

## **Reprogrammierung des duktales Pankreaskarzinoms unter FOLFIRINOX Therapie**

Patrick Frederic Wustrow

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der  
Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Medizin (Dr.med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanne Kossatz

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Maximilian Reichert
2. apl. Prof. Dr. Rickmer Braren

Die Dissertation wurde am 03.01.2024 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 07.08.2024  
angenommen.

---



**Diese Promotion widme ich meinen Eltern und  
meiner Familie, welchen ich dieses Studium zu  
verdanken habe.**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>XI</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XII</b>
<b>Summary</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Aktuelle Therapieoptionen bei PDAC</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Chemotherapieresistenz im PDAC</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 PDAC-Subtypen</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT)</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6 Glucose Metabolismus im PDAC</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Technische Geräte</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4 Antikörper</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5 Medikamente</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6 Zellkultur</b> .....	<b>24</b>
<b>3.7 Histologie</b> .....	<b>25</b>
<b>3.8 Software</b> .....	<b>26</b>
<b>4 Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Zellkultur</b> .....	<b>27</b>
4.1.1 Kultivierung von Zelllinien.....	27
4.1.2 MTT Assay .....	28
4.1.3 F18-FDG-Aufnahme Assay .....	29
<b>4.2 Tierversuche</b> .....	<b>29</b>
4.2.1 Versuchstiere und Haltungsmethoden .....	29
4.2.2 Orthotope Implantation .....	30
4.2.3 Dissektion .....	31
<b>4.3 Bildgebung</b> .....	<b>31</b>
4.3.1 Magnetresonanztomographie .....	31
4.3.2 Positronenemissionstomographie .....	32
<b>4.4 Histologische Analysen</b> .....	<b>32</b>
4.4.1 Formalin Fixierung und Paraffin-eingebettete Gewebsschnitte .....	32
4.4.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung .....	33
4.4.3 Immunhistochemische Färbung .....	33
4.4.4 Immunfluoreszenzfärbung .....	34
4.4.5 Statistische Analyse .....	36

<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
5.1	Phänotypische Charakterisierung von Pankreastumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten <i>in-vivo</i> .....	37
5.2	Bestimmung der Wachstumsdynamik und Darstellung der glykolytischen Aktivität von Pankreastumoren <i>in-vivo</i> .....	42
5.3	Wachstumsanalyse von subtypspezifischen PDAC Zellen nach FOLFIRINOX Therapie <i>in-vitro</i> .....	43
5.4	Dynamische Bestimmung der <sup>18</sup> F-FDG-Aufnahme nach FOLFIRINOX Therapie <i>in-vitro</i> .....	46
5.5	Charakterisierung der subtypspezifischen Tumorzeldifferenzierung und zellulären Plastizität nach FFX Therapie <i>in-vitro</i> .....	48
5.6	Orthotope Implantation von post-wash-out-FFX Zellen in murinen Pankreas	50
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
6.1	Charakterisierung der subtypspezifischen PDAC Tumorzellen .....	53
6.2	Wachstumsverhalten von unbehandelten und FOLFIRINOX therapierten PDAC Tumorzellen.....	55
6.3	EMT Prozess als Plastizitätsmechanismus unter FOLFIRINOX Therapie.....	57
6.4	Subtypspezifische Unterschiede im Glucosemetabolismus nach FOLFIRINOX Therapie .....	60
6.5	Ausblick .....	62
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>75</b>

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 2: In dieser Studie verwendete technische Geräte .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 3: In dieser Studie verwendete Reagenzien, Chemikalien und Enzyme ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 4: In dieser Studie verwendete primäre Antikörper .....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 5: In dieser Studie verwendete sekundäre Antikörper.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 6: In dieser Studie verwendete Medikamente .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 8: Reagenzien/Kits für die Histologie .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 9: In dieser Studie verwendete Software-Programme.....</b>	<b>26</b>





## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Histologische Analysen des unbehandelten Pankreastumorgewebes zum frühen Zeitpunkt T1 und späten Zeitpunkt T3 .....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbungen von orthotop implantierten Pankreastumoren.....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 3: Bestimmung der Aktivität des Glucose Metabolismus im PDAC mittels MRT/PET und Glut1-Expression.....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 4: Wachstumsanalyse von epithelialen und mesenchymalen PDAC Zellen in-vitro (MTT-assay) .....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 5: <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme nach FOLFIRINOX (FFX) Therapie in-vitro mittels Gamma-Zähler .....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbungen von epithelialen und mesenchymalen Zelllinien und deren EMT-Marker Expression in-vitro .....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 7: HE-Färbung von orthotop implantierten post-wash-out-FFX epithelialen und mesenchymalen Tumorzellen .....</b>	<b>51</b>



## **Abkürzungen**

<b>CK-19</b>	<b>Cytokeratin 19</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>EMT</b>	<b>epitheliale zu mesenchymale Transition</b>
<b>FFX</b>	<b>FOLFIRINOX (5-Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin)</b>
<b>Gem</b>	<b>Gemcitabin</b>
<b>HE</b>	<b>Hämatoxylin-Eosin Färbung</b>
<b>KRAS</b>	<b>v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma</b>
<b>IF</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbungen</b>
<b>IHC</b>	<b>Immunhistochemischefärbungen</b>
<b>MTT</b>	<b>3-(4,5-dimethyl-3-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid</b>
<b>nP</b>	<b>nab-Paclitaxel</b>
<b>PDAC</b>	<b>Duktales Adenokarzinom des Pankreas</b>
<b>Prrx1</b>	<b>Paired-related homebox 1 Transcriptionsfaktor</b>
<b>PFA</b>	<b>Paraformaldehyd</b>
<b>Slug</b>	<b>Zinkfinger Protein SNAI2</b>
<b>Snail</b>	<b>Zinkfinger Protein SNAI1</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Transforming growth factor <math>\beta</math></b>
<b>Twist</b>	<b>twist-related protein 1</b>
<b>Zeb1/2</b>	<b>Zinkfinger E-box-binding homebox 1/2</b>

**Abkürzungen nach dem internationalen Standardisierungssystem (SI-Einheiten) sind nicht enthalten.**

## Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zählt zu den am häufigsten auftretenden Arten des Pankreaskrebs und geht aufgrund des unzureichenden therapeutischen Ansprechens mit einer schlechten Prognose einher. In der medikamentösen Therapie gegen das PDAC im fortgeschrittenen Stadium gelten die systemischen Chemotherapie-Kombinationen FOLFIRINOX (FFX) und Gemcitabin (Gem) plus nab-Paclitaxel (nP) als aktueller Goldstandard. Obwohl unter FFX Therapie die Prognose des fortgeschrittenen Bauchspeicheldrüsenkrebs im Vergleich zur Gem-Monotherapie leicht verbessert werden konnte, führt die Entwicklung der Chemoresistenz immer noch zu schlechten klinischen Ergebnissen. Dies verdeutlicht die dringende Notwendigkeit die molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die die Entstehung und das Fortschreiten des PDAC trotz Chemotherapie vorantreiben. Auf Grundlage der Chemoresistenzmechanismen, die bereits bei Gem-resistenten Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* der Einfluss der FFX Therapie auf epitheliale und mesenchymale PDAC-Subtypen, Veränderungen in der Expression von EMT-Markern, sowie subtypspezifische Unterschiede in der Glut1-Expression analysiert. Unter Verwendung muriner orthotoper Tumormodelle sowie epithelialen und mesenchymalen Zelllinien konnten wir mittels Wachstumsanalysen, HE-, IHC-Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen, Einblick in die Effekte einer FFX Therapie *in-vitro* und *in-vivo* erzielen. Durch *in-vivo* PET-Analysen und einem *in-vitro* 18F-FDG-Aufnahme Assay sowie histologische Analysen wurden Veränderungen im Glucosemetabolismus untersucht.

Nach erfolgter FFX Therapie zeigte sich kurzzeitig subtypspezifisch ein deutlicher Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit, wobei die post-wash-out-FFX therapierten Zellen eine schnelle Regenerationsfähigkeit aufwiesen. Beim epithelialen Phänotyp

konnte durch die Hochregulierung der Vimentin Expression bei gleichzeitiger Abnahme der E-Cadherin Expression nach FFX Therapie eine möglicherweise beginnende Epithelial zu Mesenchymale-Transition (EMT) identifiziert werden. Bei Betrachtung der glykolytischen Aktivität nach FFX Therapie zeigte der epitheliale Zelltyp eine gesteigerte Glut1-Expression, wobei die mesenchymalen Tumorzellen eine Reduktion der Glut1-Expression, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, aufwiesen. Zusammenfassend zeigte sich eine schnelle Regenerationsfähigkeit der Tumorzellen nach Abbruch der FFX Therapie, phänotypische Veränderungen, in Form einer epithelial zu mesenchymalen Transition, sowie eine Modifikation des Glucosemetabolismus unter Therapie. Diese Ergebnisse bieten einen Einblick in potenzielle molekulare Mechanismen, die zur Chemoresistenz im PDAC beitragen und möglicherweise neue Ansatzpunkte für zukünftige Therapiestrategien darstellen.

---



## Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most common types of pancreatic cancer and continues to be associated with a very poor prognosis due to inadequate therapeutic response.

The systemic chemotherapy combinations FOLFIRINOX and gemcitabine plus nab-paclitaxel serve as the current first line drug-based therapy against PDAC in advanced stages. Although under FOLFIRINOX therapy the prognosis of the advanced pancreatic cancer was slightly improved compared to gemcitabine monotherapy, the development of chemoresistance still leads to poor clinical outcomes. This highlights the urgent need to decipher the mechanisms that drive the development and progression of PDAC despite chemotherapy.

Based on the chemoresistance mechanisms that have already been demonstrated in gemcitabine-resistant cells, we analyzed, both *in-vitro* and *in-vivo*, the impact of FFX therapy on epithelial and mesenchymal PDAC subtypes, changes in the expression of EMT markers and subtype-specific differences in Glut1-expression. With tissue sections from murine orthotopic tumor models as well as epithelial and mesenchymal cell lines, we obtained interesting insights using untreated and FFX treated PDAC tumor cells by conducting growth analysis, HE-, IHC images and immunofluorescence stainings. *In-vivo* PET analysis and an *in-vitro* 18F-FDG uptake assay as well as histological analysis were used to investigate changes in Glut1-expression. After performing FFX therapy a marked decrease in growth rate can be observed in a subtype-specific manner with post-washout FFX treated cells showing a rapid regenerative capacity. In the epithelial phenotype the upregulation of vimentin expression with a concomitant decrease in E-cadherin expression, post-FFX therapy identifies a possibly incipient EMT process. When looking at glycolytic activity the epithelial post-FFX cell type shows increased Glut1-expression

with the mesenchymal tumor cells showing a reduction in Glut1-expression compared to the untreated control. In summary, rapid tumor cell regeneration upon cessation of FFX therapy, phenotypic alterations in the form of epithelial to mesenchymal transition, along with modification of glucose metabolism during treatment, are discernible. These findings provide insight into potential molecular mechanisms contributing to chemoresistance in PDAC, potentially affording novel avenues for future therapeutic strategies.



# 1 Einleitung

---

## 1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit 85% die häufigste Art des Bauchspeicheldrüsenkrebs und entsteht in den exokrinen Anteilen des Organs (Hidalgo, 2015). Trotz einer niedrigen Inzidenz von 2,5% im Vergleich zu anderen Krebsarten, hat das Pankreaskarzinom eine sehr schlechte Prognose (Bray et al., 2018). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in den USA bei 12% und fällt bei einer Diagnose im fortgeschrittenen Stadium auf 3% ab (Siegel, Miller, Wagle, & Jemal, 2023). Dabei wird für 2030 prognostiziert, dass sich das Pankreaskarzinom von der vierthäufigsten zu der zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache entwickelt, wohingegen die Todesfälle für andere Krebsarten teilweise abnehmen werden (Rahib et al., 2014). Aufgrund der unspezifischen und spät auftretenden Symptome wird die Diagnose bei mehr als 80% der Patienten in einem späten Stadium (III und IV) gestellt und nur 20-25% der Betroffenen haben einen lokal begrenzten Tumor, welcher für eine chirurgische Resektion geeignet ist (Gillen, Schuster, Meyer Zum Büschenfelde, Friess, & Kleeff, 2010; Hidalgo, 2010). Bei den Risikofaktoren für die Entwicklung des duktales Pankreaskarzinoms unterscheidet man zwischen vererbten und modifizierbaren Komponenten. Das Auftreten von erblich bedingten Faktoren kann das Risiko von PDAC um 80% erhöhen, wobei 10% aller Tumore erblich bedingt sind. Zu den wesentlichen modifizierbaren Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms, gehören ein hoher Tabak- und Alkoholkonsum, eine maladaptive Ernährung, sowie die metabolischen Faktoren wie Fettleibigkeit, Diabetes und eine chronische Pankreatitis (Becker, Hernandez, Frucht, & Lucas, 2014; Pang, Holmes, Chen, & Kartsonaki, 2019; Rawla, Sunkara, & Gaduputi, 2019). PDAC kennzeichnet sich durch eine konstitutive Aktivierung des Onkogens *Kirsten rat sarcoma (KRAS)*

Gens, insbesondere durch die *G12D* Mutation sowie durch eine Suppression des Tumorsuppressorgens *Tumor protein 53 (TP53)* (Raphael-BJ et al., 2017). Das PDAC charakterisiert sich durch eine hohe genetische und metabolische Heterogenität, wodurch die Therapie, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium, weiterhin eine große Herausforderung darstellt. Systemische Chemotherapie-Kombinationen wie FOLFIRINOX und Gemcitabin plus nab-Paclitaxel sind der aktuelle Goldstandard in der Therapie von Patienten mit fortgeschrittenem Tumor (Adamska, Domenichini, & Falasca, 2017). Die weiterhin schlechte Prognose von PDAC-Patienten unterstreicht die Dringlichkeit mit der bestimmte Mechanismen, die in der Tumorprogression involviert sind, aufgedeckt werden müssen, um weitere noch effizientere und innovative Therapieoptionen für das fortgeschrittene Stadium zur Verfügung zu stellen.

---

## **1.2 Aktuelle Therapieoptionen bei PDAC**

Zu den aktuellen Therapieoptionen bei PDAC gehören die Tumorresektion, Strahlentherapie, Chemotherapie, Chemo-Strahlentherapie und zielgerichtete Therapien, wobei die chirurgische Resektion in den meisten Fällen, die einzige Chance auf Heilung darstellt (Adamska et al., 2017; Siegel, Miller, & Jemal, 2020). Nachdem Gemcitabin über mehrere Jahre als Erstlinientherapie gegen das metastasierte PDAC eingesetzt wurde, wurde es vor fast 10 Jahren durch die systemischen Chemotherapie-Kombinationen FOLFIRINOX und Gemcitabin plus nab-Paclitaxel für die Behandlung von Patienten im fortgeschrittenen Stadium ersetzt.

Gemcitabin (2', 2'-Difluorodeoxycytidin, dFdC) ist ein Nukleosid-Cytidin (Pyrimidin)-Analogon, das als Pro-Drug in seiner phosphorylierten Form in die replizierende DNA eingebaut wird und dadurch die DNA-Synthese hemmt (Hertel et al., 1990). Auf der Grundlage der Ergebnisse von Burris et. al 1997, wurde Gemcitabin 1997 als

Erstlinientherapie durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. In der vergleichenden-Phase-III-Studie zeigte Gemcitabin als Einzelwirkstoff ein verbessertes medianes Gesamtüberleben (5,6 vs. 4,4 Monaten), sowie eine bessere Gesamtansprechrates (24% vs. 5%) im Vergleich zur Gruppe von Patienten, die mit 5-Fluoruracil (5-Fu) behandelt wurden. Die häufigste unerwünschte Wirkung ist eine Grad 3/4 Neutropenie, bei ansonsten guter Verträglichkeit (Burriss et al., 1997).

Als neue Therapieoption entwickelte sich das Chemotherapieschema aus FOLFIRINOX. FOLFIRINOX stellt eine Kombination aus Wirkstoffen dar, die sowohl alleine als auch in Kombination ihre Wirksamkeit unter Beweis gestellt haben. Es setzt sich zusammen aus 5-Fluoruracil (5-Fu), Leucovorin, Oxaliplatin und Irinotecan. Dabei wirkt 5-Fluoruracil als Pyrimidin-Antagonist, Leucovorin dient als Folsäure zur Verringerung der Nebenwirkungen, Oxaliplatin ist ein DNA-Reparatur-Inhibitor und Irinotecan bewirkt als Topoisomerase-Inhibitor eine Hemmung der DNA-Replikation (Azrak et al., 2004; Ducreux et al., 2004; Ueno et al., 2007). FOLFIRINOX zeigte im Vergleich zu Gemcitabin ein signifikant besseres Ansprechen, mit einer medianen Verlängerung des Überlebens um 4,3 Monate sowie einem längeren progressionsfreien Überleben (6,4 vs. 3,3 Monate) (Conroy et al., 2011). Wohingegen das Nebenwirkungsprofil der Kombinationstherapie, verglichen zur Gemcitabin Monotherapie, deutlich schlechter ausfällt. Als häufigste unerwünschte Ereignisse treten Thrombozytopenien, febrile Neutropenien sowie Übelkeit und sensorische Neuropathien auf. Daher wird die Behandlung mit FOLFIRINOX bevorzugt für Patienten unter 75 Jahren bei gutem Allgemeinzustand empfohlen (Conroy et al., 2011; Gourgou-Bourgade et al., 2013).

Ein weiteres Chemotherapieschema beschreibt die Kombination aus Gemcitabin und einem an Albumin gebundenen Nanopartikel (nab) Paclitaxel. Paclitaxel führt durch die Bindung an alpha-Tubulin und die Bildung von Tubulinpolymeren, zu einer

Unterdrückung der Mikrotubuli-Dynamik und somit schließlich zum Zelltod (Abal, Andreu, & Barasoain, 2003). Die Albumin-gebundene Form von Paclitaxel erwies sich aufgrund günstiger pharmakokinetischer Eigenschaften als die vorrangige Variante. Dabei bewirkt es unter anderem durch die stromale Depletion und die Zunahme der Tumervaskularisation, eine höhere intratumorale Gemcitabinkonzentration (Sato et al., 2003; Von Hoff et al., 2011). Die Kombinationstherapie zeigte im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie eine signifikante Steigerung im therapeutischen Ansprechen von Patienten mit metastasiertem PDAC (Hennenfent & Govindan, 2006; Von Hoff et al., 2013). In einer Phase-III-Studie zeigte Gemcitabin plus nab-Paclitaxel im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie ein längeres medianes Gesamtüberleben (8,5 vs. 6,7 Monate) und progressionsfreies Überleben (5,5 vs. 3,7 Monate) sowie eine höhere Ansprechrate (32% vs. 7%). Unter der Therapie mit Gemcitabin plus nab-Paclitaxel traten hingegen ebenfalls vermehrt Nebenwirkungen wie Neutropenien, febrile Neutropenien, Fatigue, Diarrhoe und Neuropathien auf, weshalb ein guter Allgemeinzustand des Patienten wichtig ist (Von Hoff et al., 2013).

Vergleicht man die Wirksamkeitsparameter der beiden Kombinationstherapien aus den Zulassungsstudien miteinander, zeigte FOLFIRINOX ein besseres medianes Überleben als Gemcitabin plus nab-Paclitaxel (11,1 vs. 8,5 Monate), wohingegen ein direkter Vergleich bisher nicht untersucht wurde (Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013). Anhand einer retrospektiven Metaanalyse durch Puscenddu et al, konnte im Überleben ein Unterschied von 1,15 Monaten, zugunsten von FOLFIRINOX, identifiziert werden (Pusceddu et al., 2019).

Nach aktuellem Kenntnisstand, wird FOLFIRINOX, aufgrund der behandlungsbedingten Toxizität bevorzugt bei relativ jungen Patienten mit gutem Allgemeinzustand empfohlen, wohingegen Gemcitabin plus nab-Paclitaxel bei älteren, multimorbiden Patienten häufiger eingesetzt wird (Kang et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der jüngsten Entwicklungen in der Chemotherapie und im Verständnis der Molekularbiologie die Fortschritte in der PDAC Therapie nicht zufriedenstellend sind.

---

### **1.3 Chemotherapieresistenz im PDAC**

Für die mangelnde Wirksamkeit der derzeitigen Behandlungen gegen das PDAC spielt die Entwicklung von Chemoresistenzen, eine entscheidende Rolle. Obwohl die Kombinationstherapien, FOLFIRINOX und Gemcitabin plus nab-Paclitaxel, im Vergleich zur Gemcitabin Monotherapie die Prognose des fortgeschrittenen Pankreaskrebs leicht verbessern, führt die Entwicklung einer Chemoresistenz noch immer zu schlechten klinischen Ergebnissen.

Die Chemoresistenz lässt sich in zwei Kategorien unterteilen. Die primäre (intrinsische) Resistenz, welche bereits zu Beginn der Behandlung aufgrund genetischer Faktoren besteht, wohingegen sich die sekundäre (erworbene) Resistenz unter anderem aufgrund epigenetischer und genetischer Veränderungen im Verlauf der Chemotherapie entwickelt (Z. Wang et al., 2011). Es beschreibt ein multifaktorielles Phänomen, das von verschiedenen Faktoren wie der Mikroumgebung, dem Metabolismus, der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren sowie der epithelial-zu-mesenchymalen Transition (EMT) und der micro-Ribonukleinsäure (RNA) reguliert wird (Zeng et al., 2019). Im Folgenden fokussieren wir uns auf den Prozess der epithelial-zu-mesenchymalen Transition (EMT) sowie den Glucose-Metabolismus im Tumor und deren Einfluss auf die Chemoresistenz im fortgeschrittenen PDAC.

---

---

## 1.4 PDAC-Subtypen

Die Fortschritte in der Überlebensrate von Patienten mit soliden Tumoren sind unter anderem auf effektive Modalitäten der Früherkennung und Identifizierung von Krebs-Subtypen zurückzuführen. Um in Zukunft beispielsweise eine Subtypen-spezifische Therapie anbieten zu können, spielt die Identifizierung von PDAC-Subtypen eine wichtige Rolle.

Daher wurden in den letzten Jahren, auf der Grundlage von Genexpressionsanalysen sowie metabolischen Analysen, mehrere Subtypen für PDAC definiert (Torres & Grippo, 2018). Die Grundlage für die Subtypisierung von PDAC stellten Collison und Kollegen, indem sie anhand von Genexpressionsanalysen und Untersuchungen der Transkriptionsfaktorenexpression drei Subtypen definierten: klassisch, quasi-mesenchymal und exokrin-ähnlich (Collisson et al., 2011). Auch Moffitt et al. hat eine PDAC-Subtypisierung mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt und dabei zwei PDAC-Subtypen sowie das Stroma charakterisiert (Moffitt et al., 2015). Der klassische Moffitt-Subtyp ähnelt dem klassischen Collison-Subtyp und ist durch eine hohe Expression epithelialer Gene gekennzeichnet. Der quasi-mesenchymale Subtyp und exokrin-ähnliche Subtyp wurde hingegen in einen basal-ähnlichen Subtyp mit erhöhter Expression von mesenchymalen Genen wie Vimentin, Laminin und Keratin unterteilt. Eine weitere Subtypisierung erfolgte durch Bailey und Kollegen, dieser beschrieb auf der Grundlage der anderen beiden Berichte vier PDAC-Subtypen: squamös (quasi-mesenchymal), aberrant differenziert endokrin exokrin (ADEX) (Exokrin-ähnlich), pankreatisch-progenitor (klassisch) und zusätzlich immunogen (Bailey et al., 2016). Die jüngste Subtypisierung durch Chang-Seng-Yue und Kollegen unterteilt die PDAC-Tumore in fünf unterschiedliche Subtypen: Basal-Like-A, Basal-Like-B, Hybrid, Classical-A und

Classical-B. Dabei wurden die zuvor durch Moffitt und Kollegen charakterisierten Classical (epithelial) und Basal-Like (mesenchymal) Subtypen, anhand von Genexpressionsanalysen in jeweils zwei Untergruppen gegliedert und der fünfte Subtyp aufgrund von inkonsistenten Expressionssignaturen, als Hybrider-Subtyp definiert. Die epithelialen Klassischen-A/-B-Subtypen waren häufiger im Frühstadium, der mesenchymal Basal-Like-B Subtyp und der gemischt Hybride-Subtyp bei resektabler Erkrankung und der chemoresistente, mesenchymale Basal-Like-A Subtyp vorwiegend im fortgeschrittenen Stadium zu identifizieren (Chan-Seng-Yue et al., 2020). Unter allen Subtypen zeigte der squamöse (mesenchymale)-Subtyp, mit 31% die höchste Inzidenzrate und gleichzeitig die schlechteste Prognose, mit einem durchschnittlichen Überleben von 13,3 Monaten. Zu den Subtypen, die mit einem besseren Outcome assoziiert sind, gehören die klassischen und exokrin-ähnlichen Gruppen (Torres & Grippo, 2018). Darüber hinaus konnte eine negative Korrelation zwischen der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und der des mesenchymalen Markers Vimentin, mit einer schlechteren Prognose bei Vimentin-positiven und E-Cadherin negativen Tumoren, festgestellt werden (Yamada et al., 2013).

Um in der Mikroumgebung des Tumors zu überleben und die energetischen Anforderungen zu erfüllen, zeigen PDAC Zellen, oft eine Onkogen-gesteuerte Reprogrammierung ihres Stoffwechsels (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou, & Thompson, 2008; J. T. Li, Wang, Yin, & Lei, 2019). Anhand der Expression von metabolischen Genen und dem unterschiedlichen Ansprechen auf metabolische Wirkstoffe wurden die PDAC-Zellen durch Daemen und Kollegen in einen glykolytischen und einen lipogenen Phänotyp unterteilt (Daemen et al., 2015). Eine weitere Klassifizierung erfolgte durch Karasinska und Kollegen, welche den stillen, glykolytischen, cholesterogenen und gemischten metabolischen Subtyp definieren

(Karasinska et al., 2020). Der glykolytische Subtyp kennzeichnet sich durch eine hohe Glykolyse-Aktivität, wohingegen der cholesterogene (lipogene) Subtyp eine verstärkte Expression von Genen, die an der Cholesterin- und de-novo Lipidsynthese beteiligt sind, aufweist. Im Vergleich zum cholesterogenen Phänotyp sind Tumorzellen mit einem glykolytischen Profil aggressiver und weniger empfindlich gegenüber Chemotherapie. Wodurch Tumore mit glykolytischem Profil, mit einem kürzeren medianen Überleben assoziiert sind. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die metabolischen Phänotypen mit den bekannten Subtypen von PDAC-Tumoren korrelieren, wobei der glykolytische Subtyp stark mit mesenchymalen Merkmalen und der cholesterogene (lipogene) Subtyp mit epithelialen Merkmalen assoziiert ist (Daemen et al., 2015; Karasinska et al., 2020).

---



---

## 1.5 Epithelial-zu-mesenchymale Transition (EMT)

EMT beschreibt einen dynamischen Prozess der phänotypischen Veränderung, indem die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und eine zunehmend mesenchymale Morphologie annehmen (Huber, Kraut, & Beug, 2005; Zavadil, Haley, Kalluri, Muthuswamy, & Thompson, 2008). Der epitheliale Phänotyp kennzeichnet sich durch stabile Zell-Zell-Kontakte mit der Fähigkeit zur Kolonisation, wohingegen der mesenchymale Phänotyp vermehrt bewegliche und Fibroblasten-ähnliche Eigenschaften aufweist. Der EMT-Prozess spielt eine entscheidende Rolle bei der Progression, Metastasierung und Chemoresistenz vom PDAC. EMT wird durch ein komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren, zellulären Signalwegen sowie Wachstumsfaktoren und der Mikroumgebung des Tumors reguliert (S. Wang, Huang, & Sun, 2017).

Dabei spielen bestimmte EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren (EMT-TF), als Mitglieder des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) eine entscheidende Rolle.

Während die EMT-TF Zinkfingerprotein Snail und Zinkfinger E-Box binding homebox 1 (Zeb1), die Expression epithelialer Marker z.B. E-Cadherin und Claudine verstärkt supprimieren, bewirken der Twist-Basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor 1 (Twist) und die Paired related homebox 1 (Prrx1) die vermehrte Induktion mesenchymaler Marker wie beispielsweise Vimentin und N-Cadherin (Arumugam et al., 2009; Peinado, Olmeda, & Cano, 2007; S. Wang et al., 2017; Wellner et al., 2009).

Es konnte eine starke negative Korrelation zwischen E-Cadherin und Zeb1 festgestellt werden, wobei die Deletion von Zeb1 zu einer Hochregulierung der epithelialen Marker *E-Cadherin*, *epithelial V-like antigen 1 (EVA1)* (Gene für adherente Junctionsformationen) und *T-cell differentiation protein 2 (MAL2)* (Gene für

Zellpolarität) und somit auch zur Wiederherstellung der Medikamentensensitivität führte (Arumugam et al., 2009). Darüber hinaus fördert die Inaktivierung von Zeb1 hingegen auch, die Bildung von Vorläuferläsionen, die Tumordifferenzierung, die Invasion sowie die Metastasierung im Pankreaskarzinom (Krebs et al., 2017; Wellner et al., 2009). Bei der Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen exprimierten primäre Brustkrebszellen gleichzeitig mesenchymale und epitheliale Marker, was die Bedeutung von EMT im Metastasierungsprozess widerspiegelt (Yu et al., 2013).

Die genetische Deletion der EMT-TF Snail und Twist bewirkt eine verstärkte Expression von E-Cadherin, mit gesteigerter Proliferation sowie die Suppression mesenchymaler Marker. Zusätzlich weisen die EMT-TF Twist und Snail1 antiapoptotische Eigenschaften auf (Q. Q. Li et al., 2009; Vega et al., 2004). Die Inaktivierung von Twist und Snail zeigte, im Gegensatz zur Deletion von Zeb1, keinen Einfluss auf die Tumordinvasion und Metastasierung im PDAC (Zheng et al., 2015).

Außerdem haben die EMT-regulierenden Faktoren einen Einfluss auf das Ansprechen der Tumorzellen gegenüber therapeutischen Wirkstoffen. Anhand von Genexpressionsanalysen mit 5-Fluoruracil oder Gemcitabin therapierten Zellen, konnte gezeigt werden, dass arzneimittelresistente Zellen im Vergleich zu sensiblen Zellen, viele Merkmale aufweisen, die mit EMT übereinstimmen (Arumugam et al., 2009; Zheng et al., 2015). Die Deletion der mesenchymalen Transkriptionsfaktoren Snail und Twist bewirkt eine Hochregulierung der Wirkstoff-spezifischen äquilibrativen Nucleosid-Transporter (ENT1) und concentrating nucleoside transporter (Cnt3) sowie der Wirkstoff-spezifischen Proteine im Tumor. Dadurch zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der modifizierten PDAC-Tumore gegenüber der Gemcitabin Therapie (Arumugam et al., 2009; Zheng et al., 2015). Shah et al. konnten nachweisen dass Gemcitabin resistente Zellen, starken morphologischen Veränderungen unterliegen. Dabei kennzeichnen sich die Gemcitabin resistenten Zellen, durch ihre spindelförmige Morphologie, mit

reduzierter Adhäsion sowie invasiven und beweglichen Eigenschaften. Betrachtet man die EMT-Marker Expression von Gemcitabin resistenten Zellen, konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Immunblotting eine erhöhte Vimentin Expression, bei gleichzeitig verminderter E-Cadherin Expression sowie eine erhöhte nukleäre Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin festgestellt werden. Hierbei wird deutlich, dass die bei Gemcitabin resistenten Zellen nachgewiesenen charakteristischen Veränderungen, viele Merkmale beinhalten, die mit dem EMT-Prozess übereinstimmen (Shah et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Porter et al., dass resezierte FOLFIRINOX therapierte Tumore zu 66% einen quasi-mesenchymalen und 34% einen epithelialen Phänotyp zeigten, wohingegen die PDAC Tumore einer unbehandelten Kohorte zu 38% quasi-mesenchymale und 62% epitheliale Eigenschaften aufwiesen. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Verschiebung der PDAC-Tumore in Richtung eines quasi-mesenchymalen Phänotyps unter FOLFIRINOX Therapie. Anhand von RNA-Sequenzierungsdaten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die überlebenden PDAC-Tumorbereiche nach FOLFIRINOX Therapie eine Hochregulierung mesenchymaler Gene exprimierten, was wiederum das intrinsische Chemoresistenzprofil von quasi-mesenchymalen Zellen hervorhebt (Porter et al., 2019).

Diese Erkenntnisse unterstreichen, den potentiellen Zusammenhang zwischen EMT-regulierenden Faktoren und der Chemotherapieresistenz von Pankreaskarzinomzellen, was mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit einhergeht.

---

## **1.6 Glucose Metabolismus im PDAC**

Im PDAC kommt es durch den Einfluss von unterschiedlichen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, der Mikroumgebung und der Expression von metabolischen Genen, zu einer Reprogrammierung des Metabolismus, wobei der Glucose Stoffwechselweg eine

zentrale Rolle einnimmt. Dabei dient die Zunahme der Glykolyse-Aktivität der gesteigerten Bereitstellung von Energie, in Form von ATP, sowie neuer Zellbausteine. Hierbei dienen die Aktivierung mehrerer, von der Glykolyse abzweigender, kritischer Stoffwechselwege, wie der Pentosephosphatweg und der Tricarbonsäurezyklus als entscheidende Syntheseprozesse. Daraus resultiert wiederum eine Förderung der Tumorentstehung und Tumorgenese (Tanner et al., 2018; Ying et al., 2012).

Die Glucoseaufnahme in die Pankreaskarzinomzellen erfolgt überwiegend über den membranständigen und passiven Glucose-Transporter (Glut1), wobei eine direkte Korrelation zwischen der Glut1-Expression und dem histologischen Grad sowie der Tumorprogression im PDAC festgestellt werden konnte (Basturk et al., 2011; McCall et al., 2013). Darüber hinaus führt die in 90% bestehende KRAS-Mutation, zu einer Hochregulierung des Glucose-Transporters (Glut1) und von ratenlimitierenden Enzymen der Glykolyse, einschließlich der Hexokinase II, der Phosphofruktokinase und der Laktatdehydrogenase (Ying et al., 2012). Pankreastumore weisen im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe eine gesteigerte F18-FDG-Aufnahme auf, was die erhöhte Glut1-Expression sowie den gesteigerten Glucose Metabolismus im PDAC unterstreicht (Higashi et al., 1997; Reske et al., 1997). Insbesondere der mesenchymale Subtyp zeigte eine deutlich gesteigerte Glucoseaufnahme, bei bekanntlich schnellerem und aggressiverem Wachstum, weshalb dieser mit dem glykolytischen Subtyp in Verbindung gebracht wird (Daemen et al., 2015).

Patienten mit niedriger Glut1-Expression im PDAC zeigten eine bessere Prognose sowie ein besseres therapeutisches Ansprechen, im Vergleich zu Primärtumoren mit erhöhter Glut1-Expression (Kurahara et al., 2018).

Die stark desmoplastische und hypoxische Mikroumgebung im PDAC, bewirkt eine Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren-Faktors (HIF1-alpha), als wichtigen transkriptionellen und metabolischen Regulator des Glucosestoffwechsels (Koong et al.,

2000; H. Zhang et al., 2008). HIF1-alpha führt zu einer Hochregulierung der glykolytischen Enzyme sowie der Glut1-Expression (Ivan et al., 2001; Semenza, 2010; Shukla et al., 2017; J. Z. Zhang, Behrooz, & Ismail-Beigi, 1999). Außerdem fördert HIF1-alpha die Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 sowie der Lactat-Dehydrogenase in PDAC-Zellen, was mit einer gesteigerten anaerobe Energiegewinnung über Lactat einhergeht (Papandreou, Cairns, Fontana, Lim, & Denko, 2006; Shukla et al., 2017).

Die metabolischen Veränderungen in PDAC Zellen, führen auch zur Beeinflussung der Wirksamkeit verschiedener Krebstherapien und spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Chemoresistenzen. Neben der glykolytisch gesteigerten Energiegewinnung und der damit verbundenen Förderung des Zellwachstums, konnten weitere Erkenntnisse anhand der Analyse von Gemcitabin resistenten Zellen, als Resistenzmechanismen identifiziert werden.

Shukla et al. zeigten, dass der gesteigerte Glucose-Stoffwechsel in PDAC-Zellen zu einem erhöhten Fluss von glykolytischen Zwischenprodukten, durch den nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatweges führt. Die gleichzeitig durch HIF1-alpha gesteigerte Modulation, der an der Pyrimidin-Synthese beteiligten Enzyme, Transketolase (TKT) und Cytidin Triphosphat Synthase (CTPS1), bewirken eine Steigerung der Pyrimidin-Biosynthese. Der daraus resultierende, erhöhte dCTP-Spiegel, führt wiederum durch molekulare Konkurrenz zu einer verminderten Wirksamkeit von Gemcitabin, dessen Sensitivität als Nukleosidanalogon durch die Nukleosidsynthese und -aufnahme reguliert wird (Shukla et al., 2017).

Dabei konnte die therapeutische Ansprechbarkeit, der Gemcitabin resistenten Zellen, durch zusätzlich gezielte Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase (Enzym der Pyrimidin-Synthese), in Kombination mit Gemcitabin, verbessert werden, was den Resistenzmechanismus der PDAC Zellen untermauert (Shukla et al., 2017).



## 2 Zielsetzung

Das unzureichende therapeutische Ansprechen des PDAC unter FFX Therapie verdeutlicht die dringende Notwendigkeit, die Resistenzmechanismen zu entschlüsseln, die zur Progression des PDAC unter Chemotherapie, beitragen. Das Ziel dieses Projektes ist es potentielle Chemotherapieresistenzmechanismen unter FFX Therapie im PDAC, sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* identifizieren zu können. Für die Gemcitabin Monotherapie wurde der EMT-Prozess sowie die Veränderungen im Glucose Metabolismus, als einer der molekularen Resistenzmechanismen bereits untersucht, wohingegen für FOLFIRINOX dementsprechende Studien fehlen (Shah et al., 2007). Daher haben wir epitheliale und mesenchymale Tumorzellen mit FOLFIRINOX behandelt und auf spezifische Mechanismen untersucht, um die Heterogenität und die Plastizität widerzuspiegeln, die Wirksamkeit der Behandlung zu rekapitulieren und die molekulare Basis der individuellen Reaktionen aufzuzeigen. Um das Fortschreiten des PDAC unter FOLFIRINOX Therapie zu untersuchen, haben wir zunächst von mehreren FFX therapierten Zelllinien, aus zwei unterschiedlichen Subtypen, deren Wachstumsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht. Mittels eines *in-vitro* 18F-FDG-Aufnahme-Assay und einer PET-Bildgebung *in-vivo* konnten wir den Glucose-Metabolismus, von therapierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle analysieren. Darüber hinaus nutzten wir zur histologischen Charakterisierung von Tumorzellen und PDAC Tumoren HE- und IHC-Färbungen sowie Immunfluoreszenzfärbungen, um die Expression von EMT-Markern sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* zu untersuchen. Neben vielen anderen Faktoren spielen der PDAC Subtyp, der EMT Prozess sowie der Glucose-Metabolismus eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung des therapeutischen Ansprechens des PDAC gegenüber Chemotherapie Kombinationen. Auf Grundlage dessen haben wir den Einfluss dieser Faktoren, als potentielle Resistenzmechanismen, auf die Wirkung der FOLFIRINOX Therapie im

PDAC untersucht. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse, dienen der Erweiterung des pathophysiologischen Verständnis, über die Resistenzmechanismen des PDAC gegenüber der FOLFIRINOX Therapie.

---



### 3 Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1: In dieser Studie verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus	Gerhard Menzel, Glasverarbeitungswerk GmbH & Co. KG, Deutschland
Combitips BioPur®	Eppendorf AG, Deutschland
CryoPure Gefäß	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Deckglas	Gerhard Menzel, Glasverarbeitungswerk GmbH & Co. KG, Deutschland
Einbettungskassetten	AMP Stensved, Dänemark
Einwegskalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Einwegsnadeln Omnican® 100	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einwegsnadel Sterican® 27 gauge	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Ethilon II	CLS Medizintechnik, Deutschland
Filterpipettenspitzen (sicher versiegelt)	Biozym Scientific GmbH, Deutschland (Hessisch, Oldenburg)
Gewebekulturplatten (6 Well und 94 Well)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Konische Zentrifugenröhrchen, 15 mL and 50 mL	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Mikroskopobjektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ölstift	Van der Ven and Meyer GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Para film®	Bemis Company Inc., USA
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Deutschland

Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Deutschland; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß 0.5 mL, 1.5 mL und 2.0 mL	Eppendorf AG, Deutschland
Reaktionsgefäße BioPur® (sicher verschießbar)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Trans-Well Zellkultureinsätze (6 well und 96 well Format, 0.45 µm Porengröße)	Corning Inc., USA
Wundklammern	MEDICON AG, Deutschland

### 3.2 Technische Geräte

**Tabelle 2: In dieser Studie verwendete technische Geräte**

<b>Technisches Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage A 1200 S	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage BP610	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Truttnauer Europe B.V., Breda, The Netherlands
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools GmbH, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher scientific, Inc. USA
Leica Bond Rxm System (IHC-Färbungen)	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica TCS SP8 (Laser-Scanning-Mikroskop)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mehr-Flaschen-Schüttler	Edmund Bühler GmbH; Deutschland
Mikroskop Optech	Optech Microscope Services Limited; Oxfordshire, UK
Mikroskop Axio Imager. A1	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland

Mikroskop Leica SP5	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Mikroskop Leica SP8 (Leica Led DMI)	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Mini Zentrifuge	Bio-Rad, California, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Deutschland
Multipipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Multiscan-FC Mikroplattenphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer, Brand®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Pipetten	Gilson Inc.; USA
Pipetboy Stripettor™	Corning Inc.; USA
Reagenzglasschüttler (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc. USA
StepOnePlus System	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf AG, Deutschland
Thermocycler FlexCycler <sup>2</sup>	Analytik Jena AG, Deutschland
Thermomixer kompakt	Eppendorf AG, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH; Deutschland
Zellkulturplastik	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland; TPP, Techno Plastic, Products AG, Schweiz; Sarstedt AG & Co., Deutschland; Corning Inc., USA; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Deutschland

### 3.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

**Tabelle 3: In dieser Studie verwendete Reagenzien, Chemikalien und Enzyme**

<b>Reagenzien, Chemikalien und Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
3-(4,5-deimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Corning® Matrigel® Wachstumsfaktor-reduzierte (GFR) Basalmembranmatrix, phenolrotfrei	Corning Inc., USA
D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dimethyl sulfoxid (DMSO, für MTT-Assay)	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit niedrigem Glucose und niedrigem Pyruvat Anteil	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, USA
Destilliertes Wasser (H2O)	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, Deutschland
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<sup>18</sup> F-Fluordesoxyglucose	Nuklearmedizin, MRI, Deutschland
Fetales Rinderserum, qualifiziert, E.U.-zugelassen, Ursprung Südamerika	Thermo Fisher Scientific, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Glycin (Pufferan (Zyklus R))	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe Deutschland
Histo-Clear™	Fisher Scientific GmbH
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific, USA
Protease Typ14	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Polymer-Refiner-Detektionskit (Pathologie)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Natriumhydroxidlösung (NaOH)	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Rinderserumalbumin, lyophilisiertes Pulver	Carl Roth GmbH& Co.KG, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Trypsin, 0,05 mit 0,53 mM EDTA 4Na	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### 3.4 Antikörper

**Tabelle 4: In dieser Studie verwendete primäre Antikörper**

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung/Fixierung
β-Catenin (goat)	Cell Signaling Technology, Inc. USA	1:100 ( <i>in-vivo</i> , <i>in-vitro</i> )/PFA-4%
E-Cadherin (goat)	Cell Signaling Technology, Inc. USA	1:200 ( <i>in-vivo</i> ), 1:100 ( <i>in-vitro</i> ) /PFA-4%
Caspase 3 (gespalten) (Klon 5A1E, rabbit, VB ER1/20min)	Cell Signaling Technology (9664L) Technology, Inc. USA	1:150 ( <i>in-vivo</i> ) /PFA-4%

Glut1 (Klon EPR3915, rabbit, VB ER1/30min)	Abcam (ab115730), Cambridge UK	1:750 ( <i>in-vivo</i> ) /PFA-4%
Ki67 (Klon SP6, rabbit, VB ER1/20min)	Abcam (ab16667), Cambridge, UK	1:50 ( <i>in-vivo</i> ) /PFA-4%
Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	1:250 ( <i>in-vitro</i> ) /PFA-4%
Vimentin (D21H3) XP <sup>®</sup> rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc. USA	1:100 ( <i>in-vivo, in-vitro</i> ) /PFA-4%
Y-H2AX (Klon 20E3, rabbit, VB ER2/40min)	Cell Signaling Technology (9718S), Inc. USA	1:500 ( <i>in-vivo</i> ) /PFA-4%
Zeb1 (rabbit)	Cell Signaling Technology, Inc. USA	1:100 ( <i>in-vivo, in-vitro</i> ) /PFA-4%
Zytokeratin 19 (CK19) (Ratte)	Abcam plc, Deutschland	1:200 ( <i>in-vivo, in-vitro</i> ) /PFA-4%

**Tabelle 5: In dieser Studie verwendete sekundäre Antikörper**

<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa Fluor <sup>™</sup> 647 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific Inc; USA	1:250 ( <i>in-vivo</i> ), 1:200 ( <i>in-vitro</i> )
Alexa Fluor <sup>™</sup> donkey anti-goat 488	Thermo Fisher Scientific Inc; USA	1:250 ( <i>in-vivo</i> ), 1:200 ( <i>in-vitro</i> )
Alexa Fluor <sup>™</sup> donkey anti-rabbit 594	Thermo Fisher Scientific Inc; USA	1:250 ( <i>in-vivo</i> ), 1:200 ( <i>in-vitro</i> )
Alexa Fluor <sup>™</sup> donkey anti-rabbit 680	Thermo Fisher Scientific Inc; USA	1:250 ( <i>in-vivo</i> ), 1:200 ( <i>in-vitro</i> )
Alexa Fluor <sup>™</sup> donkey anti-rat 594	Thermo Fisher Scientific Inc; USA	1:250 ( <i>in-vivo</i> ), 1:200 ( <i>in-vitro</i> )

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid)	Merck KGaA, Germany	1:1000 ( <i>in-vivo</i> , <i>in-vitro</i> )
--	---------------------	---

### 3.5 Medikamente

**Tabelle 6: In dieser Studie verwendete Medikamente**

Wirkstoff	Hersteller	Verdünnung/Konzentration
5-Fluoruracil (5-Fu)	Medac, Wedel, Deutschland	IC50, $c_{\max}$ : 37.6 $\mu\text{M}$
Irinotecan	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	IC50, $c_{\max}$ : 16.9 $\mu\text{M}$
Oxaliplatin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	IC50, $c_{\max}$ : 7.9 $\mu\text{M}$
FOLFIRINOX (FFX)	Krankenhausapotheke Klinikum rechts der Isar	Siehe Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe
Gemcitabin	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland	40mg/ml (gewichtsadaptiert)
Atipamezol	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	5mg/ml (gewichtsadaptiert)
Fentanyl	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	0,05 mg/ml (gewichtsadaptiert)
Flumazenil	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	0,1 mg/ml (gewichtsadaptiert)
Medetomidin	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	1 mg/ml (gewichtsadaptiert)
Midazolam	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	5mg/ml (gewichtsadaptiert)
Naloxon	Klinikum rechts der Isar, Apotheke	0,4 mg/ml (gewichtsadaptiert)

### 3.6 Zellkultur

**Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur**

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, phenol red-free	Corning Inc., USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D- MEM) mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium niedriger Glucose-Anteil, niedriger Pyruvat- Anteil	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), kein Calcium, kein Magnesium	Thermo Fisher Scientific, USA
MTT Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypsin, 0,05 mit 0,53 mM EDTA 4Na	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gefriermedium	70% DMEM 20% FCS 10% DMSO
Tumorzellmedium	D-MEM 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin



### 3.7 Histologie

**Tabelle 8: Reagenzien/Kits für die Histologie**

<b>Reagenzien/Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Alcianblau 8 GX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Antigen-Demaskierungslösung, auf Zitronensäurebasis	Vector Laboratories, Inc., USA
Avidin/Biotin Blockierungskit	Vector Laboratories, Inc., USA
Diaminobenzidin (DAB) Peroxidase-Substrat-Kit	Vector Laboratories, Inc., USA
Direct Red 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Eosin	Waldeck GmbH & Co KG, Deutschland
Essigsäure (eisig)	Merck KGaA, Deutschland
Epitop Retrieval Lösung 1 (mit Citratpuffer pH6) (IHC, Pathologie)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Epitop Retrieval Lösung 2 (mit EDTA-Puffer, pH9) (IHC, Pathologie)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KGaA, Germany
Hydrogen peroxidase 30%	Merck KGaA, Germany
Mixed Diaminobenzidin (DAB) verfeinert (IHC, Pathologie)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Peroxidas-Block (IHC, Pathologie)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Pertex Befestigungsmittel	Medite GmbH, Germany
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany
StartingBlock™ (PBS) Blockierungspuffer	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Roti Histofix 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany
Roti Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Germany
Toluidinblau O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany

Vectashield Einbettungsmedium	Vector Laboratories, Inc., USA
Vectastain Elite ABC kit	Vector Laboratories, Inc., USA

### 3.8 Software

**Tabelle 9: In dieser Studie verwendete Software-Programme**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adope Illustrator CS	Adobe System Software Ireland Limited, Dublin, Ireland
Adope Photoshop 7.0	Adobe System Software Ireland Limited, Dublin, Ireland
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
EndNote 20	Clarivate Analytics, London, UK
Fiji Version 1.0	LOCI, Madison, WI, USA
GraphPad Prism 7	La Holla, CA, USA
Image J	National Institute of Health, Bethesda, USA
ImageScope (Version 12.3.3)	Aperio Technologies, Inc. USA
Leica Application Suite V4.13	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica LAS X (Bearbeitung IF-images)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica X8 (Bearbeitung IF-images)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
Microsoft Power-Point	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA
Skantl Software 6.0.2 for Microplate Readers (für MTT)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Zur Durchführung der *in-vitro* und *in-vivo* Experimente wurden charakterisierte epitheliale und mesenchymale PDAC Zelllinien mit einer *Kras*<sup>G12D</sup> Mutation verwendet (Mueller et al., 2018).

Als Wachstumsmedium für die PDAC Zellen diente DMEM, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen, welche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-100% wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Monozellschicht mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2ml Trypsin-EDTA bei 37°C für ca. 5-10min inkubiert, sodass es zur Ablösung der angehefteten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche sowie zur Lösung der Zell-Zell-Verbindungen kommt. Um die Enzymreaktion zu unterbrechen, wurde ein entsprechendes Volumen an neuem Medium hinzugefügt und die Zellen zur Subkultivierung in neue Flaschen überführt.

Die eingefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen zügig aufgetaut und mit Nährmedium in einer neuen Zellkulturflasche kultiviert. Um das im Einfriermedium vorhandene DMSO zu entfernen, wurde das Medium am nächsten Tag gewechselt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen gewaschen und trypsiniert. Daraufhin wurden die Zellen für 5min bei 1000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in Gefriermedium resuspendiert und anschließend bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Um eine bestimmte Anzahl an Zellen für ein Experiment auszusäen, wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dazu wurde eine 10µl Zellsuspension in 10µl Trypanblau

verdünnt, um avitale Zellen zu identifizieren. Anschließend wurden 10µl der Mischung auf eine Zellzählkammer und die vitalen Zellen in vier Eckquadranten unter einem Mikroskop ausgezählt. Anhand des Verdünnungsfaktors und des Volumens der Eckquadrate konnte die Zellzahl pro ml errechnet werden.

Für die Chemotherapie Experimente wurden die Zellen in den drei folgenden Konditionen untersucht: unbehandelte Zellen (Kontrolle), Zellen nach 72h Behandlung mit FFX (post-FFX) und behandelte Zellen nach 72h wash-out-Phase (post-wash-out-FFX).

Dafür wurden die Zellen in eine 6 Well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit der Zelllinien-spezifischen IC<sub>50</sub>-Konzentration von FFX behandelt. Nach 72h Chemotherapie wurde zur Erholung das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 72h kultiviert. Die Zellen wurden zeitlich jeweils so ausgesät, dass alle Konditionen am gleichen Tag für das jeweilige Experiment verwendet werden konnten.

Die Phasenkontrastbilder der einzelnen Zelllinien wurden mithilfe des Phasenkontrastmikroskops Leica SP8 (Leica Led DMI) und der Bearbeitungssoftware Leica Application Suite V4.13 erstellt.

#### **4.1.2 MTT Assay**

Durch den 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) Assay konnten anhand von Messungen der metabolischen Aktivität die lebenden Zellen bestimmt werden.

Zum Vergleich des Proliferationsverhaltens der Zellen zwischen den 3 unterschiedlichen Chemotherapie Konditionen wurden die jeweiligen Wachstumskurven erstellt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/Well (in 100µl Medium) in einer 96-Well-Platte als Triplikate ausgesät und die MTT-Aktivität wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

gemessen. Für die MTT-Messung wurden 10µl MTT-Reagenz pro Well zugeben und für weitere 4h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen schüttelnd für 10-15min mit 200µl EtOH-DMSO, 1:1 verdünnt, behandelt. Danach wurde die Absorption mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen.

### **4.1.3 F18-FDG-Aufnahme Assay**

Zur Quantifizierung der Aufnahme von Glucose in die Tumorzellen wurde ein [18F] Fluordesoxyglucose (FDG) Aufnahme-Assay *in-vitro* durchgeführt. Dazu wurden für jede der drei Bedingungen eine bestimmte Zellzahl als Triplikate in 6-Well-Platten ausgesät. Zu Beginn wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen in glucosefreiem Nährmedium, das mit F18-FDG mit einer Radioaktivität von 0,130 MBq/mL ergänzt wurde, für 60min inkubiert. Um die FDG-Aktivität abzustoppen, wurden die Platten auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Tumorzellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einer 1 M NaOH-Lösung lysiert. NaOH bewirkt den Zellzerfall und damit die Freisetzung des von den Zellen aufgenommenen FDGs. Zum Schluss wurden die Zellen geerntet und die FDG-Aktivität in den einzelnen Überständen mittels Gamma-Zähler gemessen. Die F18-FDG-Aufnahme aller Tumorzellen pro Well wurde auf den FDG-Standard bezogen und auf 100.000 Zellen ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

## **4.2 Tierversuche**

### **4.2.1 Versuchstiere und Haltungsmethoden**

Für die Tierexperimente wurden athymische Nacktmäuse im Alter von 7 bis 9 Wochen mit *NU(NCr)-Foxn1nu*-Hintergrund (Charles River) und einem Gewicht von 20-30g eingesetzt. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreier Umgebung, in einem

akklimatisierten und geschlossenen Versuchstierstall. Um die Mäuse voneinander unterscheiden zu können, erhielt jede Maus eine Ohrmarkierung, mit der jeweiligen Mausnummer von 37-56.

#### **4.2.2 Orthotope Implantation**

Für die orthotope Implantation wurden athymische Nacktmäuse im Alter von 7 bis 9 Wochen mit *NU(NCr)-Foxn1nu*-Hintergrund (Charles River) verwendet. Nach der Gewichtsbestimmung, erfolgte die Anästhesie der Mäuse über eine intraperitoneale Injektion mit MMF (5 mg/kg Midazolam, 500 µg/kg Medetomidin, 50 µg/kg Fentanyl). Sobald die Tiere ausreichend sediert waren, wurde im linken Oberbauch ein ca. 1cm langer Schnitt gemacht und das Pankreas, durch leichtes Ziehen an der Milz freigelegt. Anschließend wurden 2500 Tumorzellen enthalten in 20µL PBS und Matrigel, 1:1 verdünnt, vorsichtig mithilfe einer Mikroliterspritze und einer 27-Gauge-Nadel in den Pankreaskopf injiziert. Eine erfolgreiche Implantation wurde durch das Auftreten einer transparenten Blase im Pankreas erkannt. Daraufhin wurden die Organe vorsichtig in die Bauchhöhle reponiert und das Peritoneum mittels Naht sowie die Bauchhaut mittels Klammern verschlossen. Nach der Operation erfolgte die Antagonisierung der MMF-Anästhesie durch die Gabe von AFN (750 µg/kg Atipamezol, 500 µg/kg Flumazenil, 1,2 mg/kg Naloxon) per intraperitonealer Injektion. Zur antiphlogistischen sowie analgetischen Wirkung wurden Metacam und Buprenorphin subkutan verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde den Mäusen während der Aufwachphase eine Wärmelampe hingestellt. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreier Umgebung, in einem akklimatisierten und geschlossenen Versuchstierstall. Um die Mäuse voneinander unterscheiden zu können, erhielt jede Maus eine Ohrmarkierung, mit der jeweiligen Mausnummer von 37-56. Die Mäuse wurden postoperativ täglich hinsichtlich des allgemeinen Gesundheitszustandes sowie des Körpergewichts überwacht. Bei

auffälligem Verhalten sowie schlechtem Allgemeinzustand, wurden die Versuchstiere erlöst.

### **4.2.3 Dissektion**

Im Rahmen des tierexperimentellen Studiendesigns wurde für die Erlösung der Versuchstiere ein früher Zeitpunkt T1 (Tumorgröße ca. 4mm<sup>3</sup>) und ein später Zeitpunkt T3 (ca. 2 Wochen später) festgelegt. Zu beiden Zeitpunkten wurden jeweils 6 Versuchstiere mit Isofluran und durch zervikale Dislokation erlöst.

Anschließend wurden die Mäuse fixiert, mit 70%igem Ethanol desinfiziert und das Abdomen geöffnet. Dabei wurde zunächst der Primärtumor des Pankreas sowie die Peritonealkarzinose entnommen. Anschließend wurden die Mäuse auf das Vorhandensein von Metastasen überprüft und dabei die Leber und Lunge sowie geschwollene Lymphknoten im Darmbereich entnommen. Die Tumorproben und notwendige Organe (Pankreas & Milz, Darm, Leber, Herz & Lunge) wurden für 48h in 4 % PFA für die nachfolgende histologische Analyse fixiert.

## **4.3 Bildgebung**

### **4.3.1 Magnetresonanztomographie**

Die Magnetresonanztomographie ist ein bildgebendes Verfahren, das unter anderem zur Darstellung von Tumoren eingesetzt wird. Die Mäuse wurden in Bauchlage in einem Mäusebett mit angeschlossenem Isofluran-Schlauch, Thermometer und Atmungspflaster abgebildet. Alle MRT-Experimente wurden am 7T-MRT (BioSpec) von Bruker (Billerica, MA) in der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar (München, Deutschland) unter Verwendung einer kleinen 1H/13C-Volumenempfängerspule (31mm ID) von RAPID Biomedical GmbH (Rimpar, Deutschland) durchgeführt.

Die anatomische axiale T2-gewichtete TSE (Turbo Spin Echo) wurde zur Tumordetektion und zur Messung des Tumolvolumens durchgeführt. Die Bildgebungsparameter der T2-gewichteten Scans waren Echozeit TE = 48ms, Wiederholungszeit TR = 4s, Auflösung in der Ebene IPR = 250x250µm, Schichtdicke = 1mm, Averages Av = 4.

### **4.3.2 Positronenemissionstomographie**

Die PET-Messungen wurden am Inveon PET-CT von Siemens (München, Deutschland) in der Abteilung für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar (München, Deutschland) durchgeführt. Die Bildgebung der Tiere wurde nach 2 Stunden Fasten durchgeführt. Der injizierte Tracer hatte eine Aktivität von 10-13 MBq. Die statische PET wurde bei Atemfrequenzen von 30-40/min und Temperaturen über 35° nach einer 60-minütigen Aufnahmezeit durchgeführt. Die Daten wurden mit dem 3D OSEM (ordered subset expectation maximization) Algorithmus rekonstruiert. Die PET-Daten wurden mit Inveon Research Workplace von Siemens Healthineers (Erlangen, Deutschland) analysiert. Die wichtigsten Ausleseparameter wurden wie folgt bestimmt:

$SUV_{mean} = (\text{Gewicht} \times \text{mittlere Aktivität in definierter ROI}) / \text{applizierte Dosis}$

$SUV_{max} = (\text{Gewicht} \times \text{Maximum der Aktivität in der definierten ROI}) / \text{applizierte Dosis}$

## **4.4 Histologische Analysen**

### **4.4.1 Formalin Fixierung und Paraffin-eingebettete Gewebsschnitte**

Für die Paraffinschnitte wurden die Gewebeproben in Einbettungskassetten verschlossen und bei Raumtemperatur über 48h in 4% PFA fixiert. Bis zur Entwässerung erfolgte die Aufbewahrung der Proben bei 4°C in PBS. Die Dehydrierung des Gewebes sowie die Einbettung der Organe in Paraffin wurde vom Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar (Dr. K. Steiger, MRI/TUM) durchgeführt.



Zur Dehydrierung durchliefen die Präparate über 24h mehrere Alkoholbäder und wurden anschließend in einer Einbettungsmaschine in 60°C heißem Paraffin eingelegt. Nach Runterkühlung der Paraffinblöcke auf -20°C, wurden Serien von 2,5 µm dünnen Schnitten, mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt. Zum Schluss wurden die entstandenen Gewebsschnitte auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert und einer histologischen und immunhistochemischen Analyse unterzogen.

#### **4.4.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung**

Die HE-Färbung wurde durch das Institut für Pathologie (Dr. K. Steiger, MRI/TUM) durchgeführt, dabei wurde das folgende Protokoll verwendet: Die mit Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitte werden 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkohol-Serie rehydriert (zweimal Isopropanol für 5min, zweimal 96 % für 2min und zweimal 70 % für 2min). Nach anschließender Spülung über 25sec in destilliertem Wasser wurden die Tumorschnitte für 8min mit Hämatoxylin gefärbt. Daraufhin erfolgt ein weiterer Waschvorgang für 10min mit fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 4min mit Eosin (alkoholisch 1%) für 15sec gefärbt, gefolgt von 3 Waschschritten mit ddH<sub>2</sub>O. Danach wurden die Objektträger mit einer ansteigenden Alkohol-Serie (zweimal 96 % für 30sec und zweimal Isopropanol für 25sec) dehydriert und 2 x 1,5min in Xylol inkubiert. Alle Schnitte wurden mit einem Hochdurchsatz-Scansystem gescannt und repräsentative Bilder mit ImageScope aufgenommen.

#### **4.4.3 Immunhistochemische Färbung**

Zur Erkennung von zellulären Proteinen wurden immunhistochemische Färbungen, mit einem Bond RXm System (Leica, Wetzlar, Deutschland, Reagenzien alle von Leica) durchgeführt. Es wurden vier verschiedene primäre Antikörper als spezifische Marker angefärbt: Ki67 (Clone SP6, rabbit, abcam ab16667, 1:50, VB ER1/20min) als

Proliferationsmarker, gespaltene Caspase 3 (Clone 5A1E, rabbit, Cell Signaling 9664L, 1:150, VB ER1/20min) für den Nachweis der Apoptose, Y-H2AX (Clone 20E3, rabbit, Cell Signaling 9718S, 1:500, VB ER2/40min) zur Darstellung von DNA-Strangbrüchen und Glut1 zur Identifizierung der zellulären Glucoseaufnahme. Die Objektträger wurden entparaffiniert und mit Epitope Retrieval Solution 1 (Citratpuffer pH6 oder EDTA-Puffer pH 9) vorbehandelt. Anschließend wurde für 5min ein Peroxidase Block auf die Tumorschnitte aufgetragen. Der primäre Antikörper wurde in Leica Bond Antibody Diluent, wie oben beschrieben verdünnt, und für 15 min auf die Tumorschnitte aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde je dreimal mit Bond Washsolution, die vorher 1:10 mit Aqua verdünnt wird, gewaschen und die Antikörperbindung mit einem Polymer-Refiner-Detektionskit ohne Post-Primärreagenz nachgewiesen. Für die Visualisierung der primären Antikörper wurden die Schnitte in ein Mixed DAB Refine, als dunkelbraunes Präzipitat für 10min inkubiert. Die Waschvorgänge wurden je dreimal zwischen den einzelnen Reagenzien mit Bond Washsolution, die vorher 1:10 mit Aqua verdünnt wurde, durchgeführt. Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet, siehe Kapitel 3.4.2. Die Objektträger wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkohol-Serie (70%, 96%, 100%; jeweils 1min) und mit Xylol dehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte mit Pertex Eindeckmedium abgedeckt. Alle Schnitte wurden mit einem Hochdurchsatz-Scansystem gescannt und repräsentative Bilder mit ImageScope aufgenommen.

#### **4.4.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine Methode, bei der Proteine durch Antikörper, an die ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, markiert und sichtbar gemacht werden.

Die Zellen einer epithelialen und einer mesenchymalen Zelllinie wurden in drei verschiedenen Konditionen gefärbt: unbehandelte Zellen (Kontrolle), Zellen nach 72h

Behandlung mit FFX (post-FFX) und behandelte Zellen nach 72h wash-out-Phase (post-wash-out-FFX).

Dabei wurden zur Kultivierung der Zellen 6-Well-Platten verwendet, bei denen unter sterilen Bedingungen vor Hinzugabe der Zellsuspension jeweils ein steriles Deckgläschen platziert wurde. Nachdem die Zellen für die Färbung zur Verfügung standen, erfolgte zunächst die Fixierung bei Raumtemperatur, in den 6-Well-Platten.

Zunächst wurden die Deckgläschen zwei Mal für je zwei Minuten mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen zur Fixierung mit einer 4%igen Paraformaldehyd (PFA) Lösung für 10 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Objektträger mit PBS in den 6-Well-Platten beschichtet und bei 4°C im Kühlschrank gehalten.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die Färbung intrazellulärer Proteine zu ermöglichen wurde mit einem 0,2%igen Triton-X-100-PBS Gemisch die Zellmembran permeabilisiert. Nach zwei Minuten Behandlungszeit folgten drei Waschvorgänge mit PBS. Anschließend erfolgte die Blockierung der Proteine durch eine Reagenzmischung aus PBS und 0,1%-igem BSA. Nach einem intensiven Waschvorgang wurden die primären Antikörper in einem Gemisch aus PBS und 0,1%-igem BSA verdünnt, auf den Gewebeschnitt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit des primären Antikörpers von 24 Stunden wurden die Antikörperreste durch drei Waschvorgänge mit PBS entfernt.

In den folgenden Arbeitsschritten wurde unter Lichtschutz gearbeitet. Anschließend wurden die Gewebsschnitte mit einem Reagenziengemisch aus PBS, 0,1% BSA und den darin verdünnten sekundären Antikörpern, für 3 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschvorgang folgte für 2 Minuten die Beschichtung der Zellen mit einem Gemisch aus DAPI (0,003%) und PBS. Daraufhin wurden die Deckgläschen erneut je zweimal mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Deckglässchen auf einen Objektträger übertragen und mit Mounting Media eingedeckelt. Zur Fixierung der Deckglässchen am Objektträger wurde Klarlack eingesetzt. Die Aufbewahrung der gefärbten Proben erfolgte in einer Dunkelkammerbox bei 4°C im Kühlschrank.

Die IF-Färbung der unbehandelten Tumorschnitte aus dem *in-vivo* Experiment entspricht im Wesentlichen den Arbeitsschritten der Färbung von Zellen *in-vitro*.

Zur Deparaffinisierung wurden die Gewebsschnitte zunächst in Histo-Clear, danach in mehrere Alkoholbäder (100% EOH, 96% EOH, 80% EOH) und abschließend in destilliertes Wasser gestellt. Für die Wiederaktivierung der zellulären Proteine wurden die Schnitte in eine Antigen-Demaskierungslösung, verdünnt in destilliertem Wasser, gestellt und in der Mikrowelle für ca. 20 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung, wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Wie bereits beschrieben, erfolgte nach mehrmaligem Waschen mit PBS, die Proteinblockierung sowie die Beschichtung mit dem primären und sekundären Antikörper.

Für die Auswertung und Dokumentation der Immunfluoreszenzfärbungen diente das Konfokalmikroskop, Leica TCS SP8, mithilfe der Leica X8-Software, vom Klinikum rechts der Isar. Für die Quantifizierungen der einzelnen Marker sowie weitere Analysen der Immunfluoreszenzbilder wurde das Programm Image J (Fiji.app) verwendet.

#### **4.4.5 Statistische Analyse**

Für die grafische Darstellung, die Datenkorrelation und die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism7 verwendet. Zur statistischen Analyse wurde der parametrische t-Test verwendet, wobei ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen wird.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Phänotypische Charakterisierung von Pankreastumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in-vivo*

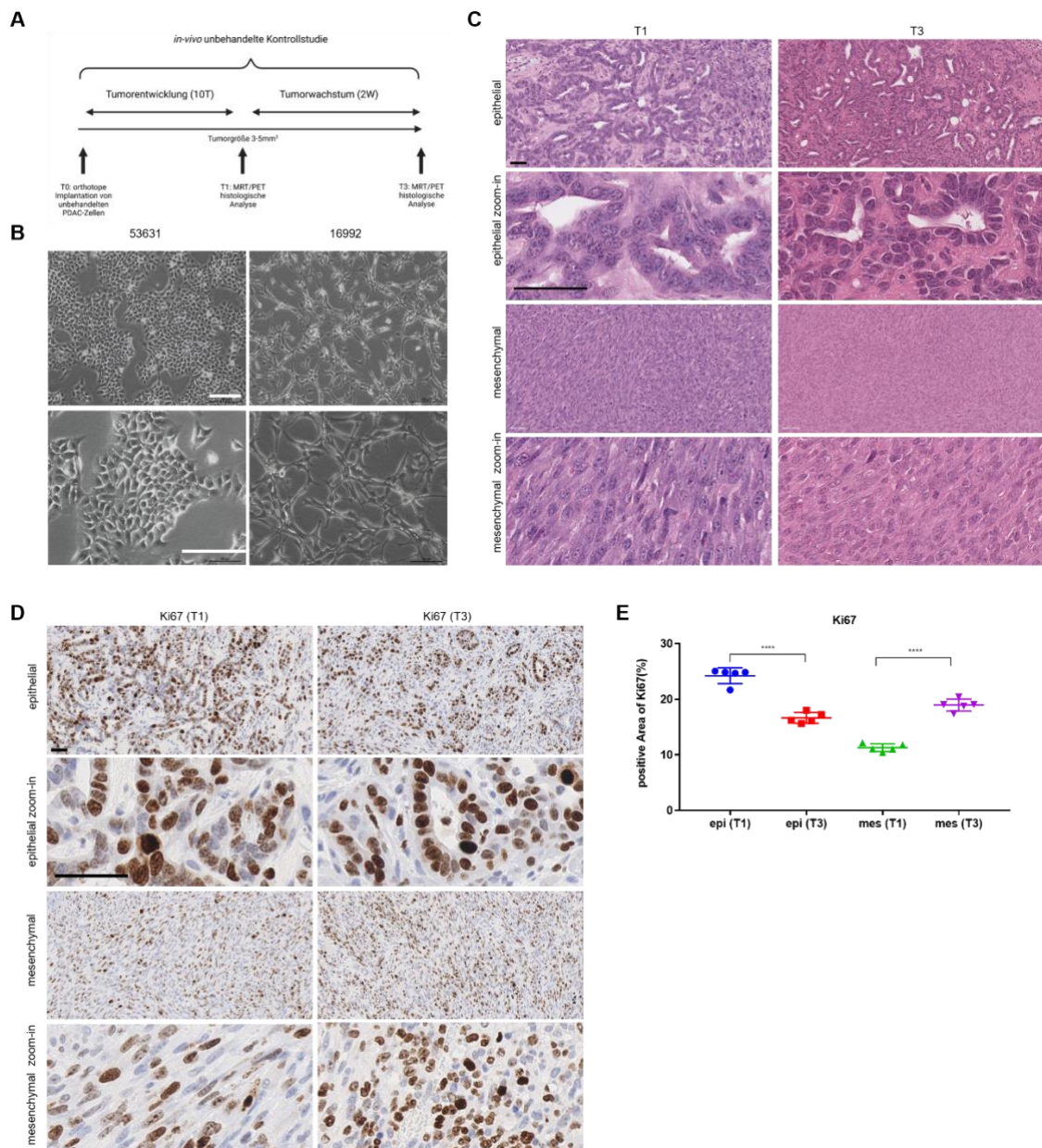
Als translationaler Ansatz wurden zunächst charakterisierte unbehandelte epitheliale und mesenchymale PDAC-Zellen (53631, 16992) (Mueller et al., 2018) orthotop in das Pankreas von Mäusen implantiert und zum Zeitpunkt T1 und T3, zunächst ohne erfolgte FFX Therapie, reseziert. Die Resektionszeitpunkte des Experiments hielten sich an das in Abbildung 1A dargestellte Schema, wobei die histologischen Ergebnisse der einzelnen Zeitpunkte später als longitudinale Kontrolle für ein Experiment mit zusätzlicher FFX Therapie dienten, um potenzielle Plastizitätsmechanismen unter Chemotherapie zu identifizieren. Des Weiteren diente das Experiment als Grundlage dafür, um herauszufinden wie sich die orthotopen Tumore aus diesen Zelllinien verhalten und charakterisieren lassen.

Um die histologische Tumormorphologie zu visualisieren, die PDAC-Subtypen zu charakterisieren und den Proliferationsstatus der subtypspezifischen Tumoren zu analysieren, verwendeten wir Hämatoxylin- (HE), Immunhistochemische- (IHC) und Immunfluoreszenzfärbungen (IF). Zur Darstellung der phänotypischen Merkmale, wurden Phasenkontrastbilder der orthotop implantierten Zelllinien erstellt, wobei die eng vernetzten, kolonieähnlichen epithelialen Zellverbände (53631) und die spindelzellartige Struktur der mesenchymalen Zellen (16992) deutlich zum Ausdruck kamen (Abbildung 1B).

In den HE-Färbungen der Tumorschnitte zeichnete sich der epitheliale Tumor, durch seine typischen duktaalen Strukturen, ausgekleidet durch dicht vernetztes prismatisches Epithel, aus (Abbildung 1C). Der mesenchymale Tumor kennzeichnete sich hingegen durch die Fibroblasten-ähnliche Struktur, mit seiner polygonalen Struktur sowie den strangförmigen Ausläufern (Abbildung 1C). Vergleicht man die histologische

Morphologie des unbehandelten Tumorgewebes zwischen dem frühen (T1, 11 Tage) und späten Zeitpunkt (T3, 24 Tage) zeigten sich bis auf die Größe des Tumors keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 1C).

Mittels IHC-Färbungen wurde der Proliferationsmarker Ki67 angefärbt (Abbildung 1D). Dabei zeigten die Tumorzellen nach einem Wachstum von 11 Tagen (T1) und nach 24 Tagen (T3), wie erwartet eine hohe Proliferationsrate, welche sich durch eine gesteigerte Expression des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigte. Vergleicht man die Expression von Ki67 zwischen epithelialen und mesenchymalen Tumoren, zeigten sich bei den epithelialen Pankreastumoren zum frühen Zeitpunkt mehr Ki67-positive Tumorzellen verglichen zum späten Zeitpunkt (T3). Bei den mesenchymalen Tumoren wurde hingegen deutlich, dass die Ki67-Expression zum späteren Zeitpunkt (T3), die Expressionsaktivität des frühen Zeitpunktes (T1) übertraf (Abbildung 1D und 1E).



**Abbildung 1: Histologische Analysen des unbehandelten Pankreastumorgewebes zum frühen Zeitpunkt T1 und späten Zeitpunkt T3**

A: Schematische Darstellung des *in-vivo* Experiments mit orthotop implantierten subtypspezifischen PDAC Zellen

B: Phasenkontrastbilder der implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) PDAC Zelllinien, Maßstabbalken markieren 200µm

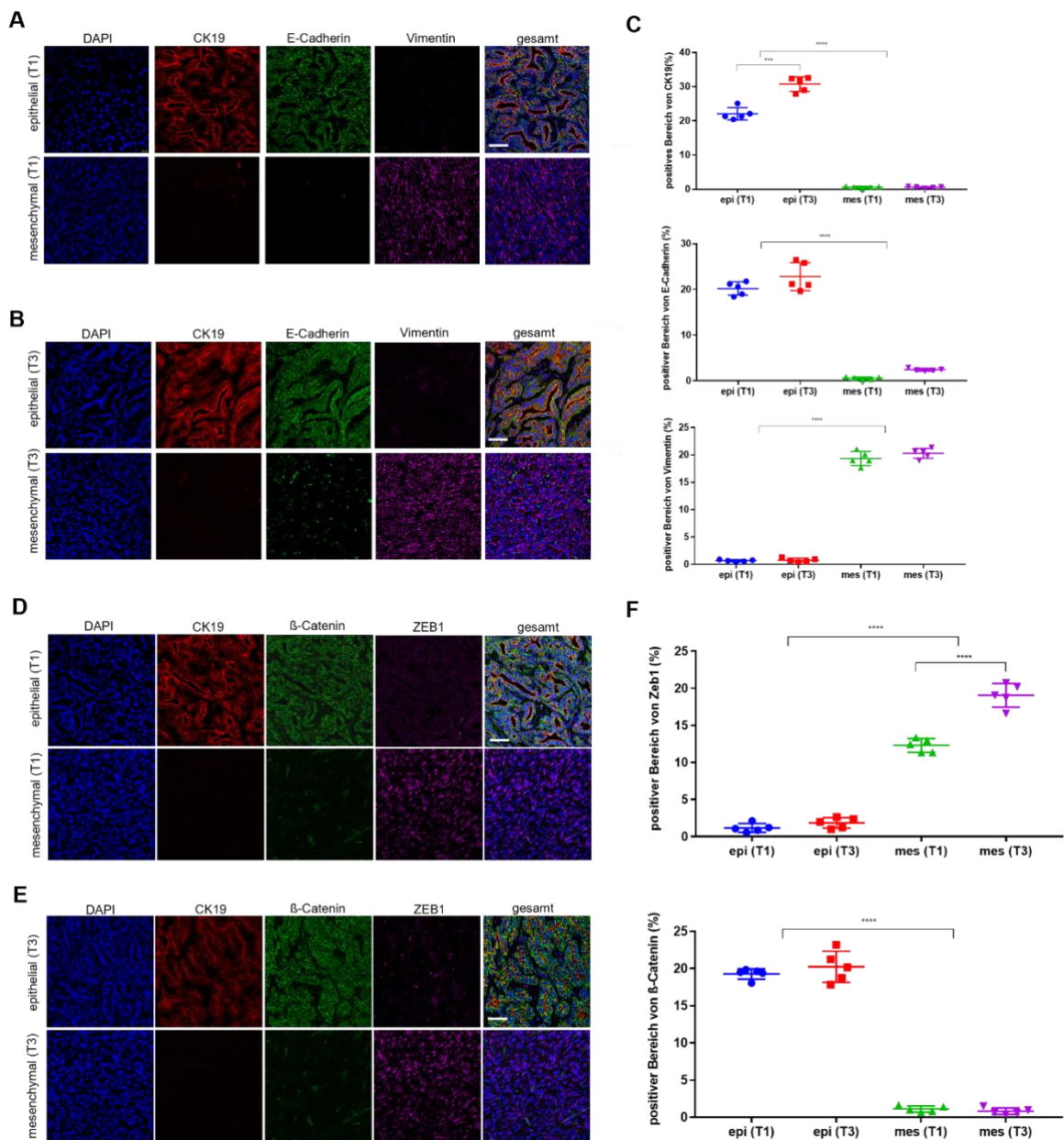
C: HE-Färbungen von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien, Maßstabbalken markieren 50µm

D: Immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 in orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren, Maßstabbalken markieren 50µm

E: Quantifizierung der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren zum Zeitpunkt T1 und T3 anhand von IHC-Färbungen, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (\*\*\*\*= signifikant (P<0,0001))

Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnten die charakteristischen morphologischen Merkmale epithelialer und mesenchymaler *in-vivo* Tumoren sowie deren spezifische EMT-Marker dargestellt werden (Abbildung 2A, B, C, D). Trotz der geringen Expressionsunterschiede der EMT-Marker eines Phänotyps wurde das stark differenzierte Verteilungsmuster, der implantierten epithelialen und mesenchymalen Zellen deutlich. Während epitheliale Tumore eine hohe Expression von E-Cadherin und die charakteristischen duktaalen Strukturen, verdeutlicht durch eine hohe Expression des duktaalen Markers Cytokeratin 19 (CK19), aufwiesen, zeigten die mesenchymalen Tumore eine hohe Vimentin Expression, bei gleichzeitig sehr geringer E-Cadherin Expression (Abbildung 2A und B). Die dazugehörige Quantifizierung in Abbildung 2C unterstrich, das signifikant unterschiedliche subtypspezifische Expressionsverhalten der epithelialen Marker E-Cadherin und Cytokeratin 19 sowie des mesenchymalen Markers Vimentin. Vergleicht man die Expression von E-Cadherin in den mesenchymalen Tumoren im zeitlichen Verlauf, zeigte sich eine unverändert geringe Expression, ähnlich wie die Vimentin Expression beim epithelialen Phänotyp (Abbildung 2A, B, C). In Abbildung 2D wird die membranöse Expression des Proto-Onkoproteins,  $\beta$ -Catenin, in epithelialen Zellen deutlich, wohingegen Zeb1, mit Ausnahme einzelner Fibroblasten, nicht exprimiert wurde (Abbildungen 2D, E, F). Bei den mesenchymalen Zellen zeigte sich das Gegenteil, wobei der intranukleäre Transkriptionsfaktor Zeb1 eine hohe Aktivität zeigte und  $\beta$ -Catenin kaum exprimiert wurde (Abbildungen 2D, E, F). Dieser subtypspezifische, signifikante Unterschied des Expressionsverhalten der Marker  $\beta$ -Catenin und Zeb1 zeigte sich ebenfalls in der Quantifizierung. Die Expressionsaktivität von  $\beta$ -Catenin zeigte innerhalb der Subtypen über die Wachstumszeit (T1  $\rightarrow$  T3) keinen wesentlichen Unterschied, wohingegen sich bei den mesenchymalen Tumoren, mit zunehmendem Wachstum ein Anstieg der Zeb1 Expression zeigte (Abbildung 2F).





**Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbungen von orthotop implantierten Pankreastumoren**

A: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien (Zeitpunkt T1), angefärbt sind DAPI, Cytokeratin 19 (CK19), E-Cadherin und Vimentin, Maßstabsbalken markieren 40µm

B: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien (Zeitpunkt T3), angefärbt sind DAPI, Cytokeratin 19 (CK19), E-Cadherin und Vimentin, Maßstabsbalken markieren 40µm

C: Quantifizierung der CK19-, E-Cadherin-, Vimentin Expression *in-vivo* von orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren zum Zeitpunkt T1 und T3 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (\*\*\*= signifikant (P<0,0005), \*\*\*\*= signifikant (P <0,0001))

D: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien (Zeitpunkt T1), angefärbt sind DAPI, Cytokeratin 19 (CK19), β-Catenin und Zeb1, Maßstabsbalken markieren 40µm

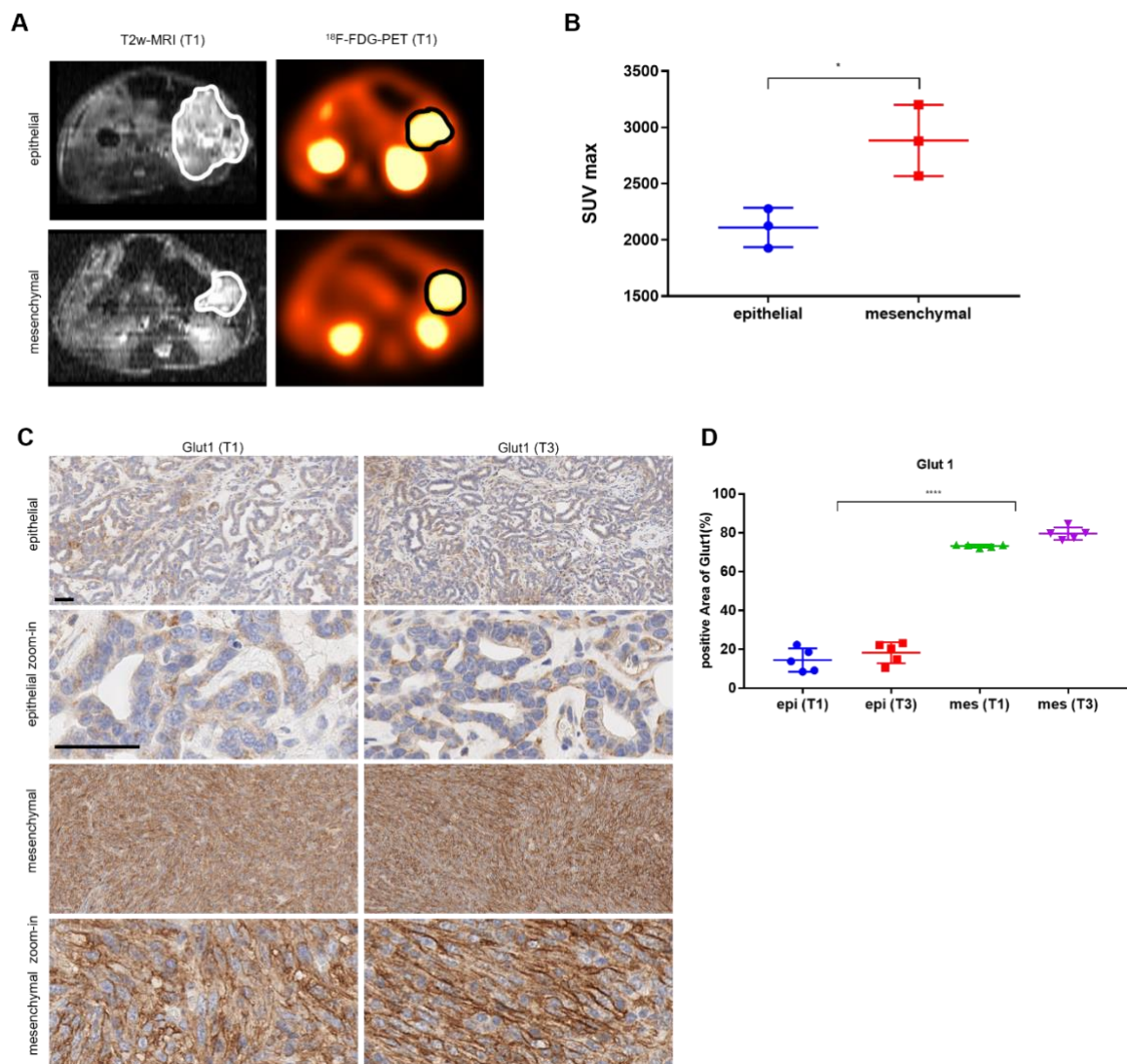
E: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien (Zeitpunkt T3), angefärbt sind DAPI, Cytokeratin 19 (CK19), β-Catenin und Zeb1, Maßstabsbalken markieren 40µm

F: Quantifizierung der β-Catenin- und Zeb1 Expression *in-vivo* von orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren zum Zeitpunkt T1 und T3 anhand von Immunfluoreszenzfärbungen, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (\*\*\*= signifikant (P<0,0005)).

## **5.2 Bestimmung der Wachstumsdynamik und Darstellung der glykolytischen Aktivität von Pankreastumoren *in-vivo***

Zur Beurteilung der Wachstumsdynamik und Größe der PDAC Tumore *in-vivo*, erfolgte von den orthotop implantierten Mäusen eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Ab einer Größe von 3-5mm<sup>3</sup> wurde auf Grundlage der MRT Bilder eine <sup>18</sup>F-FDG-Positronenemissionstomographie (<sup>18</sup>F-FDG-PET) zur Quantifizierung der glykolytischen Aktivität des Tumors durchgeführt. Der Tumor zeigte sich durch ein deutlich erhöhtes PET Signal im Bereich der linken Flanke der Maus (Abbildung umkreist 3A), wobei zusätzlich beide Nieren physiologisch eine gesteigerte <sup>18</sup>F-FDG-Anreicherung aufwiesen.

In Abbildung 3B wurde die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme, über den maximalen Standard uptake value (SUV max), der epithelialen und mesenchymalen Tumore zum frühen Zeitpunkt (T1) gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere subtypenspezifische <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme in mesenchymalen Tumoren im Vergleich zu den epithelialen Tumoren. Dies bestätigte sich in der immunhistochemischen Färbung der Glut1-Expression in beiden Tumorsubtypen, wobei eine deutlich höhere Expression des Glucosetransporters in den mesenchymalen Tumoren, im Vergleich zu den epithelialen Tumoren zu sehen war. Vergleicht man die Glut1-Expression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. Wachstumsphasen innerhalb des Phänotyps, zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expressionsaktivität (Abbildung 3C und 3D).



**Abbildung 3: Bestimmung der Aktivität des Glucose Metabolismus im PDAC mittels MRT/PET und Glut1-Expression**

A: Repräsentative axiale Bilder der Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) von Mäusen mit epithelial oder mesenchymal implantierten PDAC Zellen zum Zeitpunkt T1. Die Kreise kennzeichnen die Tumorregion.

B: <sup>18</sup>F-FDG -Aufnahme im PDAC *in-vivo*: mesenchymal vs. epithelial (maximaler Standard uptake value (SUV max)), drei biologische und unabhängige Replikate, ungepaarter t-Test (\*= signifikant (P<0,05))

C: Immunhistochemische Färbung des Glucosetransporters Glut1 in orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren, Maßstabbalken markieren 50µm

D: Quantifizierung der Expression des Glucosetransporters Glut 1 in orthotop implantierten epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Pankreastumoren zum Zeitpunkt T1 und T3 anhand von IHC-Färbungen, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (\*\*\*\*= signifikant (P<0,0001))

### 5.3 Wachstumsanalyse von subtypspezifischen PDAC Zellen nach

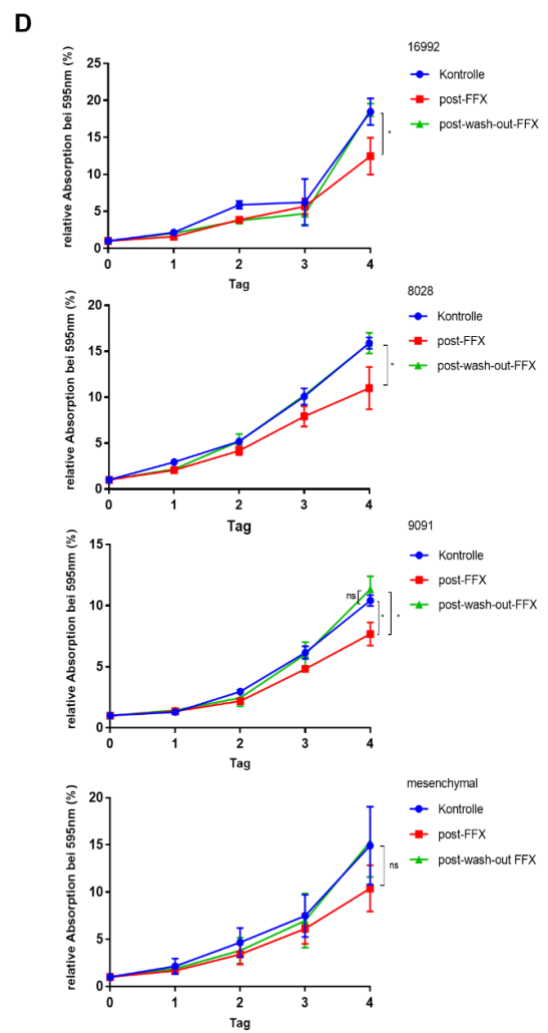
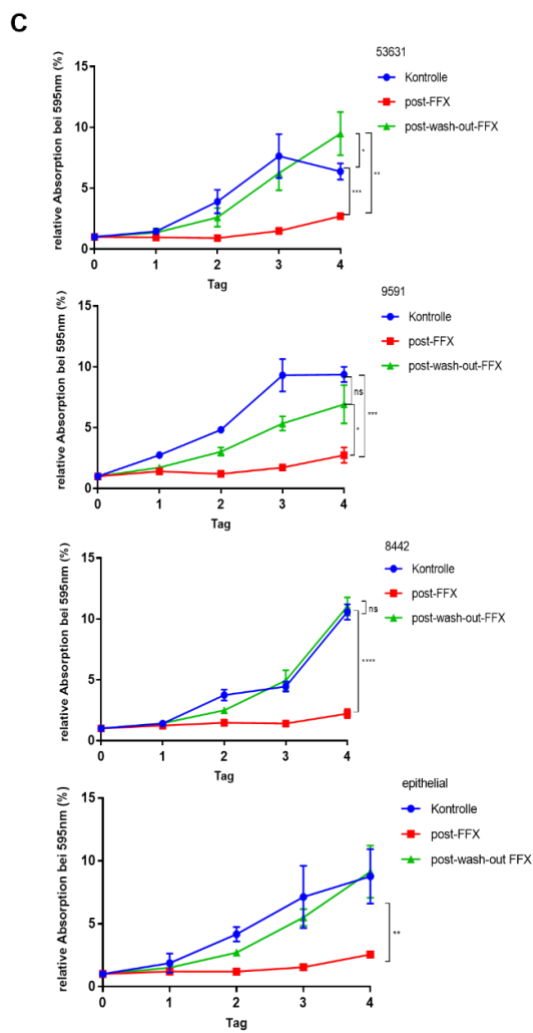
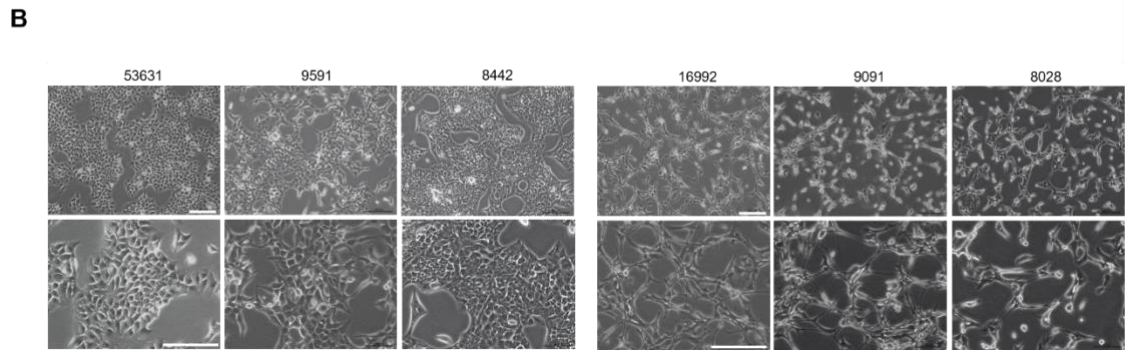
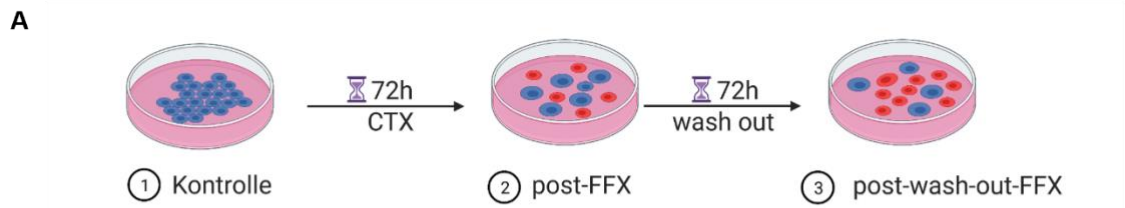
#### FOLFIRINOX Therapie *in-vitro*

Mithilfe des MTT-Assays konnte anhand von Messungen der metabolischen Aktivität der epithelialen (53631, 9591, 8442) und mesenchymalen (16992, 9091, 8028) Zelllinien, das Wachstumsverhalten der beiden Subtypen in jeweils drei unterschiedlichen Konditionen

*in-vitro* quantifiziert werden. Für die Chemotherapie Experimente wurden die Zellen in den drei folgenden Konditionen untersucht: unbehandelte Zellen (Kontrolle), Zellen nach 72h Behandlung mit FOLFIRINOX (post-FFX) und behandelte Zellen nach 72h wash-out-Phase (post-wash-out-FFX) (Abbildung 4A). Für die *in-vitro* FFX Therapie wurden die Zellen mit der Chemotherapiekombination, bestehend aus 5-Fluoruracil ( $c_{max} = 50 \mu\text{M}$ ), Irinotecan ( $c_{max} = 22,5 \mu\text{M}$ ) und Oxaliplatin ( $c_{max} = 10,6 \mu\text{M}$ ) entsprechend der Dosierung und dem Verhältnis in der klinischen Praxis, in dreifacher Verdünnung für 72 Stunden behandelt (Abbildung 4A). Zur Darstellung der subtypspezifischen Merkmale wurden Phasenkontrastmikroskopbilder der epithelialen (53631, 9591, 8442) und der mesenchymalen (16992, 9091, 8028) Zelllinien erstellt (Abbildung 4B).

Dabei wurde das Wachstumsverhalten von FFX behandelten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den unbehandelten Zellen verglichen. Beim Vergleich des Wachstums aller drei Konditionen, zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen, zeigte sich trotz der Aussaat der gleichen Anzahl an Zellen zum Tag 0, ein deutlich schnelleres, aggressiveres und exponentielles Proliferationsverhalten der mesenchymalen Zellen. Darüber hinaus konnte nach 72h FFX Behandlung ein deutlicher Rückgang der Proliferation der Zellen beider Subtypen festgestellt werden. Wohingegen sich das Wachstumsverhalten der therapierten Zellen nach einer zusätzlichen wash-out Phase von 72h zunehmend dem Verhalten der unbehandelten Zellen annähert und somit für eine schnelle Wiederaufnahme der Proliferation spricht. Vergleicht man den Effekt der FFX Therapie zwischen den beiden Subtypen, zeigte sich bei dem epithelialen Phänotyp im Vergleich zu dem mesenchymalen Phänotyp bezüglich des Wachstumsverhaltens ein deutlicherer Unterschied zwischen den post-FFX Zellen und den unbehandelten Zellen (Abbildung 4C). Betrachtet man die einzelnen mesenchymalen Zelllinien (16992, 8028, 9091) ließ sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Zellanzahl zwischen der Kontrolle und den post-FFX-Zellen feststellen, wohingegen die drei mesenchymalen

Zelllinien zusammengenommen im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien keine Signifikanz aufwiesen (Abbildung 4C und 4D).



**Abbildung 4: Wachstumsanalyse von epithelialen und mesenchymalen PDAC Zellen *in-vitro* (MTT-assay)**

A: Schematische Darstellung des Aufbaus der *in-vitro* Experimente mit FFX Therapie

B: Phasenkontrastbilder der murinen, epithelialen (53631, 9591, 8442) und mesenchymalen (16992, 9091, 8028) PDAC-Zelllinien, Maßstabbalken markieren 200µm

C: *in-vitro* Wachstumsanalyse der einzelnen epithelialen Zelllinien (53631, 9591, 8442) und Gesamtbild aller drei Zelllinien, unter drei unterschiedlichen Konditionen: Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX, mit jeweils drei technischen Replikaten (n=3), ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*= signifikant (P<0,05), \*\*= signifikant (P<0,005), \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

D: *in-vitro* Wachstumsanalyse der einzelnen mesenchymalen Zelllinien (16992, 8028, 9091) und Gesamtbild aller drei Zelllinien, unter drei unterschiedlichen Konditionen: Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX, mit jeweils drei technischen Replikaten, n=3, ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*= signifikant (P<0,05), \*\*= signifikant (P<0,005), \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

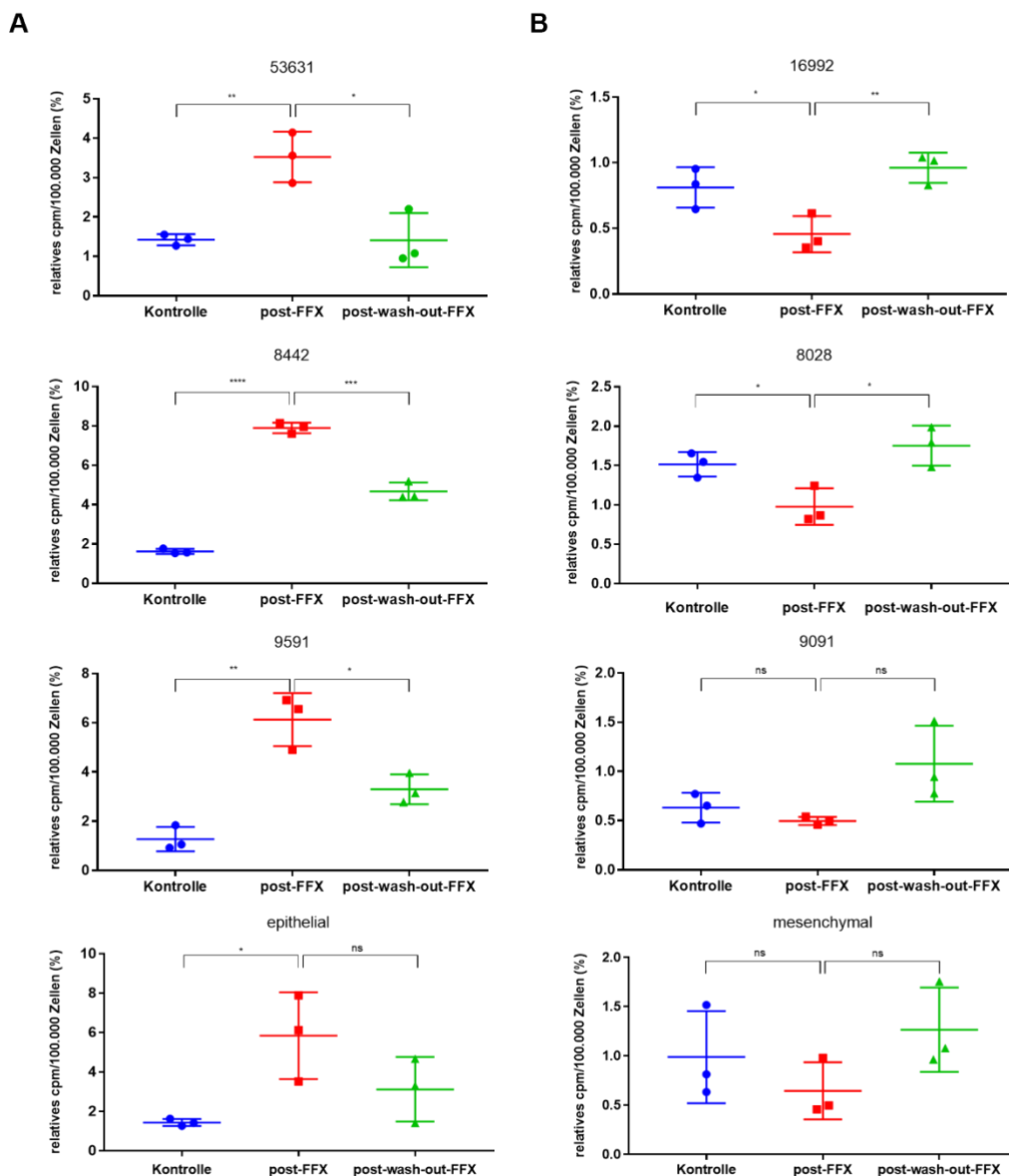
## 5.4 Dynamische Bestimmung der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme nach FOLFIRINOX

### Therapie *in-vitro*

Zur Quantifizierung der Aufnahme von Glucose in die Tumorzellen wurde ein [<sup>18</sup>F] Fluordesoxyglucose (FDG) Aufnahme-Assay *in-vitro* durchgeführt und mittels Gamma-Zähler ausgewertet. Dabei wurde die <sup>18</sup>F-FDG-Aktivität in den drei unterschiedlichen Konditionen (Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX) gemessen. In der Gesamtheit betrachtet zeigten die epithelialen Zellen (53631, 9591, 8442) *in-vitro* eine höhere <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme im Vergleich zu den mesenchymalen Zellen (16992, 8028, 9091). Bei beiden Subtypen zeigte sich eine Veränderung des Glucosestoffwechsels nach erfolgter Chemotherapie. Der epitheliale Zelltyp zeigte nach 72h FFX Therapie eine signifikant höhere Glucoseaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Bei den mesenchymalen Zellen zeigte sich, bei zwei Zelllinien (16992, 8028) eine signifikante Verminderung der Glucoseaufnahme nach FFX Therapie, wohingegen in Betrachtung der Gesamtheit der mesenchymalen Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen festzustellen war. Darüber hinaus zeigte sich bei beiden Subtypen, nach erfolgter FFX Therapie und zusätzlich 72h wash-out Phase, wie bereits bei der Wachstumsanalyse festgestellt, eine rasche Regeneration der Zellen, hin zu der FDG-Aufnahme der Kontrolle. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass unter dem Einfluss der FFX Therapie die epithelialen Zellen im Hinblick auf die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme größeren Unterschieden zwischen den unbehandelten und den post-FFX



Zellen aufwiesen, wohingegen die mesenchymalen Zellen geringeren Veränderungen unterlagen (Abbildung 5A und 5B). Vergleicht man den Glucosemetabolismus der beiden Subtypen, konnte somit bei den epithelialen Zellen eine deutlichere Dynamik der Plastizität unter dem Druck der Chemotherapie festgestellt werden (Abbildung 5A und 5B).



**Abbildung 5:  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme nach FOLFIRINOX (FFX) Therapie *in-vitro* mittels Gamma-Zähler**

A: *in-vitro*  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme-Assay von einzelnen epithelialen Zelllinien (53631, 8442, 9591) und Gesamtbild aller drei Zelllinien, unter drei unterschiedlichen Konditionen: Kontrolle (unbehandelte Zellen), post-FFX (nach 72 FFX Therapie), post-wash-out-FFX (therapierte Zellen nach 72h wash-out-Phase, mit jeweils drei technischen Replikaten (n=3), ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*= signifikant (P<0,05), \*\*= signifikant (P<0,005), \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

B: *in-vitro*  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme-Assay von einzelnen mesenchymalen Zelllinien (16992, 8028, 9091) und Gesamtbild aller drei Zelllinien unter drei unterschiedlichen Konditionen: Kontrolle (unbehandelte Zellen), post-FFX (nach 72 FFX Therapie), post-wash-out-FFX (therapierte Zellen nach 72h wash-out-Phase, mit jeweils drei technischen Replikaten (n=3), ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*= signifikant (P<0,05), \*\*= signifikant (P<0,005), \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

## **5.5 Charakterisierung der subtypspezifischen Tumorzeldifferenzierung und zellulären Plastizität nach FFX Therapie *in-vitro***

Zur Darstellung der subtypspezifischen Merkmale und EMT-Marker wurden die Zellen einer epithelialen (53631) und einer mesenchymalen (16992) Zelllinie in den drei verschiedenen Konditionen (Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX) mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

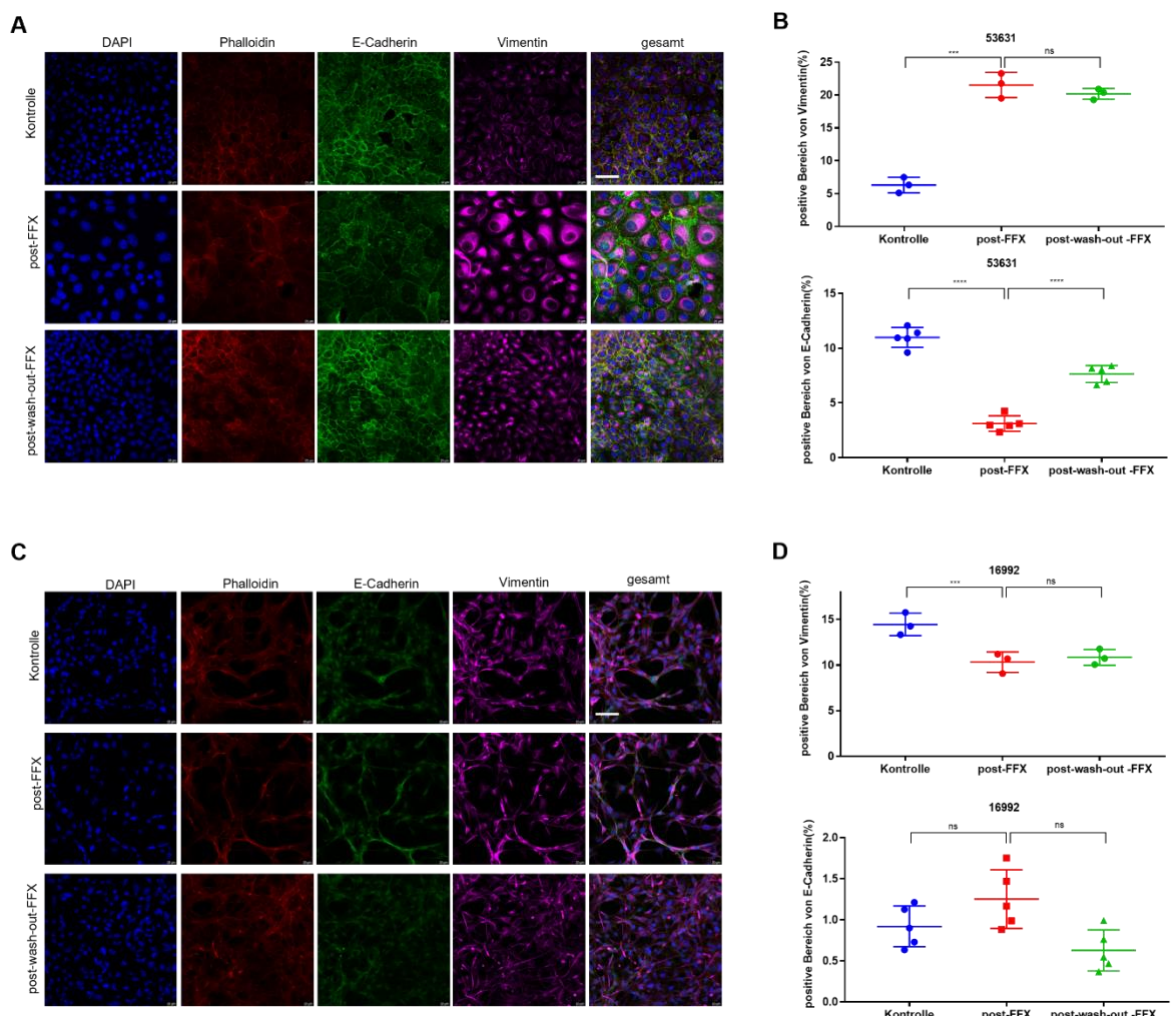
Bei den Zellen der Kontrolle zeigten sich, wie auch in den Ergebnissen der *in-vivo* Experimente, die charakteristischen Merkmale der epithelialen Zellen, welche sich mit ihren runden Zellkernen in einem dicht vernetzten Zellverband anordneten (Abbildung 6A). Wohingegen die mesenchymalen Zellen sich in Fibroblasten-ähnlichen Kolonien anordneten und ein sarkomatoides Wachstum aufwiesen (Abbildung 6B).

Bei der Kontrolle der epithelialen Zellen zeigte sich eine lokalisierte und membranöse Expression des transmembranösen Glykoproteins, E-Cadherin, wohingegen die Expression von Vimentin weniger stark zum Ausdruck kam. Nach 72h Behandlung unter FOLFIRINOX (post-FFX) zeigten die epithelialen Zellen morphologisch eine deutliche Größenzunahme sowie eine zunehmend diffuse Verteilung von E-Cadherin, als Ausdruck einer E-Cadherin Internalisation, zum Abbau im Proteasom. Bei Betrachtung der IF-Bilder und der Quantifizierungsanalyse wurde deutlich, dass die Expression von Vimentin, als mesenchymaler Marker, bei den post-FFX therapierten epithelialen Zellen deutlich ansteigt und die post-wash-out-Zellen deren Expressionsverhalten zunächst aufrechterhalten (Abbildung 6C). Nach einer wash-out Phase von 72h, glich sich bei den epithelialen Zellen, die Zellmorphologie und die Expression von E-Cadherin, langsam dem Verteilungs- und Expressionsmuster der Kontrollzellen an (Abbildung 6A und 6C). Bei den mesenchymalen Zellen ließ sich im Vergleich zu den epithelialen Zellen hingegen ein weniger starker Effekt auf die Zellmorphologie sowie die Expression der EMT-Marker durch die FFX Therapie feststellen. Bei der Kontrolle zeigte sich, wie



erwartet eine deutliche Expression von Vimentin, wohingegen E-Cadherin eine deutlich weniger starke Intensität aufwies (Abbildung 6B).

Die FFX therapierten mesenchymalen Zellen (post-FFX und post-wash-out-FFX) wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine abnehmende Vimentin Intensität auf, wohingegen das Expressionsmuster von E-Cadherin keiner signifikanten Dynamik unterlag (Abbildung 6B und 6C). Anhand der höheren Zellzahl und diffusen Zellverteilung wurde die schnelle Regeneration insbesondere der mesenchymalen Zellen nach durchlaufender wash-out Phase deutlich.



**Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbungen von epithelialen und mesenchymalen Zelllinien und deren EMT-Marker Expression *in-vitro***

A: Immunfluoreszenzfärbung einer epithelialen Zelllinie (53631) unter drei Konditionen: Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX. Anfärbung von DAPI, Phalloidin, E-Cadherin und Vimentin. Maßstabskala markiert 40µm

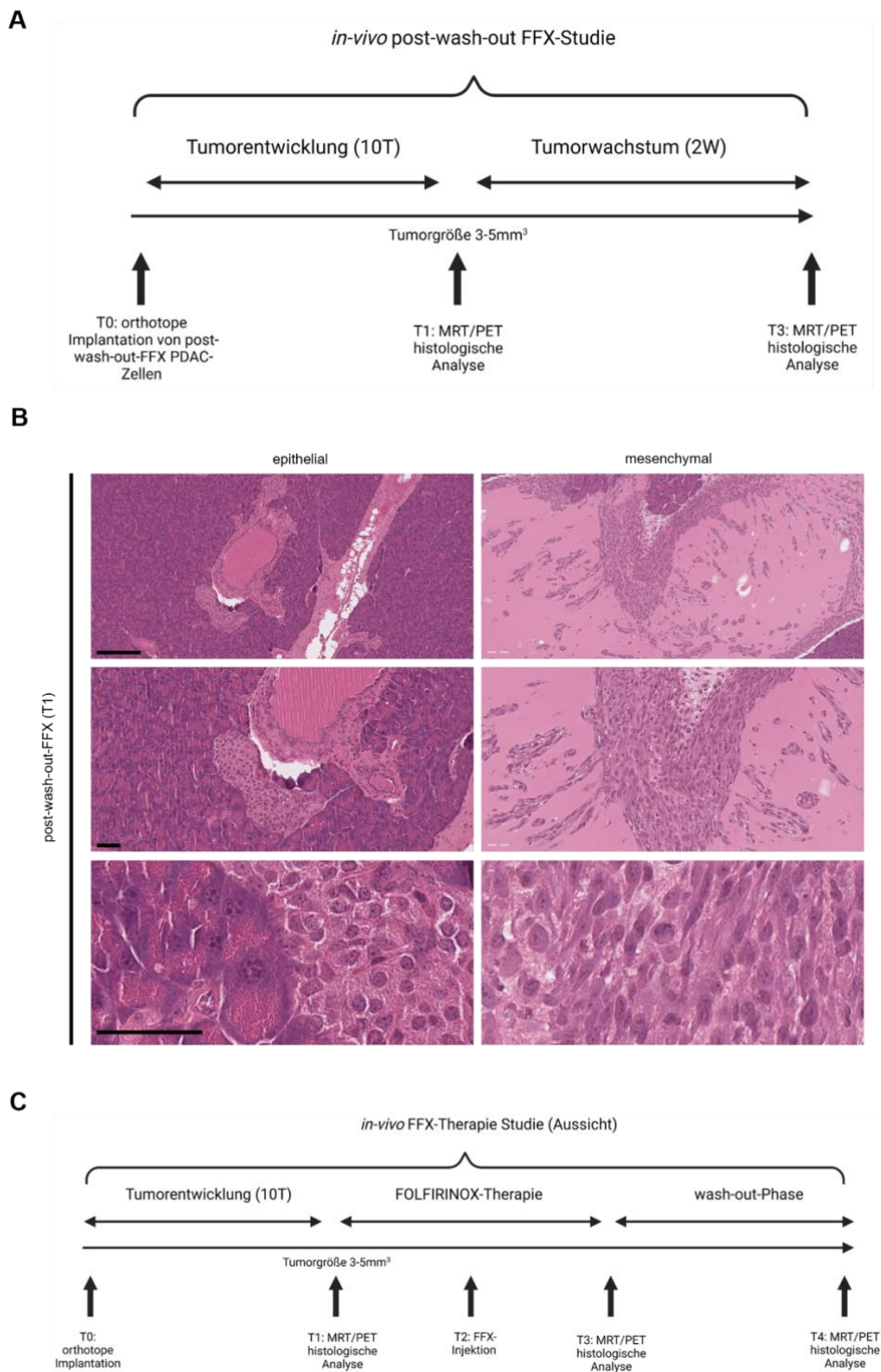
B: Quantifizierung der Vimentin- und E-Cadherin Expression *in-vitro* von einer epithelialen (53631) Zelllinie unter drei Konditionen: Kontrolle, post-FFX., post-wash-out-FFX, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

C: Immunfluoreszenzfärbung einer mesenchymalen Zelllinie (16992) unter drei Konditionen: Kontrolle, post-FFX, post-wash-out-FFX. Anfärbung von DAPI, Phalloidin, E-Cadherin und Vimentin. Maßstabskala markiert 40µm

D: Quantifizierung der Vimentin- und E-Cadherin Expression *in-vitro* von einer mesenchymalen (16992) Zelllinie unter drei Konditionen: Kontrolle, post-FFX., post-wash-out-FFX, technische Replikate (n= 5), ungepaarter t-Test (ns= nicht signifikant; \*\*\*signifikant P<0,0005), \*\*\*\*signifikant= P<0,0001)

## **5.6 Orthotope Implantation von post-wash-out-FFX Zellen in murinen Pankreas**

Auf Grundlage der zuvor durchgeführten histologischen Analysen an unbehandelten PDAC Tumoren *in-vivo* und den Erkenntnissen der *in-vitro* Experimente unter Therapie, erfolgte als nächster Schritt die orthotope Implantation von *in-vitro* FFX-therapierten Zellen, nach einer wash-out Phase von 72h (post-wash-out-FFX), in das Pankreas von Mäusen (Abbildung 7A). Mittels dieses Experiments wollten wir den Einfluss der FFX Therapie auf die Wachstumsgeschwindigkeit, den Glucose Metabolismus sowie potentielle subtypspezifische Plastizitätsmechanismen (EMT), auf der Basis der Kontrollstudie, *in-vivo* analysieren. Hierbei zeigte sich nach 11 Tagen (T1), im Vergleich zu den unbehandelten PDAC Tumoren, ein deutlich langsames Wachstum, sodass sich das Tumorgewebe in der Bildgebung nicht klar abgrenzen ließ. Die orthotop implantierten mesenchymalen Tumorzellen zeigten im Rahmen der histologischen Analyse mittels HE-Färbung, bereits kleine histologisch nachweisbare Anteile an Tumorgewebe, mit subtypspezifischer Morphologie und sarkomatoidem Verteilungsmuster. Bei den epithelialen Zellen, war hingegen nach 11 Tagen (T1) noch kein Tumorgewebe abgrenzbar (Abbildung 7B). Als Aussicht für weitere Experimente zur modifizierten Identifizierung und histologischen Analyse der FFX therapierten Pankreastumore, zeigt Abbildung 7C ein mögliches alternatives Schema zum Aufbau einer gezielten Analyse von Plastizitätsmechanismen *in-vivo*.



**Abbildung 7: HE-Färbung von orthotop implantierten post-wash-out-FFX epithelialen und mesenchymalen Tumorzellen**

A: Schematische Darstellung der *in-vivo* post-wash-out-FFX Studie

B: HE-Färbungen von Pankreastumoren, aus orthotop implantierten, FFX therapierten (post-wash-out-FFX) epithelialen (53631) und mesenchymalen (16992) Zelllinien. Maßstabbalken markieren 200µm (obere Reihe), 50µm (beide unteren Reihen)

C: Schematische Darstellung einer zukünftigen *in-vivo* FFX Therapie-Studie, mit direkter FFX Therapie der Maus nach orthotoper Implantation von unbehandelten PDAC Zellen



## 6 Diskussion

Aufgrund des unzureichenden therapeutischen Ansprechens des PDAC unter FOLFIRINOX Therapie, wurden potenzielle Resistenzmechanismen epithelialer und mesenchymaler Tumorzellen in unterschiedlichen Konditionen untersucht. Um die Problematik zu adressieren wurden morphologische und metabolische Untersuchungen *in-vitro* und *in-vivo* durchgeführt. Dabei konzentrierten sich die Experimente auf die Charakterisierung der PDAC-Subtypen, den EMT-Prozess sowie die Reprogrammierung des Glucosestoffwechsels in unbehandelten und FFX therapierten PDAC-Zellen.

Nach erfolgter FOLFIRINOX Therapie ließ sich bei dem epithelialen Zelltyp ein deutlicher Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit *in-vitro* und *in-vivo* nachweisen, wobei eine schnelle Regeneration der post-wash-out-FFX Zellen *in-vitro* festzustellen war. Der mesenchymale Zelltyp reagierte wiederum, im Vergleich zum epithelialen Phänotyp mit einer deutlich geringeren Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit nach FFX Therapie *in-vitro* und *in-vivo*, bei ebenfalls schneller Regeneration der post-wash-out-FFX Zellen *in-vitro*. Bei Betrachtung der glykolytische Aktivität der subtypspezifischen Zellen, ließ sich eine metabolische Reprogrammierung unter FOLFIRINOX Therapie feststellen. Zur Untersuchung von Tumorplastizitätsmechanismen, wurde die Expression von EMT-Markern analysiert, wobei sich insbesondere bei den epithelialen Zellen ein beginnender EMT-Switch nach FOLFIRINOX Therapie andeutete.

### 6.1 Charakterisierung der subtypspezifischen PDAC Tumorzellen

Zur Darstellung der subtypspezifischen Merkmale wurden Immunfluoreszenzfärbungen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* sowie HE-Färbungen von PDAC Tumoren aus der Maus erstellt. Anhand der Expression der EMT-Marker und der Zellmorphologie zeigte sich,

wie bereits durch Mueller et al. durch RNA-Sequenzierung und Clustereinteilung bestätigt, ein epithelialer und ein mesenchymaler Tumorzellsubtyp (Mueller et al., 2018). Die Erkenntnisse konnten sich in der Literatur durch weitere Subtypisierungen bestätigen, wobei Moffitt und Kollegen auf der Grundlage der drei Collisson und Kollegen Subtypen (klassisch, quasi-mesenchymal und exokrin-ähnlich), mittels Genexpressionsanalysen einen klassischen (epithelialen) und basal-ähnlichen (mesenchymalen) Tumorsubtyp beschrieb (Collisson et al., 2011; Moffitt et al., 2015). In weiteren Untersuchungen definierte Bailey et al. vier PDAC Subtypen: squamös, exokrin-ähnlich, pankreatisch-progenitor und immunogen (Bailey et al., 2016).

Die epithelialen Tumore zeigten ein dicht vernetztes prismatisches Epithel mit duktalem Strukturen und einer deutlichen Expression der epithelialen Marker (E-Cadherin, Cytokeratin 19 und  $\beta$ -Catenin). Der epitheliale Zelltyp kennzeichnete sich durch seine polygonale, kopfsteinpflasterartige Zellstruktur mit einer starken Polarität entlang der apikal-basalen Achse (Nieto, 2011; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Die Morphologie der mesenchymalen Tumore kennzeichnete sich durch eine sarkomatoide Anordnung und einer Fibroblasten-ähnlichen, spindelförmigen Struktur der Zellen, mit gesteigerter Expression von Vimentin und Zeb1 (Nieto, 2011; Thiery et al., 2009; S. Wang et al., 2017). Moffitt et al. konnte bereits in der Vergangenheit eine gesteigerte Expression der Gene Keratin und Laminin beim mesenchymalen Subtyp, sowie die Expression epithelialer Gene beim klassischen Subtyp mittels Genexpressionsanalyse nachweisen (Moffitt et al., 2015). Die beobachtete negative Korrelation der EMT-Marker, E-Cadherin und Vimentin, wurde wiederum bereits durch Yamada et al. festgestellt (Yamada et al., 2013). Anhand von HE-Färbungen des Tumorgewebes und Immunfluoreszenzfärbungen des Tumors sowie der einzelnen Tumorzellen, mit der Fokussierung auf die EMT-Marker, konnten die phänotypischen Charakteristika hier ebenfalls dargestellt werden.

## **6.2 Wachstumsverhalten von unbehandelten und FOLFIRINOX therapierten PDAC Tumorzellen**

Anhand von RNA-Sequenzierungsdaten und Genomsequenzierungen konnte bereits gezeigt werden, dass sich das therapeutische Ansprechen des fortgeschrittenen PDAC gegenüber FOLFIRINOX Therapie, abhängig vom Subtyp, signifikant unterscheidet. Dabei zeigte der klassische (epithelialen) Subtyp nach einem Median von 35 Tagen unter FFX Therapie ein besseres Ansprechen und progressionsfreies Überleben, im Vergleich zum basal-ähnlichen (mesenchymalen) PDAC Subtyp (Aung et al., 2018). Des Weiteren konnte in früheren Studien bereits nachgewiesen werden, dass mesenchymale Zellen unter anderem aufgrund ihres glykolytischen Profils, aggressiver und weniger empfindlich gegenüber Chemotherapie sind (Daemen et al., 2015; Karasinska et al., 2020). Außerdem zeigten Pankreastumorpatienten mit einem mesenchymalen Subtyp, bei einem durchschnittlichen Überleben von 13,3 Monaten, eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit einem epithelialen Phänotyp (Torres & Grippo, 2018; Yamada et al., 2013).

Diese Erkenntnisse konnten sich in unseren *in-vitro* sowie ansatzweise auch *in-vivo* Experimenten bestätigen. Um das Wachstum und die Tumorprogression nach erfolgter FFX Therapie beurteilen zu können und damit das Ansprechen der Chemotherapie zu bestimmen, wurde zunächst *in-vitro* eine Wachstumsanalyse mittels MTT-Assay erstellt. Hierbei zeigte sich insbesondere bei den epithelialen Zellen im Vergleich zwischen unbehandelten und post-FFX therapierten Zellen eine signifikante Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit, wohingegen bei den mesenchymalen Zellen in der Gesamtheit der untersuchten Zelllinien ein nicht-signifikanter Unterschied zu sehen war. Während sich das Wachstum der therapierten Zellen nach einer zusätzlichen wash-out Phase von 72h (post-wash-out-FFX), der Wachstumsgeschwindigkeit der unbehandelten Tumorzellen anglich. Die daraus gewonnen Erkenntnisse bestätigen die

wachstumshemmende Wirksamkeit der FOLFIRINOX Chemotherapie, wie auch das bessere therapeutische Ansprechen des epithelialen Phänotyps verglichen zum aggressiveren und resistenteren sowie stark differenzierten mesenchymalen Subtyp.

Betrachtet man die Proliferationsaktivität (Ki67) der unbehandelten PDAC Tumore *in-vivo* zeigten sich beim epithelialen Subtypen zum frühen Zeitpunkt (T1) mehr Ki67 positive Zellen, verglichen zum späteren Zeitpunkt (T3), während bei den mesenchymalen Tumoren wiederum mit zunehmenden Wachstum (T3) eine höhere Proliferationsaktivität sichtbar wurde. Vergleicht man das Wachstumsverhalten der implantierten post-wash-out-FFX therapierten Zellen mit den unbehandelt-implantierten Zellen (Kontrolle), zeigte sich zum Zeitpunkt (T1) ein deutlicher Unterschied in der Tumorgroße. Während die unbehandelten epithelialen und mesenchymalen Zellen nach 11 Tagen bereits ihre charakteristische und subtypspezifische Morphologie, mit Ausbildung eines Tumorzellverbundes aufwiesen, zeigten wiederum nur die mesenchymalen post-wash-out FFX Zellen nach 11 Tagen vereinzelt kleine Tumorzellverbände. Bei den post-wash-out-FFX implantierten epithelialen Zellen war hingegen noch kein charakteristisches Tumorgewebe abgrenzbar. Diese Erkenntnisse unterstreichen erneut das aggressivere und schnellere Wachstum der mesenchymalen Zellen, auch unter dem Druck der durchgeführten Therapie sowie die schnellere Regeneration der mesenchymalen post-wash-out-FFX Zellen, im Vergleich zum epithelialen Subtyp. Beim Vergleich der subtypspezifischen Regeneration der post-wash-out-FFX Zellen zwischen *in-vivo* und *in-vitro*, zeigte sich nach der FFX Therapie in beiden Experimenten eine schnellere Erholung des mesenchymalen Subtyp im Vergleich zum epithelialen Subtyp. Diese gezeigten Erkenntnisse sind möglicherweise dadurch zu begründen, dass der epitheliale Subtyp im Vergleich zum mesenchymalen Subtyp sowohl phänotypisch als auch metabolisch einer stärkeren Reprogrammierung, unter FFX Therapie unterliegt.



### **6.3 EMT Prozess als Plastizitätsmechanismus unter FOLFIRINOX Therapie**

Die epithelial zu mesenchymale Transition (EMT) beschreibt eine phänotypische Reaktion von epithelialen Zellen, die durch unterschiedliche Auslöser wie beispielsweise der Tumorentstehung, im Verlauf des Tumorwachstums, durch den Einfluss von Chemotherapeutika oder auch Entzündungsprozesse bedingt sein kann und sich insbesondere durch eine Beeinflussung von EMT-regulierenden Transkriptionsfaktoren sowie eine Internalisierung von Proteinen vollzieht (Aiello et al., 2018; Rhim et al., 2012; Shah et al., 2007; Ye & Weinberg, 2015).

Aiello et al. stellte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und RNA-Sequenzierungsdaten fest, dass sich EMT-durchlaufende Zellen in unbehandelten Pankreastumoren im Rahmen des Wachstums, durch einen Verlust der E-Cadherin Expression, bei gleichzeitigem Anstieg der Vimentin Expression kennzeichnen (Aiello et al., 2018). In der Untersuchung der unbehandelten PDAC Tumore wurde anhand der Expression der EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin, sowohl in den Immunfluoreszenzbilder als auch der dazugehörigen Quantifizierung deutlich, dass sich die Expression von E-Cadherin sowie von Vimentin, während des Tumorwachstums zwischen dem frühen (T1) und späten (T3) Zeitpunkt nicht signifikant unterschied. Ein Grund für diese Erkenntnis könnte sein, dass die Anzahl an einzelnen EMT durchlaufende Zellen selbst zum späten Zeitpunkt (T3) noch zu gering war, um einen signifikanten Unterschied der beiden EMT-Marker zu bewirken.

Nachdem in früheren Studien, EMT als einer der Resistenzmechanismen von PDAC Zellen gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutikern, wie Gemcitabin, 5-Fluoruracil oder Cisplatin, nachgewiesen werden konnte, wurde die Rolle des EMT-Prozess auch bei FFX therapierten Pankreastumorzellen untersucht (Aiello et al., 2018; Rhim et al., 2012; Shah et al., 2007; Ye & Weinberg, 2015). Dabei konnte bei Gemcitabin

resistenten Zellen, im Vergleich zu behandlungsreaktiven Zellen, ein zunehmender Verlust von E-Cadherin, bei gleichzeitigem Expressionsanstieg von Vimentin nachgewiesen werden, wodurch der Zusammenhang zwischen EMT und Chemotherapieresistenz verdeutlicht wurde (Shah et al., 2007). Neben zahlreichen Studien die einen EMT Prozess, getriggert durch den Einfluss der Chemotherapie beweisen, zeigten Werba und Kollegen, anhand von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen hingegen, dass klassische (epithelial) und basal-ähnliche (mesenchymale) PDAC Tumorzellen keine Transkriptionsreaktionen auf die Chemotherapie im Vergleich zum unbehandelten Zustand aufweisen. Dabei zeigten die ausgewerteten PDAC Proben bereits eine Mischung aus basalen und klassischen Tumorzellen, was auf eine bereits erfolgte Plastizität des Subtyps während der Tumorgenese, wie bereits oben beschrieben, hindeuten könnte (Werba et al., 2023).

Die in den *in-vitro* Experimenten eingesetzte Chemotherapie diente dazu, einen möglichen Einfluss von FOLFIRINOX auf morphologische Veränderungen und die EMT Marker Expression zu untersuchen. Nach 72h unter FOLFIRINOX Behandlung (post-FFX) zeigten die epithelialen Zellen morphologisch eine deutliche Größenzunahme und Veränderungen in der Expression und Verteilung der EMT-Marker. Morphologische Veränderungen wurden bereits bei Gemcitabin resistenten Zellen festgestellt, wobei weniger die Größenveränderung, sondern insbesondere die Umwandlung hin zu einer spindelförmigen Morphologie mit reduzierter Adhäsion im Vordergrund steht (Shah et al., 2007). Die Größenveränderung der epithelialen Zellen nach FFX Therapie könnten einen Hinweis für das Phänomen einer Zellseneszenz, als Ausdruck einer Unterdrückung der Tumorzellteilung darstellen. E-Cadherin, zeigte nach FFX Therapie als epithelialer Marker eine zunehmend diffuse Verteilung mit Internalisation, wohingegen die unbehandelten epithelialen Zellen (Kontrolle) eine überwiegend membranöse Expression von E-Cadherin aufwiesen. Des Weiteren zeigte sich bei den epithelialen therapierten

Zellen (post-FFX) im Vergleich zur Kontrolle eine gesteigerte Expression des mesenchymalen Markers, Vimentin. Diese Erkenntnisse könnten als Hinweis für einen beginnenden EMT-Prozess, welcher durch den Druck der FFX Therapie ausgelöst wurde und damit einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber FOLFIRINOX im PDAC darstellt, dienen. In früheren Studien bestätigte sich bereits eine inverse Korrelation von Zeb1, als mesenchymaler Marker, und den epithelialen Markern E-Cadherin, epithelial V-like antigen 1 (EVA1) und T-Zell Differenzierungsprotein 2 (MAL2). Beim EMT-Prozess kommt es folglich zu einer Hochregulierung von Zeb1, das wiederum eine nachgewiesene gesteigerte Resistenz gegenüber Gemcitabin, 5-FU und Cisplatin auslöst (Arumugam et al., 2009). Bei Genexpressionsanalysen von 5-FU- oder Gemcitabin therapierten Zellen, wiesen die arzneimittelresistenten Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen, viele Merkmale auf, die mit EMT übereinstimmen. Eine Deletion der EMT stimulierenden Transkriptionsfaktoren, Snail und Twist, führten zu einer Hochregulierung der Wirkstoff-spezifischen Nukleosid-Transporter Ent1 und Cnt3 sowie von Wirkstoff-spezifischen Proteinen, wodurch sich ein höheres Therapieansprechen gegenüber der Gemcitabin Therapie zeigte (Zheng et al., 2015). Beim Vergleich des Phänotyps von resezierten Tumoren, zeigte sich bei den unbehandelten Tumoren ein Überhang des epithelialen Phänotyp, wohingegen die resezierten FFX therapierten Tumore zu 2/3 die Charakteristika des quasi-mesenchymalen Phänotyp aufwiesen (Porter et al., 2019). Zuletzt konnten Bachir et al. 2022 nach 3 Zyklen erfolgter Chemotherapie eine Hochregulierung der Expression von Genen, die für die Proliferation (*CCNE1* und *c-myc*), Krebsstammzellbildung (*LGR5*) und Aggressivität (*ITGB7*) codieren, in FFX therapierten Organoiden, feststellen (Hadj Bachir et al., 2022). Trotz der geringen Anzahl an Studien, welche die Wirkung von FFX auf die Pankreastumorzellen analysieren, sind die beschriebenen Erkenntnisse, sowohl bei Gemcitabin resistenten Zellen als auch FFX Therapie Studien in Kombination mit den hier dargestellten *in-vitro* Ergebnissen, bereits

erste Hinweise, die für einen durch die FFX Therapie ausgelösten EMT-Prozess, als möglichen Resistenzmechanismus sprechen. Um diese *in-vitro* festgestellten Ergebnisse weiter zu bekräftigen und auf *in-vivo* Modelle auszuweiten, stellen die histologische Analyse und Untersuchungen der EMT-Marker Expression von FFX therapierten murinen PDAC Tumoren einen interessanten Ansatz für zukünftige Experimente dar. Um den EMT-Prozess nach FFX Therapie spezifischer zu objektivieren und analysieren, könnten eine Quantifizierung der IF-stainings von therapierten Zellen *in-vivo* sowie Expressionsanalysen der jeweiligen Marker im Verlauf einen weiteren interessanten Ansatz, darstellen.

#### **6.4 Subtypspezifische Unterschiede im Glucosemetabolismus nach**

##### **FOLFIRINOX Therapie**

Den oben beschriebenen Phänotypen kann auch ein metabolischer Subtyp zugeordnet werden, dabei zeigen die mesenchymalen Zellen, einen gesteigerten Glucosemetabolismus und werden dem glykolytischen Subtyp zugeordnet, wohingegen die epithelialen Zellen mit dem lipogenen Subtyp in Verbindung gebracht werden (Daemen et al., 2015). Eine weitere Klassifizierung in die metabolischen Subtypen L1 und L2 erfolgte durch Zhao und Kollegen, wobei der L1-Subtyp, durch hochregulierte glykolytische und lipogene Gene einem gemischt glykolytisch-lipogenen Daemen Subtyp entspricht und der L2-Subtyp durch herunterregulierte Gene des Lipidstoffwechsels, bei gleichzeitig gesteigerter Expression glykolytischer Gene dem glykolytischen Daemen Subtyp zugeordnet werden kann (Zhao, Zhao, & Yan, 2018). Diese Feststellung konnte durch eine PET-Analyse von *in-vivo* Maustumoren anhand von Quantifizierungen der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme, mittels Standard uptake value (SUV max) bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikant höhere <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme bei den mesenchymalen Zellen, verglichen zu den epithelialen Zellen. In Kombination mit der gesteigerten Expression

des Glucosetransporter (Glut1) in mesenchyalem Tumorgewebe verglichen zu epithelialen Tumoren, konnte sich diese Erkenntnis bestätigen.

In der Vergangenheit zeigten Studien, dass PDAC Tumore mit einer niedrigen Glut1-Expression (epithelialer Phänotyp) ein besseres therapeutisches Ansprechen aufweisen. Des Weiteren konnte ein signifikanter Anstieg der Glut1-Expression bei Patienten nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie festgestellt werden (Kurahara et al., 2018). Anhand der Ergebnisse der *in-vivo* <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme und dem Proliferationsassay nach erfolgter FFX Therapie (post-FFX) *in-vitro*, wurde sowohl die niedrigere glykolytische Aktivität in epithelialen PDAC Tumoren sowie das bessere therapeutische Ansprechen der epithelialen Pankreastumorzellen, im Vergleich zum glykolytisch aktivierten mesenchymalen Subtyp, nachgewiesen. Ein Hinweis, der die Beteiligung des Glucosemetabolismus an Resistenzmechanismen in Tumorzellen gegenüber Chemotherapie mitbestätigt, zeigte die gesteigerte Chemosensitivität von Kopf-Nackentumoren nach Inhibition des Glucosetransporters (Glut1) (Y. D. Wang, Li, & Liao, 2013). Bei der Analyse von Gemcitabin resistenten Zellen zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation zwischen einer gesteigerten Glucoseaufnahme und damit einhergehend verstärkter Resistenz gegenüber der Therapie (Shukla et al., 2017). Zur Beurteilung des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit zwei Zyklen FOLFIRINOX und einem Gemcitabin basierten 3. Zyklus, zeigte sich bei den chemosensitiven Patienten eine deutliche Abnahme der Glykolyseaktivität und des metabolischen Tumolvolumens, wohingegen die Patienten, die nicht auf die Chemotherapie angesprochen haben, einen Anstieg der beiden Parameter aufwiesen (Harder et al., 2021).

Um die Auswirkungen von FOLFIRINOX auf den Glucosemetabolismus der Pankreastumorzellen zu untersuchen, wurde ein *in-vitro* FDG-Aufnahme-Assay, mit anschließender Messung der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme im Gammazähler durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen (Kontrolle) zu Zellen nach

erfolgter FFX-Therapie (post-FFX), bei beiden Subtypen, eine Veränderung im Glucosemetabolismus. Insbesondere die epithelialen Zellen zeigten unter dem Einfluss der FOLFIRINOX Therapie eine gesteigerte Glucoseaufnahme, wohingegen die glykolytische Aktivität der mesenchymalen Zellen nach FFX Therapie abnahm. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse und der bereits erwähnten Zuordnung der Phänotypen zu deren charakteristischen metabolischen Merkmalen, stellten die Ergebnisse des in-vitro <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme Assays auch hier Anzeichen dafür dar, dass die epithelialen Zellen unter der FFX Therapie einen EMT-Prozess, hin zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme, als potentiellen Resistenzmechanismus, durchlaufen. In der anschließenden 72h wash-out Phase (post-wash-out-FFX), näherte sich die Glucoseaufnahme der epithelialen, wie auch der mesenchymalen Tumorzellen zunehmend der Kontrolle an, was für die schnelle Regenerationsfähigkeit der Pankreastumorzellen nach Beendigung der Therapie spricht. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse und noch zu wenig Informationen über die Wirkung von FOLFIRINOX auf den Glucosemetabolismus, gilt es weitere mögliche Einflüsse zu identifizieren und durch gezielte Herangehensweisen, wie beispielsweise die Inhibition des Glucosetransporters (Glut1), dem Überleben der Pankreastumortumorzellen unter FFX Therapie entgegenzuwirken.

## **6.5 Ausblick**

Die hier beschriebenen Erkenntnisse und durchgeführten Methoden stellen die wichtige Basis eines großen Projektes dar, das durch weitere Experimente, mit gezieltem Schwerpunkt auf die Identifizierung von möglichen Resistenzmechanismen des PDAC unter FOLFIRINOX Therapie, ergänzt werden soll.

Nachdem das geringe Wachstum der Tumorzellen 11 Tage nach der Implantation von post-wash-out-FFX therapierten Zellen nicht ausreichte, um eine umfangreiche Analyse der *in-vivo* EMT-Marker Expression und des Glucosemetabolismus durchzuführen, würde ein erneuter Versuch mit Implantation von post-FFX Zellen oder post-wash-out-

FFX Zellen, bei längerer Wachstumszeit von mindestens 20 Tagen einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Darauffolgend könnte die direkte intrakutane oder intravenöse FOLFIRINOX Therapie der Maus, ab einem im MRT bestimmten Tumorzellen, nach Implantation von unbehandelten Tumorzellen, weitere interessante Erkenntnisse liefern. Dabei können Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung bestimmter Marker sowie Genexpressionsanalysen, wie auch eine Wachstumsanalyse einen Beitrag, zur gezielten Identifizierung von EMT-regulierenden Faktoren und metabolischen Veränderungen, ausgelöst durch die FOLFIRINOX Therapie, leisten. Um die Aktivität bestimmter Gene, die an dem EMT-Prozess beteiligt sind z.B. Zeb1, Snail, Twist identifizieren und quantifizieren zu können, würde eine RNA-Sequenzierung bei post-FFX therapierten Zellen interessante Ergebnisse liefern. Anhand der mikroskopischen Einblicke in zuvor etablierte PDAC-Subtypen, der Identifizierung der veränderten Expression von EMT-Markern unter FOLFIRINOX Therapie sowie der Anpassung des Glucosemetabolismus unter Therapie, könnte die gezielte Beeinflussung bestimmter Enzyme, Gene und/oder Transporter einen vielversprechenden Ansatz zur Überwindung der Chemoresistenz beim PDAC darstellen. Folglich könnte die pharmakologische Regulierung des Glucose-Metabolismus sowie die Beeinflussung der Aktivität bestimmter EMT-regulierenden Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Snail, Twist und Zeb1 eingesetzt werden, um eine gezielte Beeinflussung dieser Resistenzmechanismen zu bewirken und damit die Wirkung der Therapie sowie die Prognose vom PDAC zu verbessern. Um frühzeitig die personalisierte und subtypspezifische Therapie identifizieren und einsetzen zu können, könnten die *in-vivo* Untersuchungen zusätzlich als diagnostischer Biomarker klinisch etabliert werden.





## 7 Literaturverzeichnis

- Abal, M., Andreu, J. M., & Barasoain, I. (2003). *Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action*. *Curr Cancer Drug Targets*, 3(3), 193-203. doi: <http://doi.org/10.2174/1568009033481967>
- Adamska, A., Domenichini, A., & Falasca, M. (2017). *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies*. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi: <http://doi.org/10.3390/ijms18071338>
- Aiello, N. M., Maddipati, R., Norgard, R. J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., . . . Stanger, B. Z. (2018). *EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration*. *Dev Cell*, 45(6), 681-695 e684. doi: <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.027>
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., . . . Choi, W. (2009). *Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 69(14), 5820-5828. doi: <http://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-2819>
- Aung, K. L., Fischer, S. E., Denroche, R. E., Jang, G. H., Dodd, A., Creighton, S., . . . Knox, J. J. (2018). *Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial*. *Clin Cancer Res*, 24(6), 1344-1354. doi: <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2994>
- Azrak, R. G., Cao, S., Slocum, H. K., Toth, K., Durrani, F. A., Yin, M. B., . . . Rustum, Y. M. (2004). *Therapeutic synergy between irinotecan and 5-fluorouracil against human tumor xenografts*. *Clin Cancer Res*, 10(3), 1121-1129. doi: <http://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0913-3>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., . . . Grimmond, S. M. (2016). *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer*. *Nature*, 531(7592), 47-52. doi: <http://doi.org/10.1038/nature16965>
- Basturk, O., Singh, R., Kaygusuz, E., Balci, S., Dursun, N., Culhaci, N., & Adsay, N. V. (2011). *GLUT-1 expression in pancreatic neoplasia: implications in pathogenesis, diagnosis, and prognosis*. *Pancreas*, 40(2), 187-192. doi: <http://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318201c935>
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. (2014). *Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection*. *World J Gastroenterol*, 20(32), 11182-11198. doi: <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11182>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi: <http://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., . . . Von Hoff, D. D. (1997). *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas*

- cancer: a randomized trial. J Clin Oncol*, 15(6), 2403-2413. doi: <http://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>
- Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O'Kane, G. M., . . . Notta, F. (2020). *Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. Nat Genet*, 52(2), 231-240. doi: <http://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., . . . Gray, J. W. (2011). *Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. Nat Med*, 17(4), 500-503. doi: <http://doi.org/10.1038/nm.2344>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., . . . Intergroup, P. (2011). *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med*, 364(19), 1817-1825. doi: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Daemen, A., Peterson, D., Sahu, N., McCord, R., Du, X., Liu, B., . . . Evangelista, M. (2015). *Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(32), E4410-4417. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.1501605112>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab*, 7(1), 11-20. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- Ducreux, M., Mitry, E., Ould-Kaci, M., Boige, V., Seitz, J. F., Bugat, R., . . . Rougier, P. (2004). *Randomized phase II study evaluating oxaliplatin alone, oxaliplatin combined with infusional 5-FU, and infusional 5-FU alone in advanced pancreatic carcinoma patients. Ann Oncol*, 15(3), 467-473. doi: <http://doi.org/10.1093/annonc/mdh098>
- Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Büschenfelde, C., Friess, H., & Kleeff, J. (2010). *Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. PLoS Med*, 7(4), e1000267. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000267>
- Gourgou-Bourgade, S., Bascoul-Mollevis, C., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., . . . Conroy, T. (2013). *Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. J Clin Oncol*, 31(1), 23-29. doi: <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.4869>
- Hadj Bachir, E., Poiraud, C., Paget, S., Stoup, N., El Moghrabi, S., Duchene, B., . . . Vincent, A. (2022). *A new pancreatic adenocarcinoma-derived organoid model of acquired chemoresistance to FOLFIRINOX: First insight of the underlying mechanisms. Biol Cell*, 114(1), 32-55. doi: <http://doi.org/10.1111/boc.202100003>
- Harder, F. N., Jungmann, F., Kaissis, G. A., Lohofer, F. K., Ziegelmayr, S., Havel, D., . . . Braren, R. F. (2021). *[(18)F]FDG PET/MRI enables early chemotherapy response prediction in pancreatic ductal adenocarcinoma. EJNMMI Res*, 11(1), 70. doi: <http://doi.org/10.1186/s13550-021-00808-4>

- Hennenfent, K. L., & Govindan, R. (2006). *Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?* *Ann Oncol*, 17(5), 735-749. doi: <http://doi.org/10.1093/annonc/mdj100>
- Hertel, L. W., Boder, G. B., Kroin, J. S., Rinzel, S. M., Poore, G. A., Todd, G. C., & Grindey, G. B. (1990). *Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine)*. *Cancer Res*, 50(14), 4417-4422.
- Hidalgo, M. (2010). *Pancreatic cancer*. *N Engl J Med*, 362(17), 1605-1617. doi: <http://doi.org/10.1056/NEJMra0901557>
- Higashi, T., Tamaki, N., Honda, T., Torizuka, T., Kimura, T., Inokuma, T., . . . Konishi, J. (1997). *Expression of glucose transporters in human pancreatic tumors compared with increased FDG accumulation in PET study*. *J Nucl Med*, 38(9), 1337-1344.
- Huber, M. A., Kraut, N., & Beug, H. (2005). *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5), 548-558. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.001>
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., . . . Kaelin, W. G., Jr. (2001). *HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing*. *Science*, 292(5516), 464-468. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1059817>
- Kang, J., Hwang, I., Yoo, C., Kim, K. P., Jeong, J. H., Chang, H. M., . . . Ryoo, B. Y. (2018). *Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX as the first-line chemotherapy for patients with metastatic pancreatic cancer: retrospective analysis*. *Invest New Drugs*, 36(4), 732-741. doi: <http://doi.org/10.1007/s10637-018-0598-5>
- Karasinska, J. M., Topham, J. T., Kalloger, S. E., Jang, G. H., Denroche, R. E., Culibrk, L., . . . Schaeffer, D. F. (2020). *Altered Gene Expression along the Glycolysis-Cholesterol Synthesis Axis Is Associated with Outcome in Pancreatic Cancer*. *Clin Cancer Res*, 26(1), 135-146. doi: <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1543>
- Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., Brown, J. M., . . . Vierra, M. (2000). *Pancreatic tumors show high levels of hypoxia*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48(4), 919-922. doi: [http://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)00803-8](http://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)00803-8)
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., . . . Brabletz, T. (2017). *The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer*. *Nat Cell Biol*, 19(5), 518-529. doi: <http://doi.org/10.1038/ncb3513>
- Kurahara, H., Maemura, K., Mataka, Y., Sakoda, M., Iino, S., Kawasaki, Y., . . . Natsugoe, S. (2018). *Significance of Glucose Transporter Type 1 (GLUT-1) Expression in the Therapeutic Strategy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 25(5), 1432-1439. doi: <http://doi.org/10.1245/s10434-018-6357-1>

- Li, J. T., Wang, Y. P., Yin, M., & Lei, Q. Y. (2019). *Metabolism remodeling in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Cell Stress*, 3(12), 361-368. doi: <http://doi.org/10.15698/cst2019.12.205>
- Li, Q. Q., Xu, J. D., Wang, W. J., Cao, X. X., Chen, Q., Tang, F., . . . Xu, Z. D. (2009). *Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 15(8), 2657-2665. doi: <http://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-08-2372>
- McCall, C. M., Shi, C., Cornish, T. C., Klimstra, D. S., Tang, L. H., Basturk, O., . . . Hruban, R. H. (2013). *Grading of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors is improved by the inclusion of both Ki67 proliferative index and mitotic rate*. *Am J Surg Pathol*, 37(11), 1671-1677. doi: <http://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000089>
- Moffitt, R. A., Marayati, R., Flate, E. L., Volmar, K. E., Loeza, S. G., Hoadley, K. A., . . . Yeh, J. J. (2015). *Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Nat Genet*, 47(10), 1168-1178. doi: <http://doi.org/10.1038/ng.3398>
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., . . . Rad, R. (2018). *Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes*. *Nature*, 554(7690), 62-68. doi: <http://doi.org/10.1038/nature25459>
- Nieto, M. A. (2011). *The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 347-376. doi: <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>
- Pang, Y., Holmes, M. V., Chen, Z., & Kartsonaki, C. (2019). *A review of lifestyle, metabolic risk factors, and blood-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *J Gastroenterol Hepatol*, 34(2), 330-345. doi: <http://doi.org/10.1111/jgh.14576>
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. *Cell Metab*, 3(3), 187-197. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 7(6), 415-428. doi: <http://doi.org/10.1038/nrc2131>
- Porter, R. L., Magnus, N. K. C., Thapar, V., Morris, R., Szabolcs, A., Neyaz, A., . . . Ting, D. T. (2019). *Epithelial to mesenchymal plasticity and differential response to therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.1914915116>
- Pusceddu, S., Ghidini, M., Torchio, M., Corti, F., Tomasello, G., Niger, M., . . . Petrelli, F. (2019). *Comparative Effectiveness of Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel and FOLFIRINOX in the First-Line Setting of Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Cancers (Basel)*, 11(4). doi: <http://doi.org/10.3390/cancers11040484>

- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. *Cancer Res*, 74(11), 2913-2921. doi: <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). *Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*. *World J Oncol*, 10(1), 10-27. doi: <http://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Reske, S. N., Grillenberger, K. G., Glatting, G., Port, M., Hildebrandt, M., Gansauge, F., & Beger, H. G. (1997). *Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma*. *J Nucl Med*, 38(9), 1344-1348. Retrieved from <https://jnm.snmjournals.org/content/jnumed/38/9/1344.full.pdf>
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., . . . Stanger, B. Z. (2012). *EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation*. *Cell*, 148(1-2), 349-361. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>
- Sato, N., Fukushima, N., Maehara, N., Matsubayashi, H., Koopmann, J., Su, G. H., . . . Goggins, M. (2003). *SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions*. *Oncogene*, 22(32), 5021-5030. doi: <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206807>
- Semenza, G. L. (2010). *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. *Oncogene*, 29(5), 625-634. doi: <http://doi.org/10.1038/onc.2009.441>
- Shah, A. N., Summy, J. M., Zhang, J., Park, S. I., Parikh, N. U., & Gallick, G. E. (2007). *Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells*. *Ann Surg Oncol*, 14(12), 3629-3637. doi: <http://doi.org/10.1245/s10434-007-9583-5>
- Shukla, S. K., Purohit, V., Mehla, K., Gunda, V., Chaika, N. V., Vernucci, E., . . . Singh, P. K. (2017). *MUC1 and HIF-1alpha Signaling Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer*. *Cancer Cell*, 32(3), 392. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.008>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). *Cancer statistics, 2020*. *CA Cancer J Clin*, 70(1), 7-30. doi: <http://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). *Cancer statistics, 2023*. *CA Cancer J Clin*, 73(1), 17-48. doi: <http://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Tanner, L. B., Goglia, A. G., Wei, M. H., Sehgal, T., Parsons, L. R., Park, J. O., . . . Rabinowitz, J. D. (2018). *Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells*. *Cell Syst*, 7(1), 49-62 e48. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cels.2018.06.003>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 139(5), 871-890. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>



- Torres, C., & Grippo, P. J. (2018). *Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine*. *Ann Med*, 50(4), 277-287. doi: <http://doi.org/10.1080/07853890.2018.1453168>
- Ueno, H., Okusaka, T., Funakoshi, A., Ishii, H., Yamao, K., Ishikawa, O., . . . Saitoh, S. (2007). *A phase II study of weekly irinotecan as first-line therapy for patients with metastatic pancreatic cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 59(4), 447-454. doi: <http://doi.org/10.1007/s00280-006-0283-9>
- Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. A. (2004). *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. *Genes Dev*, 18(10), 1131-1143. doi: <http://doi.org/10.1101/gad.294104>
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., . . . Renschler, M. F. (2013). *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. *N Engl J Med*, 369(18), 1691-1703. doi: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>
- Von Hoff, D. D., Ramanathan, R. K., Borad, M. J., Laheru, D. A., Smith, L. S., Wood, T. E., . . . Hidalgo, M. (2011). *Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial*. *J Clin Oncol*, 29(34), 4548-4554. doi: <http://doi.org/10.1200/jco.2011.36.5742>
- Wang, S., Huang, S., & Sun, Y. L. (2017). *Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review*. *Biomed Res Int*, 2017, 2646148. doi: <http://doi.org/10.1155/2017/2646148>
- Wang, Y. D., Li, S. J., & Liao, J. X. (2013). *Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) chemosensitized head and neck cancer cells to cisplatin*. *Technol Cancer Res Treat*, 12(6), 525-535. doi: <http://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500343>
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Banerjee, S., Azmi, A. S., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2011). *Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(1), 27-33. doi: <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.188>
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., . . . Brabletz, T. (2009). *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1487-1495. doi: <http://doi.org/10.1038/ncb1998>
- Werba, G., Weissinger, D., Kawaler, E. A., Zhao, E., Kalfakakou, D., Dhara, S., . . . Simeone, D. M. (2023). *Single-cell RNA sequencing reveals the effects of chemotherapy on human pancreatic adenocarcinoma and its tumor microenvironment*. *Nat Commun*, 14(1), 797. doi: <http://doi.org/10.1038/s41467-023-36296-4>
- Yamada, S., Fuchs, B. C., Fujii, T., Shimoyama, Y., Sugimoto, H., Nomoto, S., . . . Nakao, A. (2013). *Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer*. *Surgery*, 154(5), 946-954. doi: <http://doi.org/10.1016/j.surg.2013.05.004>
- Ye, X., & Weinberg, R. A. (2015). *Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression*. *Trends Cell Biol*, 25(11), 675-686. doi: <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.012>

- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., . . . DePinho, R. A. (2012). *Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism*. *Cell*, 149(3), 656-670. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., . . . Maheswaran, S. (2013). *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. *Science*, 339(6119), 580-584. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1228522>
- Zavadil, J., Haley, J., Kalluri, R., Muthuswamy, S. K., & Thompson, E. (2008). *Epithelial-mesenchymal transition*. *Cancer Res*, 68(23), 9574-9577. doi: <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2316>
- Zeng, S., Pottler, M., Lan, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., & Yang, H. (2019). *Chemoresistance in Pancreatic Cancer*. *Int J Mol Sci*, 20(18). doi: <http://doi.org/10.3390/ijms20184504>
- Zhang, H., Qian, D. Z., Tan, Y. S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y. R., . . . Semenza, G. L. (2008). *Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50), 19579-19586. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.0809763105>
- Zhang, J. Z., Behrooz, A., & Ismail-Beigi, F. (1999). *Regulation of glucose transport by hypoxia*. *Am J Kidney Dis*, 34(1), 189-202. doi: [http://doi.org/10.1016/s0272-6386\(99\)70131-9](http://doi.org/10.1016/s0272-6386(99)70131-9)
- Zhao, L., Zhao, H., & Yan, H. (2018). *Gene expression profiling of 1200 pancreatic ductal adenocarcinoma reveals novel subtypes*. *BMC Cancer*, 18(1), 603. doi: <http://doi.org/10.1186/s12885-018-4546-8>
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., . . . Kalluri, R. (2015). *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. *Nature*, 527(7579), 525-530. doi: <http://doi.org/10.1038/nature16064>





## **8 Danksagung**

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Maximilian Reichert dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe durchzuführen und jederzeit bei wissenschaftlichen Fragestellungen oder Diskussionen mit seiner wertvollen fachlichen Expertise zur Verfügung stand.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Katja Peschke, die mich während der gesamten Arbeit betreut und unterstützt hat sowie in wissenschaftlichen Diskussionen jederzeit für einen Rat zur Seite stand. Ohne ihre Betreuung und Ratschläge wäre diese Doktorarbeit nicht so reibungslos und strukturiert verlaufen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Rickmer Braren für die Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe und die Betreuung über die Zeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen Arbeitsgruppenmitgliedern bedanken, die mich bei offenen Fragen und der Durchführung der Laborarbeit jederzeit unterstützt haben.



