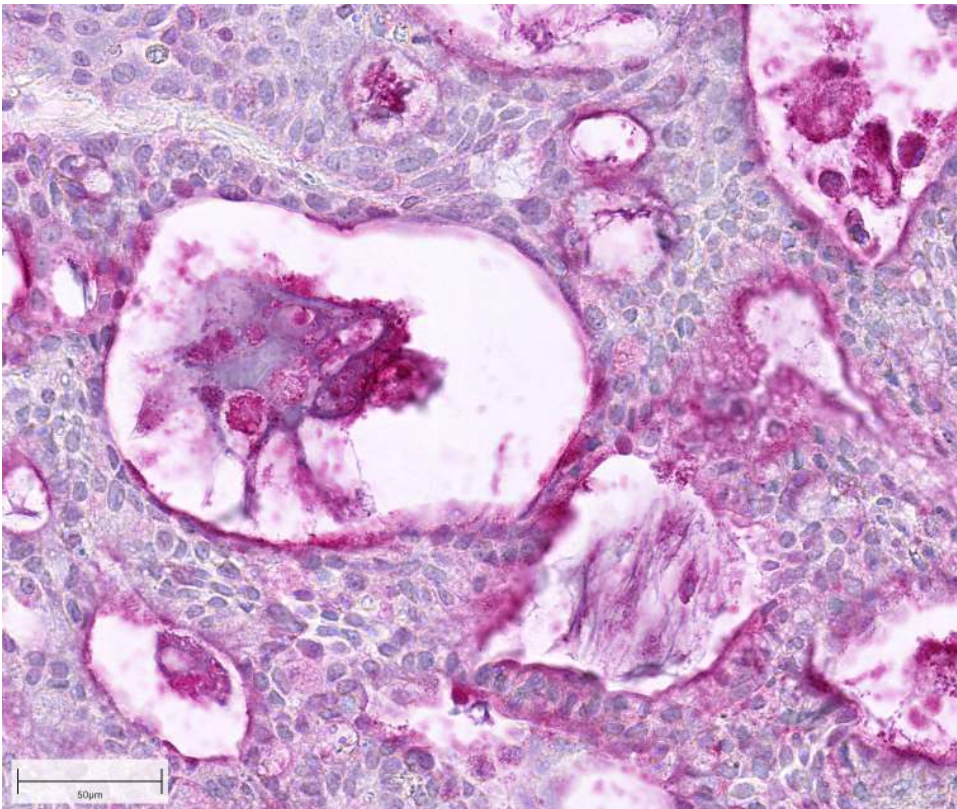


Abbildung 45: Primärtumor von BxPC3 luc, immunhistochemische Färbung auf CD24, Maßstab 50µm. Dargestellt ist eine deutliche Anfärbung an der luminalen Membran.

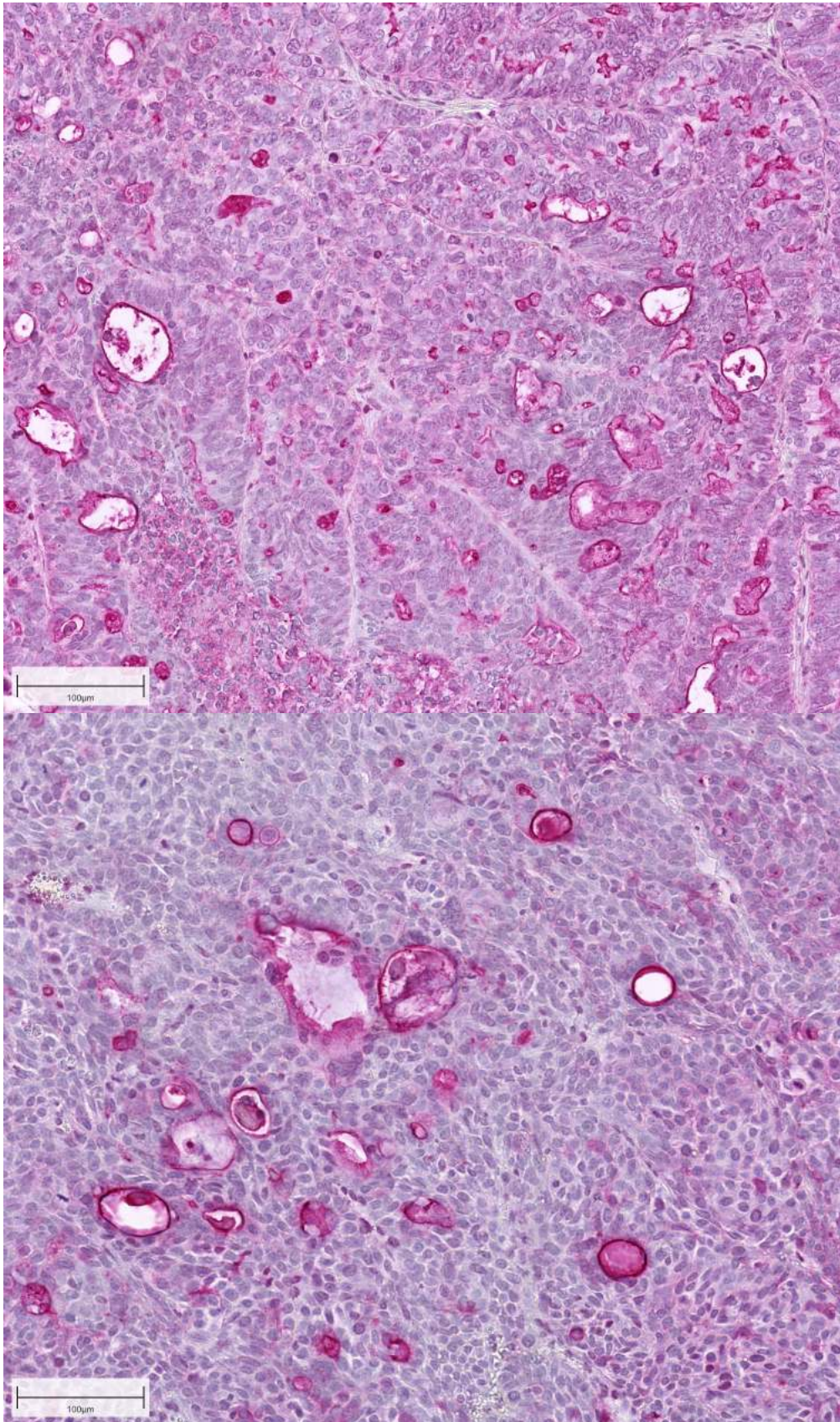


Abbildung 46: Primärtumoren von PaCa 5061 CD44 kd (oben) und PaCa 5061 luc (unten), immunhistochemische Färbung auf CD24, Maßstab 100µm. Dargestellt ist die Anfärbung von CD24, insbesondere an der luminalen Membran.

3.5.4.2 CD24 in den Lungenmetastasen

Sowohl im CD44-Knockdown, als auch in den luc-Gruppen, fand sich keine Anfärbung von CD24 in den Metastasen bei gering positiver Positivkontrolle und negativen Isotypenkontrollen, sowie negativer Negativkontrolle.

4. Diskussion

In der Literatur ist nach wie vor umstritten, welche Auswirkung eine hohe Expression des Zelladhäsionsmolekül und Immunglobulin-Superfamilienprotein CD44 im humanen Pankreaskarzinom hat. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, welchen Einfluss ein gezielter gentechnischer Knockdown von CD44 in humanen Pankreaskarzinomzellen auf die Metastasierung besitzt.

Für PaCa 5061 zeigte sich eine starke Zunahme der Metastasierung, während für BxPC3 bereits in der luc-Gruppe eine große Anzahl an Metastasen/Tumorzellen vorhanden war, die durch den Knockdown tendenziell eher eine Abnahme zeigte. Dies scheint in sich erst einmal widersprüchlich, jedoch könnte hier ein Unterschied der beiden Zelllinien festzumachen sein, welcher nicht direkt abhängig von CD44 ist, da die Zelllinien schon von Grund auf unterschiedliches Potential zur Metastasierung besitzen. Dies ließ sich in dieser Arbeit daran zeigen, dass BxPC3 in der luc-Gruppe mehr Metastasen ausgebildet hat als die luc-Gruppe von PaCa 5061 im Vergleich mit der jeweils dazugehörigen Knockdowngruppe. Es sind noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Gegebenheit genauer zu beleuchten.

Interessanterweise scheint ein Knockdown von CD44 für beide Zelllinien eine vermehrte Bereitschaft zur Auswanderung der Zellen ins Blut zu zeigen. Eine Herunterregulierung des Moleküls scheint zwar eine vermehrte Auswanderung der Tumorzellen ins Blut zu fördern, für die Anheftung oder Ausbildung der Metastasen in der Lunge scheint es aber von geringerer Bedeutung zu sein, da die Erhöhung in der Zahl der zirkulierenden Tumorzellen für BxPC3 eben nicht zu einer erhöhten Metastasierung führt. Zudem zeigten sich in der immunhistochemischen Färbung alle Metastasen - gerade auch diejenigen in den luc-Gruppen - negativ für CD44.

CD44 fand sich vor allem in den Randbereichen der Primärtumoren. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung an einer Invasion der Tumorzellen ins umliegende Gewebe hin. Für die hämatogene Metastasierung scheint es jedoch, wie oben beschrieben, eher hinderlich zu sein. Für das Anwachsen der Metastasen in der Lunge scheint das Zelladhäsionsmolekül im Xenograftmodell hier jedenfalls nicht benötigt zu werden. Da auch die Kontrollgruppen kein CD44 in den Metastasen aufwiesen, scheinen bei diesem Prozess andere Moleküle eine wichtigere Rolle zu spielen. Es ist allerdings vorstellbar, dass eine Verringerung der Zelladhäsion durch den Knockdown von CD44 ausreichen könnte, um den

Metastasierungsvorgang in Gang zu setzen (erhöhte Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut).

Durko et al. untersuchten die klinische Signifikanz von CD24, CD44 und CD133 beim duktalem Pankreaskarzinom und bei chronischer Pankreatitis. Hierzu wurde bei 23 Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom und 15 Patienten mit chronischer Pankreatitis das Gewebe nach Pankreasresektion immunhistochemisch auf oben genannte Marker untersucht. Hier zeigte sich eine höhere Expression dieser Marker im malignen Gewebe, was zur Entstehung der Neoplasie beitragen könnte. Auch kann ein Verlust von CD44 in höheren Tumorstadien zu einer schlechteren Prognose führen (Durko et al. 2017). Ein Verlust von CD44 könnte also, wie in dieser Arbeit hier beschrieben, eine verstärkte Auswanderung der Tumorzellen ins Blut verursachen, welche so eine verstärkte Metastasierungsneigung zeigen, was die von Durko et al. festgestellte schlechtere Prognose erklären könnte. Widersprüchlich ist jedoch, dass die Zelllinie BxPC3 eher eine Abnahme der Metastasierung bei einem Knockdown von CD44 zeigte. Durch den nicht signifikanten p-Wert (Alu-PCR) empfiehlt es sich jedoch weitere Nachforschungen zu dieser Gegebenheit anzustreben. Dieses Ergebnis passt allerdings zu den Untersuchungen von Li et al., die einen Zusammenhang zwischen Metastasierung und Tumorprogress und einer Überexpression von CD44 festgestellt haben (Li et al. 2015).

In dieser Arbeit ist zusammenfassend eine Abnahme der Metastasierung in der Knockdowngruppe von BxPC3 zu sehen, während in der Knockdowngruppe von PaCa 5061 eine Zunahme der Metastasierung zu verzeichnen war. Interessanterweise verhielt sich das Signifikanzniveau in den beiden Zelllinien gegensätzlich. So zeigte sich die Zunahme der Metastasen bei Knockdown von CD44 bei PaCa 5061 in der Zählung nicht signifikant ($p=0,1784$), während sie in der Auswertung der Alu-PCR signifikant war ($p=0,0006$). Bei BxPC3 zeigte sich die Abnahme der Metastasen bei einem Knockdown von CD44 in der Zählung signifikant ($p=0,0004$), während sie in der Alu-PCR ein nicht signifikantes Ergebnis ($p=0,1432$) erbrachte. Es sei jedoch zu erwähnen, dass in der BxPC3-Gruppe insgesamt mehr Tiere zur Auswertung zur Verfügung standen.

Morphologisch war in allen Zelllinien ein heterogenes Bild von Lungenmetastasen zu finden. Es waren jeweils sowohl große, als auch kleine Metastasen zu detektieren. In größeren Metastasen zeigten sich bereits duktale Formationen. Hieraus lässt sich schließen, dass selbst in den Metastasen eine gewisse Fähigkeit der Tumorzellen zur Differenzierung vorhanden bleibt. Ob diese Differenzierung einen Vorteil für eine mögliche Therapie der Lungenmetastasen bietet, müsste weiter untersucht werden.

Das Überleben der Mäuse zeigte sich beim Knockdown von CD44 für PaCa 5061 verkürzt ($p=0,0005$), während für BxPC3 kein Unterschied im Überleben der Knockdowngruppe und der luc-Gruppe festgestellt werden konnte ($p=0,1834$). Die Tumore von PaCa 5061 neigten im Knockdown von CD44 frühzeitig zur Ulzeration, was ein Abbruchkriterium darstellte und ein starkes Indiz für ein aggressives/invasives Tumorwachstum ist.

Zusätzlich wurden die Tumore auf ein weiteres Zelladhäsionsmolekül untersucht. Hierbei handelte es sich um CD24. CD24 färbte sich vor allem membranständig und luminal in den Primärtumoren an. In den Lungenmetastasen konnte eine Expression von CD24, wie auch CD44, nicht gefunden werden. Für die Ausbildung von Lungenmetastasen scheint CD24 demnach laut dieser Arbeit ebenfalls keine Rolle zu spielen.

In der Masson-Goldner-Färbung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien. Während PaCa 5061 nur eine gering ausgeprägte Stromakomponente aufwies, fand sich hingegen in BxPC3 eine stark vorhandene desmoplastische Reaktion. Diese Reaktion konnte sowohl in BxPC3 luc, als auch in BxPC3 CD44 kd festgestellt werden und ist damit eher auf die Zelllinie an sich und nicht auf den CD44-Knockdown zurückzuführen.

Ein immunhistochemischer Nachweis für Mausleukozyten (CD45) konnte für alle Tumoren geführt werden. Dabei fand sich die Anfärbung vor allem im peritumorösen Bindegewebe und in den Stromasträngen, die den Tumor durchzogen. Für die luc-Gruppe von BxPC3 fand sich eine etwas geringere Anfärbung als für die BxPC3-Knockdowngruppe. Interessanterweise verhielt es sich für die Zelllinie PaCa 5061 umgekehrt. Hier zeigte sich in der Knockdowngruppe eine etwas schwächere Anfärbung im Vergleich zur luc-Gruppe. Da sich die CD45-positiven Zellen hauptsächlich im Mausbindegewebe und vereinzelt im Tumor selbst zeigten, war die Auswertung davon abhängig wie viele murine Stromastränge in den Tumor hineinzogen und wie viele von diesen auch tatsächlich im Präparat angeschnitten waren. Es zeigte sich also ein inverses Verhalten der beiden Zelllinien (PaCa 5061 luc > PaCa 5061 CD44 kd; BxPC3 luc < BxPC3 CD44 kd). Das heißt, dass tendenziell eine stärkere Anfärbung in der luc-Gruppe von PaCa 5061 zu finden war, im Gegensatz dazu aber eher mehr Anfärbung in der Knockdowngruppe von BxPC3. Der Knockdown hat also für die beiden Zelllinien eine unterschiedliche Wirkung bezüglich der Leukozyteninfiltration in die Primärtumore. Ob hier ein Zusammenhang zum unterschiedlichen Metastasierungsverhalten der beiden Linien nach CD44-Knockdown besteht, lässt sich aus dem bestehenden Modell nicht ableiten. Eher gegen einen direkten Zusammenhang spricht zudem die Tatsache, dass die

Verteilung der Leukozyten in den Lungenmetastasen für alle Gruppen eben nicht unterschiedlich war.

Eine weitere Besonderheit, die in dieser Arbeit aufgefallen ist, zeigte sich in den Primärtumoren beider luc-Gruppen. Hier fanden sich siegelringartige, schleimproduzierende Zellen, die in massiver Anzahl in PaCa 5061 luc und in geringerer Anzahl auch in BxPC3 luc aufgezeigt werden konnten. Bereits in der HE-Färbung waren diese Zellen deutlich erkennbar und zeigten in der PAS-Färbung eine sehr starke Reaktion, waren jedoch in den Tumoren der CD44-Knockdowngruppen in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die humanen Pankreaskarzinomzellen beider Zelllinien durch den CD44-Knockdown die Fähigkeit zur Differenzierung zu diesen siegelringartigen Zellen verlieren. Der angedeutete Verlust der Differenzierung ließ sich auch mit der Auswertung der dukталen Strukturen in der HE-Färbung erahnen. Es zeigten sich in beiden luc-Gruppen eine größere Anzahl dukталer Formationen, während diese in den Knockdowngruppen weniger waren und tendenziell kleiner ausfielen. Insgesamt fand sich in den luc-Gruppen eine stärkere PAS-positive Anfärbung als in den Knockdowngruppen, was auch, wie in der HE-Färbung schon festgestellt, auf eine schlechtere Differenzierung der Tumore durch den Knockdown hindeutet. Die siegelringartigen Zellen konnten in den Lungenmetastasen nicht gefunden werden. Dies bestärkt wiederum für PaCa 5061 die Aussage, dass durch einen CD44-Knockdown die Fähigkeit zur Differenzierung sinkt, denn weniger Differenzierung in den Primärtumoren ist in der Klinik häufig mit einer Zunahme der Metastasierung assoziiert. Für BxPC3 konnte dies nicht gezeigt werden, hier nahm die Metastasierung tendenziell eher ab. Von BxPC3 gebildete Tumore wirkten von vornherein weniger stark differenziert, was auch mit dem Vorhandensein vieler Metastasen bereits in der luc-Gruppe korrespondiert. Daher könnte auch der Unterschied nach Durchführung des Knockdowns für BxPC3 so wenig ausgeprägt ausfallen. Der Einfluss eines Knockdowns von CD44 hat unterschiedlichen Einfluss auf die einzelnen Pankreastumore der zwei Zelllinien, was dieses Tiermodell erfolgreich abbilden konnte. Eine Veränderung der Genexpression durch den Knockdown könnte den ausschlaggebenden Einfluss auf die unterschiedlichen Zelllinien des Pankreaskarzinoms geben. Dies sollte in Anschlussarbeiten genauer aufgearbeitet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pankreaskarzinomzellen von PaCa 5061, die einem Knockdown von CD44 unterliegen, sowohl eine vermehrte Bereitschaft zur Auswanderung ins Blut, als auch eine verstärkte Metastasierungsneigung zeigten. Für BxPC3 zeigte sich bei Knockdown von CD44 eine Abnahme der Lungenmetastasen, bei

gleichzeitiger Zunahme der Migration der Tumorzellen ins Blut. Alle Metastasen waren frei von CD44, was auf einen erfolgreichen Knockdown hindeutete, zusätzlich aber auch die Hypothese unterstützt, dass CD44 nicht für die letztendliche Ausbildung von Metastasen benötigt wird, da auch die Metastasen in den luc-Gruppen frei von CD44 waren. CD44 könnte eventuell sogar ein Hindernis für die Auswanderung der Tumorzellen und der Bildung von Metastasen darstellen. Die CD44-positiven Pankreaskarzinomzellen der Primärtumoren in den luc-Gruppen fanden sich allerdings vermehrt am Tumorrand, was für eine Beteiligung des Moleküls an einer Invasion ins umliegende Gewebe spricht.

5. Zusammenfassung/Summary

Das zur Superfamilie der Immunglobuline gehörende CD44 ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches vielfältige Funktionen besitzt, die alle abhängig von der Zelladhäsion sind. In der Fachliteratur ist nach wie vor umstritten, welche Bedeutung eine hohe Expression von CD44 für die Metastasierung im humanen duktalem Pankreaskarzinom besitzt. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Auswirkung eine Reduzierung von CD44 im Hinblick auf die Metastasierung und die allgemeine Tumormorphologie in den humanen Pankreaskarzinomzelllinien PaCa 5061 und BxPC3 hervorruft. Hierzu wurde mittels shRNA in den genannten Zelllinien ein Knockdown von CD44 von 90% generiert und in einem subkutanen Xenograftmodell in immundefizienten Mäusen eingesetzt. Dieser Knockdown wurde mit Kontrollgruppen verglichen. Die gewachsenen Tumoren wurden mittels verschiedener histologischer Färbungen (HE, PAS, Masson-Goldner) und Immunhistochemie (CD44, CD24, CD45) begutachtet. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Metastasenzählung in den Mäusen und eine quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion mit Alu-Sequenzen von Mäusen und Mausblut. Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von Tumorzellen pro 10^6 Mäusen für die Knockdowngruppe von PaCa 5061 (Alu-PCR $p=0,0006$; Zählung nicht signifikant $p=0,1784$) und gleichzeitig eine signifikant höhere Anzahl von Tumorzellen pro 10^6 Mäusen im Vergleich zur luc-Gruppe. Für BxPC3 konnte eine höhere Anzahl an Tumorzellen pro 10^6 Mäusen im Knockdown festgestellt werden (knapp nicht signifikant). Die Untersuchung der Alu-PCR der Mäusen erbrachte für BxPC3 einen höheren Wert in der luc-Gruppe, allerdings ohne Signifikanz ($p=0,1432$, Zählung signifikant $p=0,0004$). Im Gesamtüberleben der Tiere fand sich für BxPC3 kein Unterschied, während die Tumoren von PaCa 5061 in der Knockdowngruppe frühzeitig ulzerierten und die luc-Gruppe demnach ein deutlich längeres Überleben zeigte. In der immunhistochemischen Färbung fiel auf, dass die luc-Gruppen CD44 vermehrt am Tumorrand ausbilden, außerdem stellten sich alle untersuchten Mäusenmetastasen CD44-negativ dar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie PaCa 5061, die einem Knockdown von CD44 unterliegen, eine vermehrte Bereitschaft zur Auswanderung ins Blut und eine verstärkte Metastasierungsneigung zeigten. Die Ergebnisse für BxPC3 zeigten eher eine Abnahme der Metastasierung, es fanden sich aber Ähnlichkeiten was das Auswandern der Tumorzellen ins Blut in der Knockdowngruppe im Vergleich zur luc-Gruppe angeht.

CD44 is a transmembraneous glycoprotein that is part of the immunoglobulin superfamily and has various functions that are all depending on cell adhesion. The meaning of a high expression of CD44 for metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma is still controversial in the literature. This study aimed to find out what impact a reduction of CD44 in the human pancreatic cell lines PaCa 5061 and BxPC3 on metastasis and general tumor morphology has. For that to happen, we created a 90% knockdown of CD44 using shRNA in a subcutaneous xenograft model in immunodeficient mice. Afterwards the tumors were histologically (HE, PAS, Masson-Goldner) and immunohistochemically (CD44, CD24, CD45) stained and evaluated. The animal lungs were screened for metastases. Those lung metastases were counted light microscopically and we performed a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) with Alu-sequences on the lungs and the blood of the mice. The results showed a significantly higher mass of tumor cells per 10^6 murine lung cells and murine leukocytes of the PaCa 5061 knockdown group compared to the luc group (Alu-PCR $p=0,0006$; counting $p=0,1784$). The results showed a higher mass of tumor cells per 10^6 murine leukocytes for the BxPC3 knockdown group and a higher mass of tumor cells per 10^6 murine lung cells for the luc group (Alu-PCR $p=0,1432$; counting $p=0,0004$). The overall survival displayed no difference between the knockdown and the luc group for BxPC3. The tumors of PaCa 5061 had a disposition to an early ulceration with the result that the luc group showed a higher overall survival. We found in the immunohistochemical staining that the expression of CD44 in the luc groups were increased in the tumor periphery. Every single examined metastasis in the animal lungs were negative for CD44. In summary, tumor cells of PaCa 5061, that underwent a knockdown of CD44 showed a higher rate for emigration into the blood and the lungs of the mice. The results for BxPC3 showed a similar pattern of emigration of the tumor cells into the blood in the knockdown group compared to the luc group, but a reduction of metastasis in the knockdown group.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
aqua dest.	destilliertes Wasser
CA19-9	carbohydrate antigen 19-9
CD	cluster of differentiation
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
kd	Knockdown
kDa	Kilodalton
luc	Kontrollgruppe
mAb	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAS	periodic acid Schiff
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
R0	Resektion im Gesunden
s	standard
shRNA	small hairpin Ribonukleinsäure
SO ₂	Schwefeldioxid
TBS	tris-buffered saline
TBS-T	tris-buffered saline + Tween
TNM	Tumorklassifikation
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
v	variant
V.	Vena
5-FU	5-Fluorouracil

7. Literaturverzeichnis

Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P (1997): CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selektin on human tumor cells. *Blood*. 89(9):3385-3395.

Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP (2005): CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 65(23):10783-10793.

Bob A, Bob K (2013): *Duale Reihe Innere Medizin*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart. 650-669.

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (2012): *Pathologie*. 5. Auflage. Urban & Fischer Verlag. Elsevier GmbH. München. 675-683.

DocCheck Flexikon (2018) – Hämatoxylin-Eosin-Färbung. [Online im Internet] <http://flexikon.doccheck.com/de/Hämatoxylin-Eosin-Färbung> [27.07.2018, 13:25 Uhr].

Durko L, Wlodarski W, Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Hogendorf P, Strzelczyk J, Malecka-Panas E (2017): Expression and clinical significance of cancer stem cell markers CD24, CD44 and CD133 in pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Dis Markers*. Volume 2017, Article ID 3276806.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Langversion 1.0. AWMF. Registernummer: 032-010OL. [Online im Internet] https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Pankreaskarzinom/LL_Pankreas_OL_Langversion.pdf [17.05.2018, 18:14 Uhr].

Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, Guo WJ (2015): Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(6):6724-6731.

Robert-Koch-Institut (2017): Krebs in Deutschland für 2013/2014. [Online im Internet] https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2

017/kid_2017_c25_bauchspeicheldruese.pdf?__blob=publicationFile [17.05.2018, 18:23 Uhr].

Rossi ML, Rehman AA, Gondi CS (2014): Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 20(32):11142-11159.

Sneath RJS, Mangham DC (1998): The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 51:191-200.

Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M (2016): *Harrisons Innere Medizin.* 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag GmbH. Berlin. 675-679, 2565-2568.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011): Pancreatic cancer. *Lancet.* 378(9791):607-620.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH (2013): Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 63(5):318-348.

8. Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Daniel Wicklein für die Bereitstellung des Projekts und die allzeit gute Stimmung und Beratung, mit der diese Arbeit zu einer angenehmen Erfahrung wurde.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch dem Institutsleiter Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien. Danke auch für den allzeit tollen Präparierkurs und den 2nd-Track, bei denen meine Begeisterung für die Anatomie geweckt wurde.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des anatomischen Instituts, für die Einarbeitung, der Erklärung neuer Arbeitsschritte und dem offenen Ohr für jegliche Fragen. Ich habe die Atmosphäre und Zeit bei euch sehr genossen. Vielen Dank an Maike, Tjandrawati, Jennifer, Christine und Tobias für die Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Makowski, für die Organisation rund um die Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei meiner gesamten Familie, insbesondere bei meiner Mutter, meinem Bruder und Lena, Oma, Opa und natürlich meinem Ehemann. Danke, dass ihr immer für mich da seid, ein offenes Ohr habt und mich bei allen Entscheidungen unterstützt. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Vater, der leider viel zu früh von uns gegangen ist.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei Marina und Marie-Sophie, die mir während meines Abiturs immer zur Seite standen. Ich denke gerne an diese Zeit zurück. Vielen Dank auch an Antonia, Jennifer und Nina, ich habe jede Minute des Studium mit euch genossen und wünsche euch eine ganz besondere Zeit auf eurem weiteren Weg!

9. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: