

Aus der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Tobias Keck

---

**Einfluss der inter- und intratumoralen Heterogenität auf das  
Therapieansprechen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- aus der Sektion Medizin -  
vorgelegt von  
Benedikt Färber  
aus Ahlen

Lübeck 2024

1. Berichterstatter\*in: PD Dr. med. Rüdiger Braun

Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Dorothea Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.10.2024

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

## Meinen Eltern

Um eine bessere Lesbarkeit zu erzeugen, wurden in dieser Arbeit nicht durchgehend gegenderte Bezeichnungen benutzt. Es wurde versucht eine möglichst geschlechtsneutrale Schreibweise zu nutzen. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich stets gleichermaßen auf männliche, weibliche und diverse Personen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	<i>Übersicht Publikationen der kumulativen Promotion .....</i>	<i>10</i>
<b>2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>11</b>
2.2	<i>Etablierung und molekulare Charakterisierung von zwei aus Patienten abgeleiteten, primären Zelllinien des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse .....</i>	<i>11</i>
2.3	<i>Molekulares Profiling und spezifisches Targeting von Gemcitabin-resistenten Subklonen in heterogenen Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellpopulationen.....</i>	<i>15</i>
2.4	<i>Die quasimesenchymale duktales Epithelzelllinie PANC-1 der Bauchspeicheldrüse - ein nützliches Modell zur Untersuchung klonaler Heterogenität und EMT-Subtypverschiebung.....</i>	<i>19</i>
<b>3</b>	<b>Diskussion und Gesamtkonklusion .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Liste mit wissenschaftlichen Publikationen, Präsentationen, Postern und Preisen .....</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der Publikationen im Rahmen der kumulativen Dissertation .....</b>	<b>33</b>

# 1 Einleitung

Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von nur etwa 5-8% gehört das Pankreaskarzinom zu den malignen Krebsarten mit einer der schlechtesten Prognosen und stellt eine der Hauptursachen für krebsbedingte Todesfälle weltweit dar (1, 2). Bereits jetzt ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle bei gleichzeitig zunehmender Inzidenz. In den Vereinigten Staaten von Amerika wird angenommen, dass es bis 2030 die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache sein wird (3). Für Westeuropa zeigen sich mit einer Inzidenz von 7,3/100.000 und einer Mortalität von 6,8/100.000 Einwohnern sehr ähnliche Zahlen wie in Nordamerika (4).

Mit einem Anteil von mehr als 85% stellt das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC) den häufigsten histologischen Subtyp der malignen Pankreastumoren dar (5). Derzeit ist die chirurgische Resektion die einzige kurative Behandlungsoption, doch auf Grund der zum Diagnosezeitpunkt bereits häufig fortgeschrittenen Tumorerkrankung stellen sich nur etwa 20 % der Patienten mit einem resektablen Tumorstadium und 30-40% mit einem borderline resektablen Tumorstadium vor (6). Borderline bzw. grenzwertig resektable Tumore sind hierbei als technisch resektable Tumore mit einem hohen Risiko eines positiven Resektionsrandes definiert (7). Insbesondere Patienten mit einem borderline resektablen Tumor scheinen durch eine neoadjuvante Chemotherapie ein besseres onkologisches Ergebnis zu erreichen (8, 9).

Auch wenn die chirurgische Resektion bis heute die einzige kurative Behandlungsoption darstellt, nimmt die Chemotherapie eine zentrale Rolle bei der multimodalen Behandlung dieser Tumorentität ein. Eine adjuvante Chemotherapie verlängert nach einer makroskopischen Resektion (R0: keine Krebszellen innerhalb von 1 mm an allen Resektionsrändern oder R1: Krebszellen innerhalb von 1 mm an einem oder mehreren Resektionsrändern vorhanden) das mediane Gesamtüberleben der Patienten je nach Therapieschema um 35,0 (Gemcitabin) bzw. 54,4 (mFOLFIRINOX) Monate (10). Im metastasierten Stadium liegt der Überlebensvorteil ebenfalls bei einer Kombinationstherapie durch FOLFIRINOX mit einem mittleren Gesamtüberleben von 11,1 Monaten im Vergleich zu 6,8 Monaten unter einer Monotherapie mit Gemcitabin (11). Die individuelle Tumorbiologie spielt bei der Auswahl des Chemotherapieregimes bisher jedoch keine Rolle, sondern vielmehr richtet sich die Auswahl der Therapie nach der körperlichen Belastbarkeit des Patienten (12). Eine gezielte Behandlungsmöglichkeit für

Patienten, die derzeit auf kein verwendetes Behandlungsschema ansprechen, existiert in der klinischen Praxis bisher nicht. Die Identifizierung von Biomarkern, die das Ansprechen auf eine Behandlung vorhersagen oder gar eine personalisierte Therapie ermöglichen, könnte bei dieser aggressiven Tumorentität entscheidend dazu beitragen, die bisher sehr schlechte Prognose zu verbessern.

Mehrere Arbeiten konnten durch die Identifizierung molekularer Signaturen zeigen, dass sich PDACs in ihrer Tumorbilogie zum Teil deutlich unterscheiden und anhand dieser Signaturen in unterschiedliche molekulare Subtypen unterteilt werden können (13, 14, 15). Die hierbei mit am häufigsten genutzte Klassifikation zur Einteilung der so genannten intertumoralen Heterogenität entspricht der Einteilung in einen klassischen und einen basal-ähnlichen Subtyp von Moffit et al. (14). Eine weitere häufig genutzte Klassifikation entspricht der Einteilung in einen epithelial-ähnlichen (entspricht weitestgehend dem klassischen Subtyp) und einen mesenchymal-ähnlichen Typ (entspricht weitestgehend dem basal-ähnlichen Subtyp) (16). Die klinische Bedeutung dieser differenzierten Betrachtungsweise ergibt sich aus der Korrelation zwischen dem molekularen Subtyp und dem Gesamtüberleben der Patienten. Es zeigen sich darüber hinaus Zusammenhänge zwischen molekularem Subtyp des Tumors und Therapieresistenzen beziehungsweise Sensitivitäten gegenüber bestimmten Chemotherapeutika sowie unterschiedlich aggressive Wachstumsverhalten (17). Umfassende Arbeiten zu genomischen, transkriptomischen und proteomischen Signaturen könnten Patientengruppen identifizieren, welche für eine mögliche gezielte Therapie in Frage kämen. Mehr als 90 % der PDACs weisen eine *KRAS*-Mutation auf, und 60 % der *KRAS*-Wildtyp-Tumore tragen alternative Veränderungen, die den *RAS-MAPK*-Signalweg aktivieren (18). Weitere häufige Mutationen liegen im Bereich der DNA-Reparaturgene wie *BRCA2*, *PALB2* und *ATM*, welche potentiell sensibler gegenüber platinhaltiger Chemotherapien oder PARP Inhibitoren sein könnten (18). Bei Patienten mit metastasiertem Bauchspeicheldrüsenkrebs und einer Keimbahnmutation von *BRCA* konnte bei einer Behandlung mit Olaparib bereits ein längeres progressionsfreies Überleben im Vergleich zum Placebo gezeigt werden (19). Genomverluste von *CDKN2A* (Genprodukt ist der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p16INK4) und *DPC4* (kodiert für SMAD4, welcher eine wesentliche Rolle in der Signalübertragung des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) einnimmt) in Krebszellen können wiederum mit einem veränderten Ansprechen auf Gemcitabin oder 5-FU in Verbindung gebracht werden (20, 21, 22).

Neben der oben beschriebenen intertumoralen Heterogenität ist in den letzten Jahren die intratumorale Heterogenität (ITH) als entscheidender Faktor für Tumorbiologie, Therapieansprechen und letztlich das Patientenüberleben deutlicher in den Fokus gerückt (23). Auf der Ebene einzelner Zellen wurde deutlich, dass Tumorzellen verschiedener molekularer Subtypen nebeneinander koexistieren und in ihrer Gesamtheit das Expressionsprofil des Tumors ausmachen. Daraus lässt sich ableiten, dass die genomischen und transkriptomischen Profile durch ein Kontinuum von Genexpressionen bestimmt werden, die aus einer Mischung von Unterpopulationen innerhalb eines Pankreaskarzinoms stammen (17, 24). Die genomische Instabilität der Tumorzellen wird als ein Treiber der ITH diskutiert, denn durch diese kommt es zu Anhäufung genetischer Veränderungen (25). Die ITH spiegelt sich auf zellulärer Ebene als Ergebnis der Akkumulation genetischer, epigenetischer und metabolischer Veränderungen mit einem hohen Maß an Plastizität wider (26, 27). Eine solche Plastizität drückt sich unter anderem in der Reaktivierung des epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT) aus. EMT gilt bei einer Vielzahl von Tumoren als frühes Ereignis in der Entwicklung zu maligne entarteten Zellen. Neben einer Tumorprogression führt dies ebenfalls zu Therapieresistenzen, Metastasierungsneigung und invasiverem Wachstumsverhalten (28, 29, 30).

Wenngleich die meisten der angehäuften Mutationen zunächst keinen Überlebensvorteil für einzelne Subklone bedeuten (31), können diese dennoch zu unterschiedlichen intrinsischen Resistenzprofilen gegenüber Chemotherapeutika oder anderen externen Veränderungen führen (32). Wird die funktionelle Hierarchie der Tumorphilipulation in Folge externer Veränderungen (wie zum Beispiel einer medikamentösen Therapie) aus dem Gleichgewicht gebracht, kann sich für bestimmte Subklone ein Überlebensvorteil ergeben. Ein solcher Überlebensvorteil, von bereits vor Therapiebeginn existierender Subklone, kann letztlich zu einem Therapieversagen und schließlich dem klinischen Bild eines Tumorrezidivs führen (33).

Zusammengefasst beeinflussen sowohl die intertumorale als auch die intratumorale Heterogenität das biologische Verhalten der Tumore. Primäre Zelllinien, etablierte Zelllinien und aus einzelnen Zellen gewonnene Zelllinien können hierbei wertvolle Informationen über den Genotyp und Phänotyp einzelner Tumore liefern. Die Entschlüsselung der molekularen Profile und kombinierte Betrachtungen mit Resistenzverhalten gegenüber Behandlungstherapien, Wachstumsverhalten und weiterer

funktioneller Eigenschaften ermöglichen es, ein tieferes Verständnis der Tumorbilogie zu gewinnen und könnten somit dazu beitragen, neue klinische Behandlungsstrategien für den Bauchspeicheldrüsenkrebs zu entwickeln.

## 1.1 Übersicht Publikationen der kumulativen Promotion

1. Etablierung und molekulare Charakterisierung von zwei aus Patienten gewonnenen Zelllinien des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse als präklinische Modelle für das Ansprechen auf eine Behandlung  
Braun R, Lapshyna O, Watzelt J, Drenckhan M, Künstner A, **Färber B**, u. a. Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response. *Cells*. 11. Februar 2023;12(4):587.
2. Molekulares Profiling und spezifisches Targeting von Gemcitabin-resistenten Subklonen in heterogenen Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellpopulationen  
**Färber B**, Lapshyna O, Künstner A, Kohl M, Sauer T, Bichmann K, u. a. Molecular profiling and specific targeting of gemcitabine-resistant subclones in heterogeneous pancreatic cancer cell populations. *Front Oncol*. 2023;13:1230382.
3. Die quasimesenchymale duktales Epithelzelllinie PANC-1 der Bauchspeicheldrüse - ein nützliches Modell zur Untersuchung klonaler Heterogenität und EMT-Subtypverschiebung  
Ungefroren H, Thürling I †, **Färber B †**, Kowalke T, Fischer T, De Assis LVM, u. a. The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1-A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting. *Cancers*. 19. April 2022;14(9):2057.

## 2 Ergebnisse

### 2.2 Etablierung und molekulare Charakterisierung von zwei aus Patienten abgeleiteten, primären Zelllinien des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse

Braun R, Lapshyna O, Watzelt J, Drenckhan M, Künstner A, Färber B, u. a. Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response. *Cells*. 11. Februar 2023;12(4):587.

In dieser Arbeit wurden zwei neue primäre Zelllinien, die von Patienten aus chirurgischen Proben aus einem duktales Adenokarzinom des Pankreas gewonnen wurden, etabliert und anhand ihres molekularen Phänotyps, funktioneller Eigenschaften und klinischer Annotationen charakterisiert. Auf diese Weise sollte ein präklinisches *ex vivo* Modell erstellt werden, welches die Möglichkeit bietet, neue Behandlungsstrategien zu erforschen und somit ultimativ bei der Entwicklung personalisierter (gezielter) Therapieschemata zu helfen.

Das Tumorgewebe wurde direkt nach der chirurgischen Resektion entnommen und nach einem standardisierten Protokoll aufbereitet. Nach Erreichen eines stabilen Wachstums der kultivierten Zellen aus der Probe, wurden die Fibroblasten durch einen immunomagnetischen Assay auf Grundlage von Fibroblasten-spezifischen Antigenen entfernt. Die etablierten reinen Tumorzelllinien wurden durch STR-Genotypisierung für 21 Loci authentifiziert, um zu bestätigen, dass beide Zelllinien neu und nicht durch Kontamination bereits etablierter Zelllinien entstanden waren. Eine Mykoplasmen-Kontamination wurde ausgeschlossen.

LuPanc-1-Zellen wurden aus einem Pankreaskarzinom eines 64-jährigen männlichen Patienten, der sich mit einem lokal fortgeschrittenen Karzinom des Pankreasschwanzes mit Infiltration des Magens vorstellte, abgeleitet. Die histopathologische Beurteilung des resezierten Tumors ergab ein mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas (TNM-Klassifikation: pT3, N1, L1, V1, Pn1, R0, G2). Der Patient erhielt eine adjuvante Chemotherapie mit einer reduzierten Dosis FOLFIRINOX und entwickelte nach 9 Monaten ein Lokalrezidiv. LuPanc-2-Zellen wurden aus einem lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom einer 63-jährigen weiblichen Patientin gewonnen. Die Patientin stellte sich mit einem Karzinom im Pankreaskorpus vor, der die Pfortader und den Truncus

coeliacus lokal infiltrierte. Die histopathologische Beurteilung des resezierten Tumors ergab ein schlecht differenziertes duktales Adenokarzinom des Pankreas (TNM-Klassifikation: pT3, N2, L1, V1, Pn1, R0, G3). Unter Chemotherapie mit FOLFIRINOX entwickelte die Patientin nach 8 Monaten ein Lokalrezidiv.

Zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Verdopplungszeiten der beiden Zelllinien bestimmt. Die LuPanc-1-Zellen zeigten eine Populationsverdopplungszeit von 44 Stunden, während LuPanc-2-Zellen eine wesentlich langsamere Populationsverdopplungszeit von 84 Stunden aufwiesen.

Die Aggressivität von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen steht in Zusammenhang mit dem Erwerb mesenchymaler/ basal-ähnlicher Eigenschaften. Die Proteingehalte von E-Cadherin und Vimentin wurden mittels Western Blotting bestimmt, um die Zellen einer eher epithelialen oder mesenchymalen Differenzierung zuzuordnen. Beide Zelllinien wiesen eine typische epitheliale Morphologie auf und exprimierten mäßige Mengen an CK7 und E-Cadherin. Interessanterweise exprimierten LuPanc-1-Zellen sowohl E-Cadherin als auch Vimentin, während LuPanc-2-Zellen ähnliche Mengen an E-Cadherin aufwiesen, jedoch keine nachweisbaren Mengen an Vimentin. Im Vergleich mit permanenten Zelllinien, die entweder dem mesenchymal-ähnlichen Subtyp (mit einer hohen Vimentin-Expression, aber nur geringen oder nicht nachweisbaren E-Cadherin-Expression) oder dem epithelial-ähnlichen Subtyp (mit starker E-Cadherin-, aber keiner Vimentin-Expression) entsprechen, wurde deutlich, dass die LuPanc-1-Zellen keinem dieser extremen Phänotypen zuzuordnen sind. Durch eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und Vimentin in LuPanc-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass einzelne LuPanc-1-Zellen beide Proteine gleichzeitig exprimierten, sich aber auch in ihrem Verhältnis von E-Cadherin- und Vimentin-Expression unterschieden. Diese Beobachtung wurde anschließend durch Einzelzell-abgeleitete, klonale Kulturen dieser Zelllinie bestätigt.

Beide Zelllinien wurden mittels Exom-Sequenzierung (*Whole Exome Sequenzierung*, WES) genomisch charakterisiert. Insbesondere wurden die Genloci für *KRAS*, *DPC4*, *RNF43*, *ARID1A*, *TGFBR2*, *GNAS*, *RREB1* und *PBRM1*, die vom Cancer Genome Atlas Research Network als häufig mutiert in PDACs beschrieben wurden, analysiert. LuPanc-1 hatte eine Missense-Mutation (p.R282W) und LuPanc-2 hatte eine Frameshift-Deletion (p.P89X) in *TP53*. *BRCA2* hatte eine Nonsense-Mutation (p.Q780\*) und *CREBBP* eine Missense-Mutation (p.P279R) in LuPanc-1. *CDKN2A* war in LuPanc-2 mutiert (p.H83Y). Ausschließlich LuPanc-2 wies eine teilweise oder vollständige Deletion von *DPC4* auf. Analysen der

Kopienzahlvariationen (CNV) dieser Gene stellten jedoch in beiden Zelllinien den Verlust von *KRAS*, *BRCA2*, *CDKN2A* und *DPC4* sowie Gewinne von *RNF43*, *GNAS* und *PBRM1* fest.

Die Mutationssignaturen und insbesondere das Vorhandensein von mutiertem *KRAS* ließen darauf schließen, dass beide Zelllinien einen transformierten Phänotyp aufwiesen. Um dies funktionell zu untersuchen, wurde die Fähigkeit von Krebszellen ausgenutzt, aus Einzelzellen dreidimensionale Kolonien (Sphäroide) zu bilden, wenn sie in einem halbfesten Medium kultiviert werden. Wie erwartet bildeten beide Zelllinien eine große Anzahl von Sphäroiden in Weichagar und Matrigel, wobei LuPanc-2-Zellen wesentlich mehr Sphäroide bildeten als LuPanc-1-Zellen.

Die TGF- $\beta$ -Signalübertragung spielt während der Krebsentstehung eine antagonistische Rolle, indem sie zunächst das Epithelwachstum hemmt und später das Voranschreiten fortgeschrittener Tumore fördert, d. h. die Migration/ Invasion stimuliert, so dass sie eine doppelte Rolle als Tumorsuppressor und -promotor einnimmt. Zellen beider Zelllinien wurden mit rekombinanten humanem (rh)TGF-  $\beta$ 1 stimuliert und sowohl für LuPanc-1 als auch für LuPanc-2 konnte eine Aktivierung des Rezeptor-gesteuerten Smad-Protein, SMAD2, gezeigt werden. Dies deutete somit auf das Vorhandensein einer funktionellen TGF- $\beta$  Rezeptor-Signalisierung in beiden Zelllinien hin. Entsprechende Veränderungen in der Genexpression konnten hingegen nur in LuPanc-1 Zellen in Form von einer Hochregulation von *SERPINE1* (kodiert für Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1, PAI-1), *SNAI2* (kodiert für SNAIL2/SLUG) bzw. *SOX2* festgestellt werden. Die Tatsache, dass die LuPanc-2-Zellen nicht auf die Behandlung mit (rh)TGF- $\beta$ 1 reagierten, konnte auf das Fehlen des gemeinsamen Mediators Smad, SMAD4, zurückgeführt werden.

Die Untersuchungen der Zellmigrationsaktivität zeigten, dass LuPanc-1 eine hohe Migrationsaktivität besaß. LuPanc-2 zeigte hingegen eine sehr geringe Aktivität in der Migration. In Einklang mit den Ergebnissen zur TGF- $\beta$  Signalübertragung konnte die Migrationsaktivität in LuPanc-1 durch eine Stimulierung mit (rh)TGF-  $\beta$ 1 erhöht werden, während in LuPanc-2 Zellen keine erhöhte migratorische Aktivität durch eine Stimulierung mit (rh)TGF-  $\beta$ 1 induziert werden konnte.

Abschließend wurde die Empfindlichkeit der beiden Zelllinien für eine Gemcitabin-Monotherapie und eine Therapie mit dem Kombinationsschema FOLFIRINOX getestet, indem die jeweilige halbmaximale Hemmkonzentration bestimmt wurden. Der IC<sub>50</sub> für Gemcitabin betrug 13,6 nM (IC<sub>90</sub> von 50,5 nM) für LuPanc-1 und 357,1 nM für LuPanc-2 (IC<sub>90</sub> von 2812 nM). Der IC<sub>50</sub>-Wert für FOLFIRINOX (als Konzentration von 5-FU in

FOLFIRINOX) betrug 573,8 nM ( $IC_{90}$  von 5659 nM) für LuPanc-1. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve der LuPanc2-Zellen für FOLFIRINOX ließ keine Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes bzw. des  $IC_{90}$  Wertes zu.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für beide von Patienten abgeleitete Zelllinien unterschiedliche molekulare Phänotypen charakterisiert werden konnten, die ihre individuelle Tumorbilogie widerspiegeln. Diese molekularen Unterschiede wurden kombiniert mit klinischen Annotationen der jeweiligen Patienten betrachtet. Ein solches präklinisches *Ex-vivo*-Modell kann in Zukunft auf weitere potenzielle neue Behandlungsstrategien untersucht werden und somit bei der Entwicklung personalisierter (gezielter) Therapieschemata helfen.

## 2.3 Molekulares Profiling und spezifisches Targeting von Gemcitabin-resistenten Subklonen in heterogenen Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellpopulationen

Färber B, Lapshyna O, Künstner A, Kohl M, Sauer T, Bichmann K, u. a. Molecular profiling and specific targeting of gemcitabine-resistant subclones in heterogeneous pancreatic cancer cell populations. *Front Oncol.* 2023;13:1230382.

Ziel dieser Arbeit war es, mit dem Modellsystem der Einzelzelllinien (*Single Cell-derived Cell Lines*, SCDCLs) Gemcitabin-resistente Subklone innerhalb einer Tumorgesamtpopulation zu identifizieren. Durch eine molekulare Profilerstellung der Subklone sollten spezifische Signalwege und Proteinsignaturen identifiziert werden, welche mit einem resistenteren bzw. sensitiveren Verhalten gegenüber der Therapie mit Gemcitabin assoziiert sind. Die molekularen Unterschiede sollten anschließend genutzt werden, um eine gezieltere Therapie der Gemcitabin-resistenten Subklone des heterogenen Tumors durchzuführen.

Für diesen Ansatz wurden zwei etablierte, permanente duktale Adenokarzinom Zelllinien des Pankreas, die klassisch differenzierte Zelllinie BxPC3 und die basal-ähnlich differenzierte Zelllinie Panc-1, ausgewählt. Beide Zelllinien wurden durch STR-Genotypisierung authentifiziert und Kreuzkontaminationen mit anderen Zelllinien somit ausgeschlossen. Eine Mykoplasmen-Kontamination wurde mit einem PCR-basierten Test ebenfalls bei beiden Zelllinien ausgeschlossen. Aus den parentalen Zellpopulationen der klassisch differenzierten Zelllinie BxPC3 und der basal-ähnlich differenzierten Zelllinie Panc-1 wurden anschließend durch limitierende Verdünnung SCDCLs hergestellt.

Die Zellmorphologien und das jeweilige Wachstumsverhalten der wachsenden Kolonien unterschieden sich zum Teil erheblich. Dies reichte von mehr spindelförmigen Zellen, was auf einen eher mesenchymaleren/ basal-ähnlichen Phänotyp hinweist, bis hin zu mehr quaderförmigen Zellen, was auf einen eher epithelialeren/ klassischen Phänotyp hindeutet. Neben morphologischen Unterschieden der SCDCLs unterschied sich die Zeitspanne bis zur 80-prozentigen Konfluenz in einer 6-Well-Kulturplatte nach Einzelzellsortierung deutlich. Unter den SCDCLs von BxPC3 erreichte der erste Subklon die Konfluenz nach 32 und der letzte nach 62 Tagen. Die Zeit bis zur Konfluenz der SCDCLs von Panc-1 reichte von 30 bis 48 Tagen.

Um das individuelle Ansprechen der SCDCLs auf Gemcitabin *in vitro* zu bestimmen, wurden für beide parentale Tumorpotionen Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Anhand dieser wurde die jeweilige halb-maximale-Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) und eine Konzentration

nahe der maximalen Hemmung ( $IC_{max}$ ) bestimmt. Im Anschluss wurden sämtliche SCDCLs mit dem zuvor bestimmten  $IC_{50}$  bzw.  $IC_{max}$  ihrer parentalen Tumorphosphonpopulation therapiert. Die SCDCLs beider Zelllinien zeigten ein heterogenes Ansprechen auf die Therapie mit Gemcitabin, wobei die SCDCLs von BxPC3 hierbei deutlich variabler reagierten. Der resistenteste SCDCL von BxPC3 (B2D9) zeigte unter Therapie mit dem  $IC_{50}$  der parentalen Population eine Überlebensrate von 0,67 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während der sensitivste SCDCL von BxPC3 (B3C10) lediglich eine Überlebensrate von 0,29 aufwies ( $p < 0.009$ ). Bei Behandlung mit der  $IC_{50}$  der parentalen Zellpopulation von Panc-1 erreichte der resistenteste SCDCL von Panc-1 (P4E2) eine Überlebensrate von 0,8 und der sensitivste SCDCL von Panc-1 (P4B9) eine Überlebensrate von 0,66 ( $p < 0.006$ ). Zwischen den jeweiligen Extremen bildeten sowohl die SCDCLs von BxPC3 als auch von Panc-1 ein Kontinuum an Ansprechraten. Für die Ansprechraten bei der Behandlung mit der  $IC_{max}$  zeigte sich für beide Zelllinien ein ebenfalls heterogenes Ansprechen, vergleichbar mit der Therapie mit  $IC_{50}$ . Die Ansprechraten auf die  $IC_{50}$  und  $IC_{max}$  tendierten für beide Zelllinien zu einer Korrelation (SCDCLs von BxPC3:  $r = 0.4828$ ;  $p < 0.0001$ ; SCDCLs von Panc1  $r = 0.3089$ ;  $p = 0.0001$ ). Für die empfindlichsten und resistentesten SCDCLs der beiden parentalen Zelllinien wurden anschließend vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und es konnte gezeigt werden, dass die zuvor unterschiedlichen Ansprechraten gegenüber der Gemcitabin-Therapie nicht auf einzelne Konzentration beschränkt, sondern vielmehr über größere Konzentrationsbereiche hinweg bestanden.

Im Weiteren wurden mögliche Korrelationen zwischen Proliferationsverhalten und Ansprechraten auf eine Gemcitabin Behandlung untersucht. Für beide Zelllinien konnte kein klarer Zusammenhang zwischen der Zeit bis zur Konfluenz und dem Ansprechen auf die Behandlung beobachtet werden. Untersuchungen zu den Verdopplungszeiten ergaben zwischen dem resistentesten SCDCL von BxPC3 (B2D9: DT= 44,27h; CI95%: 41,29h bis 47,72h) und dem sensitivsten SCDCL von BxPC3 (B3C10: DT= 29,28h; CI95%: 26,99h bis 32h) signifikante Unterschiede. Im Vergleich zu dem zweit- und drittresistentesten SCDCL von BxPC3 zeigte der sensitivste SCDCL jedoch keine signifikant schnellere Verdopplungszeit mehr. Zwischen dem resistentesten und sensitivsten SCDCL von Panc-1 wurde kein signifikanter Unterschied in der Verdopplungszeit gemessen.

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Behandlungsphänotypen der SCDCLs mit einer transkriptomischen Heterogenität zusammenhängen, wurde eine mRNA-Sequenzierung aller 12 SCDCLs von BxPC3 und aller 14 SCDCLs von Panc-1 durchgeführt. In einer „Principle

Component Analyse“ der 1000 variabelsten Gene zeigten die SCDCLs beider Zelllinien eine Clusterung, die mit der Einteilung anhand der Empfindlichkeit gegenüber Gemcitabin gute Übereinstimmungen zeigte. In supervidierten Analysen entsprechend einer Stratifizierung anhand der Ansprechrate auf die  $IC_{50}$  bzw.  $IC_{max}$  ergaben sich für die SCDCLs von BxPC3 159 bzw. 753 differentiell exprimierte Gene. In Übereinstimmung mit einer geringeren Heterogenität in Bezug auf das Ansprechen auf die Gemcitabin-Therapie zeigten die SCDCLs von Panc-1 mit 98 bzw. 149 differentiell regulierten Genen eine ebenfalls geringere transkriptomische Heterogenität. Durch weiterführende „Gene-Set-Enrichment-Analysen“ wurden differentiell regulierte Signalwege identifiziert, welche mit einem resistenteren bzw. sensibleren Verhalten gegenüber Gemcitabin assoziiert waren. Unter den SCDCLs von BxPC3 korrelierten insbesondere die Signalwege EMT, TNF Signaling via NfKB und IL2STAT5 mit einem resistenteren Verhalten gegenüber Gemcitabin. Mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie waren hingegen Signalwege wie MYC-Ziele v1, MYC-Ziele v2 sowie E2F-Ziele assoziiert. Gegensätzlich hierzu waren genau diese Signalwege (MYC-Ziele v1, MYC-Ziele v2 sowie E2F-Ziele) in den SCDCLs von Panc-1 mit einem resistenteren Verhalten gegenüber Gemcitabin assoziiert.

Um ein umfassenderes Verständnis der biologischen Prozesse zu erlangen, die mit der Heterogenität der SCDCLs einhergehen, wurden die transkriptomischen Analysen durch eine Betrachtung der Proteinexpression erweitert. Mit Hilfe des „Random-Forrest-Ansatzes“ wurden Proteinsignaturen extrahiert, die mit dem Ansprechen jedes einzelnen SCDCL von BxPC3 oder Panc-1 auf Gemcitabin in Verbindung standen. Für BxPC3 wurden auf diese Weise 50 Proteine identifiziert, die mit dem heterogenen Ansprechen auf Gemcitabin assoziiert waren. Von diesen Proteinen zeigten 21 einen Zusammenhang mit einem schlechteren Ansprechen und 29 einen Zusammenhang mit einem besseren Ansprechen. Für Panc-1 wurden 18 Proteine identifiziert. Von diesen zeigten sechs eine Assoziation zu einem schlechteren Ansprechen und zwölf Proteine eine Assoziation mit einem besseren Ansprechen. Die größte Assoziation mit einem schlechten Therapieansprechen zeigte für die SCDCLs von BxPC3 das Protein TNF-Rezeptor-Superfamilie 6b (TNFRSF6B) und für die SCDCLs von Panc-1 der autokrine Motilitätsfaktor-Rezeptor (AMFR).

Eine kombinierte Betrachtung der Transkriptomanalysen sowie der Proteinsignaturen ließ die Vermutung zu, dass die Gemcitabin-resistenten SCDCLs beider Zelllinien gezielter durch einen Inhibitor der BET („bromodomain and extraterminal domain“) - Proteine therapiert

werden könnten. Daher wurde die spezifische antiproliferative Wirkung von JQ1, der ein wirksamer Inhibitor für BET-Proteine ist, in dem SCDCL-Modellsystem getestet. Bei BxPC3 reagierte der Gemcitabin-resistenteste SCDCL B2D9 wesentlich empfindlicher auf die Behandlung mit JQ1 ( $IC_{50}$ : 48,36 nM; CI95%: 27,68 - 84,48 nM) als der Gemcitabin-empfindlichste SCDCL B3C10 ( $IC_{50}$ : 95,63 nM CI95%: 73,16 - 125 nM). Der Gemcitabin-resistenteste SCDCL von Panc-1 war ebenfalls empfindlicher im Vergleich zum Gemcitabin-empfindlichsten SCDCL P4B9, wenn diese mit JQ1 behandelt wurden (P4E2:  $IC_{50}$ : 471,8 nM CI95%: 338,4 - 658 nM; P4B9:  $IC_{50}$ : 1590 nM CI95%: 667 - 3791 nM).

Durch das Modellsystem der SCDCLs konnte diese Arbeit Gemcitabin-resistente Subklone innerhalb einer heterogenen parentalen Tumorphilpopulation identifizieren. Die SCDCLs wurden funktionell und molekular umfassend charakterisiert. Die identifizierten Klon-spezifischen Signalwege und Proteinsignaturen ergaben Möglichkeiten, neben Erklärungen für das heterogene Ansprechen auf Gemcitabin, zusätzlich eine gezieltere Therapie der Gemcitabin-resistenten Subklone zu etablieren. Dieses Modell verdeutlicht, dass unter Berücksichtigung der intratumoralen Heterogenität, Pankreaskarzinome potenziell auch *in vivo* gezielter therapiert werden können.

## 2.4 Die quasimesenchymale duktale Epithelzelllinie PANC-1 der Bauchspeicheldrüse - ein nützliches Modell zur Untersuchung klonaler Heterogenität und EMT-Subtypverschiebung

Ungefroren H, Thürling I †, **Färber B †**, Kowalke T, Fischer T, De Assis LVM, u. a. The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1-A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting. *Cancers*. 19. April 2022;14(9):2057.

Ziel der Arbeit war es, mit unserem Modellsystem der SCDCs die Epithelial-Mesenchymale-Plastizität (EMP) in dukталen Adenokarzinom Zellen des Pankreas zu untersuchen. Das Phänomen der intratumoralen Heterogenität wird von der EMP angetrieben, die zwei Entwicklungsprogramme umfasst. Zum einen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), bei denen Epithelzellen in invasive mesenchymale Zellen umgewandelt werden und zum anderen - den umgekehrten Prozess - die mesenchymale-epitheliale Transition (MET), die ein metastatisches Wachstum an entfernten Orten ermöglicht.

Für diesen Ansatz wurden zwei etablierte permanente duktale Adenokarzinom Zelllinien des Pankreas ausgewählt; die basal-ähnlich differenzierte Zelllinie Panc-1 und die klassisch differenzierte Zelllinie BxPC3. Beide Zelllinien wurden durch STR-Genotypisierung authentifiziert und Kreuzkontaminationen anderer Zelllinien somit ausgeschlossen. Eine Mykoplasmen-Kontamination wurde mit einem PCR-basierten Test ebenfalls ausgeschlossen. Aus den parentalen Zellpopulationen der basal-ähnlich differenzierten Zelllinie Panc-1 und der klassisch differenzierten Zelllinie BxPC3 wurden durch limitierende Verdünnung Einzelzelllinien (SCDCs) hergestellt. Sechs SCDCs der Zelllinie Panc-1 und fünf SCDCs der Zelllinie BxPC3 wurden im Folgenden genauer untersucht.

Die abgeleiteten Einzelzellklone wurden mikroskopisch untersucht und die Expression von EMT-Markern mittels Immunoblots analysiert. Die Panc-1-Klone zeigten deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie und im Wachstumsmuster, während die BxPC3-Klone vergleichsweise geringere sichtbare Unterschiede aufwiesen. Die Expression von E-Cadherin zu Vimentin variierte erheblich zwischen den Panc-1-Klonen. Passend zu heterogenen Subpopulationen zeigten sich sehr unterschiedliche Verhältnisse von E-Cadherin zu Vimentin. Betrachtet wurden ebenfalls die beiden kleinen GTPasen RAC1 und RAC1b, welche eine Rolle bei der EMP spielen. Das Verhältnis RAC1b zu RAC1 entsprach weitgehend dem zuvor gemessenen Verhältnis von E-Cadherin zu Vimentin. Bei den fünf

SCDCLs von BxPC-3 wurden geringe Unterschiede in der Expression von E-Cadherin festgestellt, und das Vimentin-Protein war in diesen Zellen kaum nachweisbar. Die Stabilität des Phänotyps, der aus einzelnen Zellen gewonnenen Klone, wurde durch eine erneute Erzeugung von Subklonen aus den SCDCLs überprüft. Anschließend erfolgte ein Vergleich ihrer Morphologie und EMT-Markereexpression. Diese Versuche zeigten, dass der Phänotyp der Klone stabil war und sich keine gemischte E/M-Population wie bei den parental Kulturen bildeten. Neben unterschiedlichen E-Cadherin zu Vimentin und RAC1b zu RAC1 Verhältnissen, wiesen die SCDCLs von Panc-1 ebenfalls Unterschiede in der Expression des neuroendokrinen Markers Synaptophysin (SYP) auf. Auf der Grundlage der Zellmorphologie und der Expression von EMT-Markern wurden die Klone in der Folge als mesenchymal, epithelial oder epithelial/ mesenchymal klassifiziert.

Anschließend wurden die SCDCLs beider Zelllinien auf ihre Heterogenität im Hinblick auf ihr invasives Potenzial mittels eines Echtzeit-Migrationsassays untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass diese sich in ihrer basalen Migrationsaktivität stark unterschieden. Klone mit hoher Migrationsaktivität wiesen niedrige E-Cadherin zu Vimentin Verhältnisse und ein niedrigeres RAC1b zu RAC1-Verhältnis auf. Die SCDCLs von BxPC3 zeigten, im Einklang mit den geringen Unterschieden der E-Cadherin zu Vimentin Expression, eine deutlich einheitlichere migratorische Aktivität.

Das Stammzellpotenzial von zwei Panc-1-Klonen wurde genauer betrachtet, indem ein Koloniebildungstest durchgeführt wurde. Der migratorisch aktivste SCDCL (P1C3) bildete 8,4-mal mehr Kolonien als der migratorisch am wenigsten aktivste SCDCL (P4B11). Die SCDCLs von Panc-1 wiesen somit starke Variationen im zellulären Phänotyp, die mit Invasion und Metastasierung in Zusammenhang stehen, auf. Die *in vitro* als mesenchymal klassifizierten Klone wiesen einen maligneren Phänotyp auf im Vergleich zu den als epithelial klassifizierten Klonen.

In einem nächsten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen der phänotypischen Heterogenität und die zelluläre Reaktion auf die Stimulation durch Wachstumsfaktoren, angesichts seiner starken EMT fördernden Funktion, insbesondere den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)  $\beta$ , betrachtet. Zunächst wurde quantitativ die Viabilität der Zellen, die die Wachstumsregulierung widerspiegelt, als Reaktion auf TGF $\beta$ 1 mit einem Resazurin basierten Assay bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen SCDCLs von Panc-1 unterschiedlich auf TGF $\beta$ 1-Stimulation reagierten. Ein Teil der SCDCLs reagierte mit einer Wachstumsinhibition, andere mit einem refraktären und ein SCDCL sogar mit einem

stimulierten Wachstumsverhalten. Zur genaueren Wirkung auf die proliferative Aktivität wurden Zellzählungstests ergänzt. Während die parentale Population von Panc-1 auf TGF $\beta$ 1-Stimulation mit einer Wachstumshemmung reagierte, reagierten die SCDCLs im Wesentlichen wie in den oben beschriebenen Resazurin basierten Tests.

Anschließend wurde die Expression von TGF $\beta$ -Zielgenen quantifiziert und in Einklang mit den vorherigen Ergebnissen eine klonale Heterogenität in der Reaktion auf TGF $\beta$ 1-Stimulation festgestellt. Die klonale Heterogenität der SCDCLs von Panc-1 beeinflusste somit die Empfindlichkeit gegenüber TGF $\beta$ 1 in Bezug auf die proliferative Aktivität und die Regulierung von Genen, die an EMT und Invasion beteiligt sind.

Nachdem kürzlich gezeigt wurde, dass (parentale) Panc-1 Zellen mit einem Cocktail aus drei proinflammatorischen Zytokinen, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (IIT), zur Aktivierung eines Transkriptionsprogramms für die duktale bis endokrine Transdifferenzierung (deTdtP) angeregt werden konnten, wurde untersucht, ob diese Fähigkeit vom EMT-Phänotyp abhängt. Einzelne SCDCLs von Panc-1-Zellen zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Fähigkeit, die Expression von Insulin oder Neurogenin-3 nach Aktivierung des deTdtP zu induzieren. Die Analyse der zirkadianen Rhythmik in den Zellen zeigte zwar klonabhängige Unterschiede, jedoch war keine Assoziation mit den EMT-Phänotypen festzustellen.

Die Arbeit zeigte, dass Panc-1-Zellen in verschiedenen Phänotypen in einer Gesamtpopulation co-existieren und dynamische Verschiebungen durch äußere Einflüsse erfahren können. Eine TGF $\beta$ 1-Behandlung induzierte in der parentalen Panc-1 Population eine mesenchymale Verschiebung, die sich in einer spindelförmigen Morphologie, einer Herabregulierung epithelialer Marker, einer Hochregulierung mesenchymaler Marker und einer erhöhten invasiven Aktivität zeigte. Alle sechs getesteten SCDCLs von Panc-1 waren ebenfalls TGF $\beta$ -empfindlich und zeigten jeweils mindestens eine zelluläre Reaktion entsprechend der parentalen Population auf TGF $\beta$ -Stimulation.

Eine Behandlung der parentalen Panc-1 Population mit IIT führte zu einem Differenzierungsprozess, der Zellen hervorbrachte, die Vorläuferzellen der Bauchspeicheldrüsenvorläufer/  $\beta$ -Zellen ähnelten. Da diese Zellen von Natur aus epithelial sind, deutete dies darauf hin, dass durch eine Behandlung mit IIT ein MET-ähnliches Programm induziert werden konnte. Das MET-ähnliche Programm führte zu einer Herunterregulierung von EMT-Markern wie Vimentin, RAC1 und SNAIL und zur Hochregulierung von MET-Markern wie CK19, CDH1, GRHL2 und OVOL2. Ähnliche Beobachtungen konnten in der ebenfalls basal-ähnlich differenzierten Zelllinie MiaPaca-2

gemacht werden. Zusätzlich reduzierte sich durch IIT-Behandlung die invasive Aktivität der Panc-1-Zellen, was darauf hindeutete, dass der MET-ähnliche Prozess die Zellen weniger maligne machte. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine IIT-Behandlung in den Pankreaskrebszellen eine Differenzierung zum epithelial-ähnlicheren und weniger malignen Phänotyp induzierte.

Alternatives mRNA-Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus bei der Regulierung von EMT- und MET-Programmen, wobei TGF $\beta$ -Signale eine wichtige Rolle bei der Regulierung von gepaarten Spleiß-Varianten spielen, die entweder einen E- oder M-Phänotyp fördern. RAC1 und seine Spleiß-Isoform, RAC1b, stellen ein solches Paar dar, wobei RAC1 den M- und RAC1b den E-Zustand fördert. Die Herabregulierung von RAC1 in Panc-1 Zellen durch die IIT-Behandlung deutete darauf hin, dass RAC1 und/oder RAC1b der Regulation durch TGF $\beta$ 1 und/oder IIT unterlagen. Zur Validierung dieser Beobachtung wurde die RAC1b-Proteinkonzentration unter TGF $\beta$ 1-Behandlung in der parentalen Panc-1 Population bestimmt. Die RAC1b-Proteinkonzentration sank bei TGF $\beta$ 1-Behandlung ( $p < 0.05$ ), und die gleichzeitige Behandlung mit dem ALK5-Inhibitor SB431542 verhinderte diese Herabregulierung. Ein Dosis-Wirkungs-Assay zeigte, dass TGF $\beta$ 1-Konzentrationen von 0,5-5 ng/ml für eine robuste Herabregulierung erforderlich waren. Die Verwendung von Panc-1 Zellen mit einer stabilen ektopischen Expression einer HA-markierten Version von RAC1b wurden genutzt, um festzustellen, dass die Proteinstabilität von RAC1b durch TGF $\beta$ 1 nicht beeinträchtigt wurde. Dies deutete somit auf eine Regulierung auf mRNA-Ebene hin und wurde durch eine qPCR-Analyse bestätigt ( $p = 0.033$ ). Die proinflammatorische Zytokin Mischung IIT erhöhte die Proteinkonzentration von RAC1b und unterdrückte die Proteinkonzentration von RAC1. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass die unterschiedliche Ausrichtung von RAC1b durch TGF $\beta$ 1 und IIT für die Zunahme des M- oder E-Phänotyps entscheidend war.

Diese Arbeit konnte mithilfe der klonalen Einzelzellanalyse Zellen in der PDAC Zelllinie Panc-1 mit unterschiedlichen E/M-Phänotypen und funktionellen Eigenschaften identifizieren. Parentale Panc-1-Kulturen konnten *in vitro* dazu gebracht werden, sich entweder in Richtung eines eher mesenchymalen oder eines eher epithelialen Phänotyps zu verschieben. Diese bidirektionale Verschiebung wurde durch die kleinen GTPasen RAC1 und RAC1b gesteuert. Zusammengefasst erweisen sich Panc-1-Zellen somit als ein nützliches Modell für die Untersuchung des biologisch relevanten Prozesses der EMP.

### 3 Diskussion und Gesamtkonklusion

Die Prognose des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse hat sich trotz der intensiven Forschung in Hinblick auf onkologischer sowie chirurgischer Therapieoptimierung in den letzten Jahren nur marginal verbessert (34, 35). Die chirurgische Resektion des Tumors bleibt bislang die einzige Möglichkeit der kurativen Behandlung und dieser schließt sich in der Regel eine adjuvante Chemotherapie an (36, 37). Ein mit etwa 60% nicht zu vernachlässigender Teil der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits im metastasierten Stadium und kann lediglich eine palliative Therapie mit entweder mFOLFIRINOX oder Gemcitabin (mit nab-Paclitaxel) erhalten (38). Zielgerichtete Therapien sind bislang kein fester Bestandteil der Therapie des PDAC (39), jedoch konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass Subgruppen von Patienten von einer solchen Therapie profitieren könnten (19, 40).

Die vorliegenden Arbeiten geben einen Überblick, wie die inter- sowie intratumorale Heterogenität die Biologie der Tumore beeinflusst. Auf diese Weise können zum einen Rückschlüsse auf Resistenzmechanismen gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika gezogen sowie zum anderen unterschiedliche invasive Wachstumsverhalten oder weitere Eigenschaften der Tumorzellen charakterisiert werden. Darüber hinaus ermöglicht dieses Verständnis die Auswahl einer gezielteren Therapie, um somit eine Tumorprogression bzw. ein Tumorrezidiv zu verhindern. Das langfristige Ziel schließlich ist es eine zielgerichtete Therapie, welche die heterogene Tumorbilologie berücksichtigt, zu etablieren und ultimativ das Gesamtüberleben der Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs zu verbessern.

#### Die Rolle der intertumoralen Heterogenität

In den letzten Jahren wurden PDACs in mehreren Arbeiten anhand ihres molekularen Profils in Subtypen eingeteilt. Die Nomenklatur und die exakten molekularen Profile unterscheiden sich je nach Arbeitsgruppe. Es lässt sich jedoch festhalten, dass der quasimesenchymale Subtyp von Collisson et al. (13), der basal-ähnliche Subtyp von Moffitt et al. (14) und der squamöse Subtyp von Bailey et al. (15) signifikante Überschneidungen besitzen. Die klinische Bedeutung wird durch das deutlich schlechtere klinische Outcome dieser Subtypen im Vergleich zu den anderen Subtypen unterstrichen (41, 42).

Die in der Krebszelllinien-Enzyklopädie (CCLE) des Broad Institutes hinterlegten Zelllinien zum PDAC können die komplexe intertumorale Heterogenität und die individuelle

Tumorbiologie des PDACs vermutlich nicht vollständig widerspiegeln. Gleichzeitig fehlt zu den permanenten Zelllinien häufig die klinische Annotation zur Korrelation mit dem individuellen klinischen Verlauf und dem onkologischen Ergebnis. Die Etablierung weiterer Zelllinien, welche in den Kontext zum klinischen Verlauf gesetzt werden, kann somit ein nützliches *ex vivo* Modell darstellen, um tiefere Verständnisse über die heterogene Tumorbiologie des PDACs zu gewinnen.

In unserer Studie wurden zwei primäre Zelllinien etabliert, welche es uns ermöglichten (a) eine umfassende molekulare Charakterisierung durchzuführen, (b) funktionelle Aspekte wie invasives Verhalten und Ansprechen auf Chemotherapeutika zu untersuchen und (c) den klinischen Verlauf zu annotieren.

### Die Rolle der intratumoralen Heterogenität

Neben der intertumoralen Heterogenität weist das PDAC ebenfalls ein erhebliches Maß an intratumoraler Heterogenität auf. Chang-Seng-Yue et al. haben kürzlich gezeigt (17), dass die von Moffitt et al. definierten basal-ähnlichen und klassischen Subtypen jeweils eine eigene Heterogenität aufweisen. Transkriptomanalysen zeigten, dass jeder Subtyp ein Kontinuum der Genexpression widerspiegelt, dass durch eine Mischung intratumoraler Subpopulationen bestimmt wird (17). Analysen auf Ebene der Einzelzellebene von PDACs zeigen, dass Zellen des basal-ähnlichen Subtyps deutlich weiterverbreiteter sind als zunächst angenommen wurde (24). Zusätzlich finden sich Zellen, die sowohl Marker des klassischen als auch des basal-ähnlichen Subtyps exprimieren und somit eine Art Zwischenzustand reflektieren (43, 44). Diese Beobachtungen verdeutlichen, weshalb eine allein intertumoralen Charakterisierung der Tumore die Komplexität und evolutionären Prozesse einer Tumorphilpopulation vermutlich nicht vollständig aufgreifen kann. Eine Reihe von Arbeiten deutet darauf hin, dass in einem Großteil der Tumore bereits vor Beginn einer Therapie sowohl therapieresistente Subpopulationen als auch solche mit höherem Potential zur Metastasenbildung vorhanden sind (17, 33, 45, 46). Durch das Konzept der „Epithelio-mesenchymalen Transition“ werden unter anderem Tumorprogression, Therapieresistenzentwicklung und Metastasenbildung erklärt (28, 29, 30). Es beschreibt die dynamische Umwandlung von Epithelzellen in bewegliche Mesenchymzellen bzw. die Auflösung von Zell-Zell-Adhäsionen hin zu Zellen mit Migrationsaktivität (47, 48). Es zeigte sich in mehreren Studien, dass Tumorzellen des Pankreas zwischen epithelialem und mesenchymalem Zustand im Sinne eines plastischen Verhaltens wechseln können, anstatt

einen der beiden Zustände dauerhaft beizubehalten (49, 50, 51). Insbesondere in Hinblick auf das invasive Verhalten und die Fähigkeit zur Metastasenbildung scheinen Tumorzellen besonders effizient zu sein, wenn diese einen hybriden Phänotyp zwischen epithelialem und mesenchymalem Phänotyp besitzen (52, 53, 54).

Die Etablierung von aus einzelnen Zellen abgeleiteten Zelllinien ermöglichte es uns Subpopulationen aus ursprünglichen Tumorzellpopulation zu isolieren und sowohl auf molekularer Ebene als auch in funktioneller Hinsicht zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass innerhalb einer Tumorzellpopulation Zellen mit deutlich unterschiedlicher Zellmorphologie sowie differentieller Expression von EMT-Markern koexistieren. Diese heterogenen Phänotypen gingen mit unterschiedlichen tumorigenen Potenzialen und invasiven Aktivitäten einher. Darüber hinaus identifizierten wir verschiedene Subpopulationen von Tumorzellen, die aus derselben parentalen Tumorzellpopulation stammten und dabei erheblich unterschiedliche Resistenzprofile gegenüber Gemcitabin aufwiesen. Diese unterschiedlichen Resistenzprofile konnten wir mit transkriptomischen und proteomischen Expressionsprofilen korrelieren, wodurch wir in der Lage waren, die Gemcitabin-resistenten Subklone gezielter zu behandeln. Unsere Ergebnisse legen schließlich nahe, dass die unterschiedlichen Phänotypen subklonaler Populationen genutzt werden können, um Therapieresistenzen zu überwinden.

Die intratumorale Heterogenität ermöglicht es den Tumoren folglich, einer zunächst effektiven medikamentösen Therapie zu entkommen. Durch die geänderten externen Umstände gewinnen einzelne Zellen einen Überlebensvorteil, der ihnen eine klonale Expansion ermöglicht, welche sich klinisch in einem Tumorrezidiv ausdrückt. Die klinische Korrelation zeigt sich in einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten, welche ein höheres Maß an intratumoraler Heterogenität aufweisen (43, 55). Der Überlebensvorteil von Patienten mit einem Pankreaskarzinom, die eine molekular gesteuerte Therapie im Vergleich zur Standardtherapie erhielten, unterstreicht die Notwendigkeit, die individuelle Tumorbioogie in der Therapiestratifizierung zu berücksichtigen (19, 40, 56, 57). Dies verdeutlicht, ebenso wie unsere Ergebnisse, dass die Behandlung heterogener Pankreaskarzinome individuelle, patientenspezifische und molekular geleitete Behandlungsstrategien erfordert, anstelle eines "One-size-fits-all"-Ansatzes.

## 4 Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29.
2. Heinemann V, Schmidberger H. Duktales Adenokarzinom des Pankreas. *Onkol.* 2019 Aug;25(8):642–4.
3. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014 Jun 1;74(11):2913–21.
4. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Nov 28;22(44):9694–705.
5. Jentzsch V, Davis JAA, Djamgoz MBA. Pancreatic Cancer (PDAC): Introduction of Evidence-Based Complementary Measures into Integrative Clinical Management. *Cancers.* 2020 Oct 23;12(11):3096.
6. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primer.* 2016 Apr 21;2:16022.
7. Katz MHG, Marsh R, Herman JM, Shi Q, Collison E, Venook AP, et al. Borderline resectable pancreatic cancer: need for standardization and methods for optimal clinical trial design. *Ann Surg Oncol.* 2013 Aug;20(8):2787–95.
8. Jang JY, Han Y, Lee H, Kim SW, Kwon W, Lee KH, et al. Oncological Benefits of Neoadjuvant Chemoradiation With Gemcitabine Versus Upfront Surgery in Patients With Borderline Resectable Pancreatic Cancer: A Prospective, Randomized, Open-label, Multicenter Phase 2/3 Trial. *Ann Surg.* 2018 Aug;268(2):215–22.
9. Janssen QP, Buettner S, Suker M, Beumer BR, Addeo P, Bachellier P, et al. Neoadjuvant FOLFIRINOX in Patients With Borderline Resectable Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Patient-Level Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Aug 1;111(8):782–94.
10. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Dec 20;379(25):2395–406.
11. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011 May 12;364(19):1817–25.
12. Valle JW, Palmer D, Jackson R, Cox T, Neoptolemos JP, Ghaneh P, et al. Optimal duration and timing of adjuvant chemotherapy after definitive surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreas: ongoing lessons from the ESPAC-3 study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Feb 20;32(6):504–12.
13. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med.* 2011 Apr;17(4):500–3.
14. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet.* 2015 Oct;47(10):1168–78.
15. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* 2016 Mar 3;531(7592):47–52.
16. Sinha A, Cherba D, Bartlam H, Lenkiewicz E, Evers L, Barrett MT, et al. Mesenchymal-like pancreatic cancer cells harbor specific genomic alterations more frequently than their epithelial-like counterparts. *Mol Oncol.* 2014 Oct;8(7):1253–65.
17. Chan-Seng-Yue M, Kim JC, Wilson GW, Ng K, Figueroa EF, O’Kane GM, et al. Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor

- evolution. *Nat Genet.* 2020 Feb;52(2):231–40.
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: andrew\_aguirre@dfci.harvard.edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2017 Aug 14;32(2):185-203.e13.
  19. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 2019 Jul 25;381(4):317–27.
  20. Melisi D, Xia Q, Paradiso G, Ling J, Moccia T, Carbone C, et al. Modulation of Pancreatic Cancer Chemoresistance by Inhibition of TAK1. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2011 Aug 3;103(15):1190–204.
  21. Drubay V, Skrypek N, Cordiez L, Vasseur R, Schulz C, Boukrout N, et al. TGF- $\beta$ R2 Knock-down in Pancreatic Cancer Cells Promotes Tumor Growth and Gemcitabine Resistance. Importance of STAT3 Phosphorylation on S727. *Cancers.* 2018 Jul 31;10(8):254.
  22. Hsieh YY, Liu TP, Chou CJ, Chen HY, Lee KH, Yang PM. Integration of Bioinformatics Resources Reveals the Therapeutic Benefits of Gemcitabine and Cell Cycle Intervention in SMAD4-Deleted Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Genes.* 2019 Sep 28;10(10):766.
  23. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):338–45.
  24. Juiz N, Elkaoutari A, Bigonnet M, Gayet O, Roques J, Nicolle R, et al. Basal-like and classical cells coexist in pancreatic cancer revealed by single-cell analysis on biopsy-derived pancreatic cancer organoids from the classical subtype. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2020 Sep;34(9):12214–28.
  25. Burrell RA, Swanton C. The evolution of the unstable cancer genome. *Curr Opin Genet Dev.* 2014 Feb;24:61–7.
  26. Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *EMBO J.* 2021 Sep 15;40(18):e108647.
  27. Peschke K, Jakubowsky H, Schäfer A, Maurer C, Lange S, Orben F, et al. Identification of treatment-induced vulnerabilities in pancreatic cancer patients using functional model systems. *EMBO Mol Med.* 2022 Apr 7;14(4):e14876.
  28. Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, et al. Chronic TGF- $\beta$  exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal.* 2019 Feb 26;12(570):eaau8544.
  29. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015 Nov;25(11):675–86.
  30. Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, Dugger TC, Brantley DM, Chen J, et al. Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest.* 2002 Jun;109(12):1551–9.
  31. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012 Jan 18;481(7381):306–13.
  32. Brady SW, McQuerry JA, Qiao Y, Piccolo SR, Shrestha G, Jenkins DF, et al. Combating subclonal evolution of resistant cancer phenotypes. *Nat Commun.* 2017 Nov 1;8(1):1231.
  33. Seth S, Li CY, Ho IL, Corti D, Loponte S, Sapio L, et al. Pre-existing Functional Heterogeneity of Tumorigenic Compartment as the Origin of Chemoresistance in Pancreatic Tumors. *Cell Rep.* 2019 Feb 5;26(6):1518-1532.e9.
  34. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(4):252–71.
  35. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al.

- Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
36. Zuckerman DS, Ryan DP. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: A review. *Cancer.* 2008 Jan 15;112(2):243–9.
37. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *The Lancet.* 2004 Mar;363(9414):1049–57.
38. Strobel O, Neoptolemos J, Jäger D, Büchler MW. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019 Jan;16(1):11–26.
39. Ciliberto D, Staropoli N, Chiellino S, Botta C, Tassone P, Tagliaferri P. Systematic review and meta-analysis on targeted therapy in advanced pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2016 Mar;16(2):249–58.
40. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020 Apr;21(4):508–18.
41. Birnbaum DJ, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E, Bertucci F. Validation and comparison of the molecular classifications of pancreatic carcinomas. *Mol Cancer.* 2017 Dec;16(1):168.
42. N Kalimuthu S, Wilson GW, Grant RC, Seto M, O’Kane G, Vajpeyi R, et al. Morphological classification of pancreatic ductal adenocarcinoma that predicts molecular subtypes and correlates with clinical outcome. *Gut.* 2020 Feb;69(2):317–28.
43. Williams HL, Dias Costa A, Zhang J, Raghavan S, Winter PS, Kapner KS, et al. Spatially Resolved Single-Cell Assessment of Pancreatic Cancer Expression Subtypes Reveals Co-expressor Phenotypes and Extensive Intratumoral Heterogeneity. *Cancer Res.* 2023 Feb 3;83(3):441–55.
44. Braun R, Lapshyna O, Watzelt J, Drenckhan M, Künstner A, Färber B, et al. Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response. *Cells.* 2023 Feb 11;12(4):587.
45. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010 Oct 28;467(7319):1114–7.
46. Bhang H eun C, Ruddy DA, Krishnamurthy Radhakrishna V, Caushi JX, Zhao R, Hims MM, et al. Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nat Med.* 2015 May;21(5):440–8.
47. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell.* 2012 Jan;148(1–2):349–61.
48. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):744–9.
49. Kröger C, Afeyan A, Mraz J, Eaton EN, Reinhardt F, Khodor YL, et al. Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2019 Apr 9;116(15):7353–62.
50. Kuo TT, Ladurner AG. Exploiting the Circadian Clock for Improved Cancer Therapy: Perspective From a Cell Biologist. *Front Genet.* 2019 Dec 11;10:1210.
51. Masri S, Sassone-Corsi P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. *Nat Med.* 2018 Dec;24(12):1795–803.
52. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2019 Mar;29(3):212–26.
53. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature.* 2018 Apr;556(7702):463–8.

54. Thompson EW, Nagaraj SH. Transition states that allow cancer to spread. *Nature*. 2018 Apr;556(7702):442–4.
55. Liu X, Wang W, Liu X, Zhang Z, Yu L, Li R, et al. Multi-omics analysis of intra-tumoural and inter-tumoural heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Med*. 2022 Jan;12(1):e670.
56. Abdel-Wahab R, Varadhachary GR, Bhosale PR, Wang X, Fogelman DR, Shroff RT, et al. Randomized, phase I/II study of gemcitabine plus IGF-1R antagonist (MK-0646) versus gemcitabine plus erlotinib with and without MK-0646 for advanced pancreatic adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2018 Dec;11(1):71.
57. Gueorguieva I, Tabernero J, Melisi D, Macarulla T, Merz V, Waterhouse TH, et al. Population pharmacokinetics and exposure–overall survival analysis of the transforming growth factor- $\beta$  inhibitor galunisertib in patients with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Nov;84(5):1003–15.

## 5 Danksagung

Einen herzlichen Dank an...

... Herrn PD Dr. med. Rüdiger Braun, der mich durchgehend bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützte. Ich danke Ihm für das offene Ohr bei sämtlichen Fragen sowie sein stets ehrliches und kritisches Feedback. Seine Begeisterung für die Forschung hat mich nachhaltig angesteckt und wird mich auch auf meinem weiteren Weg begleiten.

... Frau Dr. rer. nat. Olgha Lapshyna, die mir von der ersten Minute an mit viel Geduld die Arbeit im Labor nähergebracht hat.

... Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wellner, der mit seinen kreativen Überlegungen stets für frischen Wind und neue Ideen gesorgt hat.

... Herrn Prof. Dr. med. Tobias Keck, der mir die Chance gegeben hat, an der Klinik für Chirurgie zu promovieren.

... allen Patienten, die uns durch ihre Einwilligung erst die Möglichkeit geben in der Forschung weitere Fortschritte zu erzielen.

...meinen Eltern, Bettina und Georg Färber, die es mir ermöglicht haben, sorgenfrei zu studieren und zu promovieren. Ich danke euch, dass Ihr in jedem Abschnitt meines Lebens unterstützend an meiner Seite steht.

## 6 Liste mit wissenschaftlichen Publikationen, Präsentationen, Postern und Preisen

- Dezember 2023                      Publikation in Prüfung: Patientenberichte drei Monate nach einer Pankreaschirurgie bei gutartigen und bösartigen Erkrankungen - eine prospektive Beobachtungsstudie
- Meike ten Winkel, Hussein Salama, Kai Timrott, Moritz Kleine, Dennis Kleine-Doepke, Stephanie Raehder-Johnson, Holger Meisel, Nuh N. Rahberi, Schaima Abdelhadi, Felix Rückert, Christoph Reissfelder, Kim C. Honselmann, Ruediger Braun, Benedikt Faerber, Hryhoriy Lapshyn, Tobias Keck, Waldemar Uhl, Orlin Belyaev, Ulrich F. Wellner, Louisa Bolm
- September 2023                      Wissenschaftlicher Vortrag, Viszeralmedizin 2023 (Hamburg)
- „Molekulares Profiling und spezifisches Targeting von Gemcitabin-resistenten Subklonen in heterogenen Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellpopulationen“ – Färber B. et al.
- August 2023                              Publikation: Molekulares Profiling und spezifisches Targeting von Gemcitabin-resistenten Subklonen in heterogenen Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellpopulationen
- Färber B, Lapshyna O, Künstner A, Kohl M, Sauer T, Bichmann K, u. a. Molecular profiling and specific targeting of gemcitabine-resistant subclones in heterogeneous pancreatic cancer cell populations. *Front Oncol.* 2023;13:1230382.
- Februar 2023                              Publikation: Etablierung und molekulare Charakterisierung von zwei aus Patienten gewonnenen Zelllinien des duktales Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse als präklinische Modelle für das Ansprechen auf eine Behandlung
- Braun R, Lapshyna O, Watzelt J, Drenckhan M, Künstner A, Färber B, u. a. Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response. *Cells.* 11. Februar 2023;12(4):587.

April 2022

Publikation: Die quasimesenchymale duktale Epithelzelllinie PANC-1 der Bauchspeicheldrüse - ein nützliches Modell zur Untersuchung klonaler Heterogenität und EMT-Subtypverschiebung

- Ungefroren H, Thürling I †, Färber B †, Kowalke T, Fischer T, De Assis LVM, u. a. The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1-A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting. Cancers. 19. April 2022;14(9):2057.

Februar 2022

Posterpräsentation, Deutscher Pankreasclub (Lübeck)

- „Identification of molecular signatures for response of pancreatic ductal adenocarcinoma to chemotherapeutic agents for therapy stratification using clonal cell culture models” – Färber B. et al.

August 2021

Promotionsstipendium Lübecker Exzellenzmedizin

- Für das Promotionsvorhaben “Identifikation molekularer Signaturen für das Ansprechen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas auf Chemotherapeutika zur Therapiestratifizierung anhand von klonalen Zellkulturmodellen“

## 7 Verzeichnis der Publikationen im Rahmen der kumulativen Dissertation

### Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response

Braun R, Lapshyna O, Watzelt J, Drenckhan M, Künstner A, Färber B, Hael AAM, Bolm L, Honselmann KC, Konukiewitz B, Castven D, Spielmann M, Gorantla SP, Busch H, Marquardt JU, Keck T, Wellner UF, Ungefroren H. Establishment and Molecular Characterization of Two Patient-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines as Preclinical Models for Treatment Response. *Cells*. 2023 Feb 11;12(4):587. doi: 10.3390/cells12040587. PMID: 36831254; PMCID: PMC9954561.

#### Abstract

The prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is exceedingly poor. Although surgical resection is the only curative treatment option, multimodal treatment is of the utmost importance, as only about 20% of tumors are primarily resectable at the time of diagnosis. The choice of chemotherapeutic treatment regimens involving gemcitabine and FOLFIRINOX is currently solely based on the patient's performance status, but, ideally, it should be based on the tumors' individual biology. We established two novel patient-derived primary cell lines from surgical PDAC specimens. LuPanc-1 and LuPanc-2 were derived from a pT3, pN1, G2 and a pT3, pN2, G3 tumor, respectively, and the clinical follow-up was fully annotated. STR-genotyping revealed a unique profile for both cell lines. The population doubling time of LuPanc-2 was substantially longer than that of LuPanc-1 (84 vs. 44 h). Both cell lines exhibited a typical epithelial morphology and expressed moderate levels of CK7 and E-cadherin. LuPanc-1, but not LuPanc-2, co-expressed E-cadherin and vimentin at the single-cell level, suggesting a mixed epithelial-mesenchymal differentiation. LuPanc-1 had a missense mutation (p.R282W) and LuPanc-2 had a frameshift deletion (p.P89X) in *TP53*. *BRCA2* was nonsense-mutated (p.Q780\*) and *CREBBP* was missense-mutated (p.P279R) in LuPanc-1. *CDKN2A* was missense-mutated (p.H83Y) in LuPanc-2. Notably, only LuPanc-2 harbored a partial or complete deletion of *DPC4*. LuPanc-1 cells exhibited high basal and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced migratory activity in real-time cell migration assays, while LuPanc-2 was refractory. Both LuPanc-1 and LuPanc-

2 cells responded to treatment with TGF- $\beta$ 1 with the activation of SMAD2; however, only LuPanc-1 cells were able to induce TGF- $\beta$ 1 target genes, which is consistent with the absence of *DPC4* in LuPanc-2 cells. Both cell lines were able to form spheres in a semi-solid medium and in cell viability assays, LuPanc-1 cells were more sensitive than LuPanc-2 cells to treatment with gemcitabine and FOLFIRINOX. In summary, both patient-derived cell lines show distinct molecular phenotypes reflecting their individual tumor biology, with a unique clinical annotation of the respective patients. These preclinical ex vivo models can be further explored for potential new treatment strategies and might help in developing personalized (targeted) therapy regimens.

## **Molecular profiling and specific targeting of gemcitabine-resistant subclones in heterogeneous pancreatic cancer cell populations**

Färber B, Lapshyna O, Künstner A, Kohl M, Sauer T, Bichmann K, Heckelmann B, Watzelt J, Honselmann K, Bolm L, Ten Winkel M, Busch H, Ungefroren H, Keck T, Gemoll T, Wellner UF, Braun R. Molecular profiling and specific targeting of gemcitabine-resistant subclones in heterogeneous pancreatic cancer cell populations. *Front Oncol.* 2023 Aug 31;13:1230382. doi: 10.3389/fonc.2023.1230382. PMID: 37719017; PMCID: PMC10502231.

### **Abstract**

**Purpose:** Chemotherapy is pivotal in the multimodal treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Technical advances unveiled a high degree of inter- and intratumoral heterogeneity. We hypothesized that intratumoral heterogeneity (ITH) impacts response to gemcitabine treatment and demands specific targeting of resistant subclones.

**Methods:** Using single cell-derived cell lines (SCDCLs) from the classical cell line BxPC3 and the basal-like cell line Panc-1, we addressed the effect of ITH on response to gemcitabine treatment.

**Results:** Individual SCDCLs of both parental tumor cell populations showed considerable heterogeneity in response to gemcitabine. Unsupervised PCA including the 1,000 most variably expressed genes showed a clustering of the SCDCLs according to their respective sensitivity to gemcitabine treatment for BxPC3, while this was less clear for Panc-1. In BxPC3 SCDCLs, enriched signaling pathways EMT, TNF signaling via NfKB, and IL2STAT5 signaling correlated with more resistant behavior to gemcitabine. In Panc-1 SCDCLs MYC targets V1 and V2 as well as E2F targets were associated with stronger resistance. We used recursive feature elimination for Feature Selection in order to compute sets of proteins that showed strong association with the response to gemcitabine. The optimal protein set calculated for Panc-1 comprised fewer proteins in comparison to the protein set determined for BxPC3. Based on molecular profiles, we could show that the gemcitabine-resistant SCDCLs of both BxPC3 and Panc-1 are more sensitive to the BET inhibitor JQ1 compared to the respective gemcitabine-sensitive SCDCLs.

**Conclusion:** Our model system of SCDCs identified gemcitabine-resistant subclones and provides evidence for the critical role of ITH for treatment response in PDAC. We exploited molecular differences as the basis for differential response and used these for more targeted therapy of resistant subclones.

## The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1-A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting

Ungefroren H, Thürling I, Färber B, Kowalke T, Fischer T, De Assis LVM, Braun R, Castven D, Oster H, Konukiewitz B, Wellner UF, Lehnert H, Marquardt JU. The Quasimesenchymal Pancreatic Ductal Epithelial Cell Line PANC-1-A Useful Model to Study Clonal Heterogeneity and EMT Subtype Shifting. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 19;14(9):2057. doi: 10.3390/cancers14092057. PMID: 35565186; PMCID: PMC9101310.

### Abstract

Intratumoral heterogeneity (ITH) is an intrinsic feature of malignant tumors that eventually allows a subfraction of resistant cancer cells to clonally evolve and cause therapy failure or relapse. ITH, cellular plasticity and tumor progression are driven by epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the reverse process, MET. During these developmental programs, epithelial (E) cells are successively converted to invasive mesenchymal (M) cells, or back to E cells, by passing through a series of intermediate E/M states, a phenomenon termed E-M plasticity (EMP). The induction of MET has clinical potential as it can block the initial EMT stages that favor tumor cell dissemination, while its inhibition can curb metastatic outgrowth at distant sites. In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), cellular models with which to study EMP or MET induction are scarce. Here, we have generated single cell-derived clonal cultures of the quasimesenchymal PDAC-derived cell line, PANC-1, and found that these differ strongly with respect to cell morphology and EMT marker expression, allowing for their tentative classification as E, E/M or M. Interestingly, the different EMT phenotypes were found to segregate with differences in tumorigenic potential in vitro, as measured by colony forming and invasive activities, and in circadian clock function. Moreover, the individual clones the phenotypes of which remained stable upon prolonged culture also responded differently to treatment with transforming growth factor (TGF) $\beta$ 1 in regard to regulation of growth and individual TGF $\beta$  target genes, and to culture conditions that favour ductal-to-endocrine transdifferentiation as a more direct measure for cellular plasticity. Of note, stimulation with TGF $\beta$ 1 induced a shift in parental PANC-1 cultures towards a more extreme M and invasive phenotype, while exposing the cells to a combination of the proinflammatory cytokines IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  (IIT) elicited a shift towards a more E and less invasive phenotype resembling a MET-like process. Finally, we

show that the actions of TGF $\beta$ 1 and IIT both converge on regulating the ratio of the small GTPase RAC1 and its splice isoform, RAC1b. Our data provide strong evidence for dynamic EMT-MET transitions and qualify this cell line as a useful model with which to study EMP.