

Universität Rostock: Medizinische Fakultät

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Der Universitätsmedizin Rostock

Arbeitsgruppe für Molekulare Onkologie und Immuntherapie

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer – MBA

Themenvergebender Hochschullehrer: PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher

Vergleichende Charakterisierung der ersten Zelllinie eines medullären Pankreaskarzinoms mit vier weiteren PDAC-Zelllinien

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Jens von den Driesch

geb. am 03.02.1999 in Essen

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. Robert Jaster, Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Innere Medizin II

Prof. Dr. Silke Kuphal, Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Biochemie

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

Innsbruck, 01.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	9
1.1 Epidemiologie	9
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	9
1.3 Pathologie.....	10
1.3.1 Das medulläre Pankreaskarzinom (MPC): Ein seltener Subtyp	11
1.4 Molekularpathologie	12
1.5 Diagnostik	14
1.6 Therapie.....	15
1.6.1 Chirurgie	16
1.6.2 Chemotherapie.....	17
1.7 Chemoresistenz	20
1.8 Tumormodelle	21
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 Methoden	31
2.2.1 Probenaufbereitung und Etablieren von Zelllinien	31
2.2.2 Zellkultur	33
2.2.3 Mykoplasmen-Nachweis	35
2.2.4 DNA-Isolation	35
2.2.5 PCR-Nachweis des humanen Cytochrom-B	36
2.2.6 STR-Analyse	37
2.2.7 Whole Exome Sequencing (WES)	38
2.2.8 MSI-Score	38
2.2.9 Wachstumskinetik und Verdopplungszeit.....	39

2.2.10	Migrationsmessung mittels Scratch-Assay	40
2.2.11	Chemosensitivitätstestung	41
2.2.12	Durchflusszytometrie	43
2.2.13	Statistik	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Etablierung von Zelllinien	46
3.2	Patientendaten	47
3.3	Pathologie	48
3.4	STR-Analyse	49
3.5	Molekularpathologie (WES und MSI-Score)	51
3.6	Morphologie und Wachstumsverhalten	55
3.7	Migration	57
3.8	Chemosensitivität	60
3.8.1	Einzeltestung	60
3.8.2	Kombinationen	62
3.9	Durchflusszytometrie.....	65
4.	Diskussion	68
4.1	Etablierung und Qualitätskontrolle	68
4.2	Basischarakterisierung.....	70
4.3	Chemosensitivität	72
4.4	Mutationsanalyse	78
4.5	Immunogenität	80
4.6	HROP68Tu2: Das erste Modell eines MPCs	83
4.7	Ausblick.....	84
	Thesen	85
	Anhang	86
	Literaturverzeichnis.....	99
	Selbstständigkeitserklärung	108
	Danksagung	109

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden kaum Fortschritte in der Verbesserung des Überlebens beim Duktalen Adenokarzinom des Pankreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) erreicht. Möglicherweise kann jedoch, in seltenen PDAC-Fällen mit besonderen Tumoreigenschaften, mittels Präzisionsonkologie ein verbessertes Überleben erreicht werden. Für die Entwicklung dieser zielgerichteten Therapien sind präklinische Modelle unabdingbar. Für das medulläre Pankreaskarzinom (MPC), einen seltenen Subtyp des PDACs, gab es bisher noch kein solches Modell. HROP68 ist der erste MPC-Fall aus dem eine 2D-Zelllinie etabliert werden konnte und einer von lediglich 35 beschriebenen Fällen in der Literatur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daneben vier weitere PDAC-Zelllinien etabliert, mit deren Eigenschaften die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 verglichen werden konnte. HROP68Tu2 zeichnete sich durch eine langsamere Wachstums- und Migrationsgeschwindigkeit als die anderen vier Zelllinien aus.

Es wurden ein T-Zell Infiltrat und durchflusszytometrisch die Expression von MHC-2, PD-L1 und eine verringerte CD40-Expression nachgewiesen. Der Tumor besaß also einen immunogenen Phänotyp. Gegenüber den etablierten Therapieregimen FOLFIRINOX, Gemcitabin-Monotherapie, der Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Paclitaxel (GemPac) und der Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Erlotinib (GemErlo) zeigte die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 eine vergleichbare Sensitivität wie die anderen vier Normaltyp-PDAC-Zelllinien.

Das Mutationsrepertoire der Normaltyp-PDAC-Zelllinien war hingegen typisch für ein PDAC und gekennzeichnet durch eine geringe Tumormutationslast sowie typische Mutationen in den Genen *KRAS* und *TP53*. Im Gegensatz dazu imponierte HROP68Tu2 mit einer hohen Tumormutationslast und mit Mutationen in *FOXG1*, *KRAS* und *SOS1* sowie einer hohen Anzahl an Frameshift-Mutationen. In Zusammenschau mit dem bestimmten MSI-Score war von Alterationen im *Mismatch*-Reparatur-System und einer damit einhergehenden niedriggradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (MSI-Low) auszugehen.

Mit dem ersten MPC-Modell können nun die Eigenschaften dieses Tumors mit denen des Normaltyp-PDACs besser verglichen werden und erste präklinische Rückschlüsse auf das Therapieansprechen gewonnen werden. Die hohe Tumormutationslast mit einer Vielzahl an *Frameshift*-Mutationen sowie der immunogene Phänotyp machen HROP68Tu2 zu einem idealen präklinischen Forschungsmodell, um neue gezielte Tumorthérapien wie Immuntherapien *in vitro* beim MPC zu testen. So kann möglicherweise auch bei der weiterhin schlechten Prognose des PDACs mittels personalisierter Tumorthérapie in Zukunft die Prognose von MPC-Patientinnen und -Patienten verbessert werden.

Abstract

In recent years, there has only been limited progress in improving survival rates for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). However, precision oncology might offer a chance to enhance survival in rare PDAC cases with unique tumor characteristics. Developing targeted therapies relies heavily on preclinical models, and until now, there hasn't been one for Medullary Pancreatic Carcinoma (MPC), a rare subtype of PDAC. Including HROP68 only 35 cases of MPC have been described in the literature so far. HROP68 is the first one from which a 2D cell line has been successfully established.

This study also discusses four additional common-type PDAC cell lines, allowing for a comparison with the MPC cell line HROP68Tu2. Notably, HROP68Tu2 demonstrated slower growth and migration compared to the other four cell lines. When tested against the established therapeutic regimens FOLFIRINOX, Gemcitabine monotherapy, GemPac, and GemErlo, the MPC cell line HROP68Tu2 showed a comparable sensitivity to the other four common-type PDAC cell lines.

Analysis revealed T-cell infiltration and a distinctive immunogenic phenotype, with flow cytometry showing expression of MHC-2, PD-L1, and reduced CD40 expression. Unlike other tumors with a typical PDAC mutation profile, HROP68Tu2 displayed a high tumor mutational burden and mutations in *FOXP1*, *KRAS* and *SOS1* along with numerous frameshift mutations. In summary, based on the specific MSI score, alterations in the mismatch repair system and the associated low-grade microsatellite instability (MSI) (MSI-LOW) were to be assumed.

The first MPC model now allows for a better comparison of the tumor properties with those of common-type PDAC, enabling initial preclinical insights into therapeutic responses. The high tumor mutation burden, characterized by numerous frameshift mutations, along with the immunogenic phenotype, positions HROP68Tu2 as an ideal preclinical research model for testing new targeted tumor therapies, such as in vitro immunotherapies in MPC. This approach may potentially contribute to improving the prognosis for MPC patients in the future through personalized tumor therapy, despite the current dismal prognosis for PDAC.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Tumorprogression (PanIN und desmoplastisches Stroma).</i>	13
Abbildung 2: <i>Stadieneinteilung des PDACs (cT1–cT4) anhand der Bildgebung und Prognose</i>	15
Abbildung 3: <i>Behandlungsalgorithmus des PDACs</i>	16
Abbildung 4: <i>Beispiel für das Layout einer 96-Well-Platte für die Chemosensitivitätstestung</i>	41
Abbildung 5: <i>Nachweis von humanem Cytochrom-B mittels PCR</i>	46
Abbildung 6: <i>Vorkommen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in HROP68-Proben</i>	53
Abbildung 7: <i>Morphologie der Zelllinien</i>	55
Abbildung 8: <i>Verdopplungszeiten im Vergleich</i>	56
Abbildung 9: <i>Migrationsverhalten anhand des relativen Kratzer-Durchmessers</i>	57
Abbildung 10: <i>Vergleich des Migrationsverhaltens</i>	58
Abbildung 11: <i>Migrationsgeschwindigkeiten im Vergleich</i>	59
Abbildung 12: <i>Einzeltestung IC_{50}- und C_{max}-Werte im Vergleich</i>	60
Abbildung 13: <i>Kombinationstestung IC_{50}-Werte und C_{max}-Werte im Vergleich</i>	62
Abbildung 14: <i>Heatmap Durchflusszytometrie</i>	65
Abbildung 15: <i>Epithel- und Tumormarker-Expression (CD326 und CD66adecb)</i>	95
Abbildung 16: <i>MHC-Expression (MHC-1 und MHC-2)</i>	96
Abbildung 17: <i>EGFR- und HER-2-Expression</i>	97
Abbildung 18: <i>PD-L1- und PD-1-Expression</i>	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>UICC-Stadien sowie Medianes- und 5-Jahres-Überleben</i>	10
Tabelle 2: <i>Verbrauchsmaterialien</i>	25
Tabelle 3: <i>Geräte</i>	26
Tabelle 4: <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	27
Tabelle 5: <i>Ausgewählte Ansätze für die DNA-Isolation und PCR</i>	28
Tabelle 6: <i>Medikamente</i>	28
Tabelle 7: <i>Kits</i>	28
Tabelle 8: <i>Antikörper für die Durchflusszytometrie</i>	29
Tabelle 9: <i>Primer für humanspezifische Cytochrom B PCR und STR Multiplex PCR</i>	30
Tabelle 10: <i>Software und Programme</i>	30
Tabelle 11: <i>Definition der Fall-ID und Proben-ID</i>	31
Tabelle 12: <i>Definition der PDX-ID</i>	31
Tabelle 13: <i>Molares Verhältnis der Kombinationstherapien</i>	43
Tabelle 14: <i>Basisdaten der etablierten Zelllinien</i>	47
Tabelle 15: <i>Allgemeine Patientendaten</i>	47
Tabelle 16: <i>Übersicht über Therapien</i>	48
Tabelle 17: <i>Histopathologie</i>	48
Tabelle 18: <i>Allelbestimmung mittels STR-Analyse</i>	50
Tabelle 19: <i>WES: Pathogene und wahrscheinlich pathogene Mutationen</i>	51
Tabelle 20: <i>MSI-Score</i>	54
Tabelle 21: <i>Interaktion von FOLFIRINOX</i>	63
Tabelle 22: <i>Interaktion von GemPac und GemErlo</i>	63
Tabelle 23: <i>Korrelation der EGFR-Expression mit der IC_{50} von Erlotinib</i>	67
Tabelle 24: <i>Datenbasis zu Benennung der Marker-Allele, ausgehend von der Fragmentlänge</i>	86
Tabelle 25: <i>Marker (STR und Geschlechtsmarker) aus dem Promega PowerPlex® 16 System</i>	87
Tabelle 26: <i>Verdopplungszeit und Migrationsgeschwindigkeit: Ergebnisse der Post-hoc-Analyse</i>	87
Tabelle 27: <i>WES: pathogene, wahrscheinlich pathogene und Mutationen unsicherer Signifikanz</i>	88
Tabelle 28: <i>Durchmesser des Kratzers im Zellrasen (M und SD)</i>	90
Tabelle 29: <i>Einzeltestung IC_{50}-Werte mit SD und C_{max}-Werte im Vergleich</i>	91
Tabelle 30: <i>Einzeltestung der Chemosensitivität: Ergebnisse der Post-hoc-Analyse</i>	92
Tabelle 31: <i>Färbeansätze Durchflusszytometrie</i>	93
Tabelle 32: <i>Mittelwerte und Standardabweichungen (positiv gefärbte Zellen und MFIR)</i>	94

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AG MOI	Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie
AK	Antikörper
APN	Aminopeptidase-N
Bp	Basenpaar
CI	Combination Index
C _{max}	Maximale Plasmakonzentration
dFdC	2',2'-Difluordesoxycytidin
dFdCTP	2',2'-Difluordesoxycytidin-Triphosphat
dMMR	Mismatch-Reparatur-Defizienz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	epidermal growth factor receptor
FCS	fetal calf serum
FM	Einfriermedium
FOLFIRINOX	FOL: Folinsäure, F: 5-FU, IRIN: Irinotecan, OX: Oxaliplatin
gDNA	genomische DNA
GemErlo	Kombinationstherapie Gemcitabin und Erlotinib
GemPac	Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Paclitaxel
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50
IgG	Immunglobulin-G
KV	Kristallviolett
MDR	Multidrug Resistance
mFOLFIRINOX	Modifiziertes FOLFIRINOX Regime
MHC	major histocompatibility complex
MPC	medulläres Pankreaskarzinom
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphate-Buffered Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed death-protein
PD-L1	programmed death-ligand
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDX	Patient Derived Xenograft
PiCoP	peptid-basierte Immunisierungsstrategien bei Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen
STR	Short Tandem Repeat
TE	TRIS und EDTA
TEA	TRIS-EDTA-Acetat
UICC	Union internationale contre le cancer
VM	Vollmedium

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2018 erkrankten in Deutschland 19.020 Menschen an einem Karzinom der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), fast ebenso viele Patientinnen und Patienten (18.332) starben in diesem Jahr an den Folgen dieser Krebserkrankung. Damit waren bösartige Neubildungen am Pankreas die vierthäufigste Krebstodesursache sowie die elfthäufigste Todesursache in diesem Jahr (Robert Koch Institut, 2021). Dabei stellt das Pankreaskarzinom bei Frauen lediglich die sechsthäufigste Tumorlokalisation (3,9 %) und bei Männern die siebthäufigste Tumorlokalisation (3,7 %) dar. Das relative 5-Jahres-Überleben betrug im Jahr 2018 bei beiden Geschlechtern 10 %, das relative 10-Jahres-Überleben bei Frauen 7 % und bei Männer 8 % (Robert Koch Institut, 2021).

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms steigt mit dem Alter an (Bray et al., 2018), bei Patientinnen und Patienten unter 55 Jahren handelt es sich um eine seltene Diagnose (Malvezzi et al., 2016). Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland lag im Jahre 2018 bei Frauen bei 78 Jahren und bei Männern bei 74 Jahren (Robert Koch Institut, 2021). Somit handelt es sich vornehmlich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters.

Weltweit handelt es sich beim Pankreaskarzinom um die elfthäufigste Krebsdiagnose. In der industrialisierten Welt ist es die siebthäufigste Krebstodesursache (Bray et al., 2018), in den USA die dritthäufigste (Wong et al., 2017). Weltweit zeigten sich regionale Unterschiede in der Inzidenz und Mortalität. Diese Unterschiede sind am höchsten in Nordamerika, Europa, Neuseeland und Australien. Eine höhere Inzidenz und Mortalität korreliert dabei mit einem höheren *Human Development Index* und Bruttoinlandsprodukt (Wong et al., 2017). Voraussichtlich wird das Pankreaskarzinom im Jahre 2030 die zweithäufigste Krebstodesursache in den USA darstellen (Rahib et al., 2014).

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie eines Pankreaskarzinoms ist komplex und multifaktoriell. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehören unter anderem das Rauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht und Essgewohnheiten. Den größten Einfluss hat dabei das Rauchen. Im Rahmen einer britischen Studie aus dem Jahre 2011 konnte das Rauchen bei 26,2 % der Patientinnen und 31,0 % der Patienten mit der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht werden (Parkin et al., 2011).

Die wichtigsten nicht-modifizierbaren Risikofaktoren sind Alter, Diabetes mellitus, familiäre Belastung, *Helicobacter Pylori* Infektion und genetische Faktoren. Bei 10 % der Patientinnen und Patienten liegt eine Keimbahnmutation vor (Ghiorzo, 2014). Zu den häufigsten gehören *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*,

CDKN2A, APC, HLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PRSS1 und *STK11* (Solomon et al., 2012; Vincent et al., 2011). Den größten Anteil mit 5 bis 17 % haben dabei Mutationen des *BRCA2* Gens (Hahn et al., 2003).

1.3 Pathologie

Bei 90 % der Neoplasien des Pankreas liegt ein PDAC vor. Dieses entwickelt sich aus Zellen des exokrinen Anteils des Organes. Aus den endokrinen Zellen des Pankreas erwachsen etwa 10 % der Pankreaskarzinome; diese sind neuroendokrine Tumoren. Im Folgenden wird auf die pathologischen Besonderheiten des PDACs eingegangen. Etwa zwei Drittel der PDACs sind im Pankreaskopf lokalisiert.

Makroskopisch stellt sich das PDAC als derber Tumor mit einer weiß-grauen Schnittfläche dar. Invasive duktale Infiltrate sind dabei typischerweise in reichlich desmoplastischem Stroma eingebettet, welches häufig bis zu 90 % des Tumorumfanges ausmacht (Esposito et al., 2014). Etwa 70 bis 80 % der Tumoren sind gut bis mäßig differenziert (G1-G2) (Esposito et al., 2014). Immunhistochemisch lassen sich Cytokeratin 7 (CK7), Cytokeratin 18 (CK18), Mucin-1 (MUC1, CD227), Mucin-5AC (MUC5AC), Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9) anfärben (Schlitter et al., 2019). An der Karzinogenese sind eine Vielzahl von Vorläuferläsionen beteiligt, welche auch im ausgereiften Tumor zu finden sind (Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), atypisch flache Läsionen, intraduktales papillär-muzinöse Neoplasien, intraduktales tubulopapilläre Neoplasien, muzinös-zystischen Neoplasien) (Esposito et al., 2014).

Die gängige pathologische Klassifikation von soliden Tumoren beruht auf der TNM-Klassifikation, welche mittels der UICC-Klassifikation (*Union internationale contre le cancer*) in Stadien zusammengefasst wird. Diese wiederum haben Implikationen für die Prognose (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: UICC-Stadien sowie Medianes- und 5-Jahres-Überleben

UICC	T	N	M	Medianes Überleben [M]	5-Jahres-Überleben [%]
0	Tis	N0	M0	n.a.	n.a.
1A	T1	N0	M0	24–42	31–39
1B	T2	N0	M0	20–26	22–27
2A	T3	N0	M0	15–30	16–25
2B	T1 - T3	N1	M0	12–21	8–10
3	T4	Alle N	M0	11–14	0–7
4	Alle T	Alle N	M1	5–12	0–4

Anmerkung. Staging mittels UICC-Klassifikation modifiziert nach Sobin LH (2009). Medianes Überleben in Monaten wurde übernommen von Hartwig and Buchler (2013), n.a. (nicht angegeben), Monate (M).

Stroma

Der Großteil der Tumormasse des PDAC besteht wie zuvor beschrieben aus desmoplastischem Stroma und nicht aus den Tumorzellen. Darin unterscheidet sich das PDAC stark von anderen soliden Tumorentitäten. Früher wurde das Stroma als Begleitreaktion auf die Tumorzellen verstanden. Neue Erkenntnisse hingegen zeigen, dass das Stroma an vielen pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist. Dazu zählen Tumorgenese, Progression, Invasion, Metastasierung und Chemoresistenz (Neesse et al., 2015). Das Zusammenspiel von Stroma und Tumorzellen wird als Tumor-Stroma-Interaktion bezeichnet. Das Stroma besteht aus einer zellulären Komponente, zu der Fibroblasten, Immunzellen, Blutgefäße und Lymphgefäße gehören sowie einer azellulären Komponente, der extrazellulären Matrix (Ferrara et al., 2021). Das Stroma bildet dabei eine spezielle Mikroumgebung (Feig et al., 2012).

Es hat sich gezeigt, dass sich in der PDAC-Forschung die Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten häufig nicht *in vivo* reproduzieren lassen. Dies ist wahrscheinlich durch den Einfluss der Mikroumgebung des Tumors begründet. Somit ist in den letzten Jahren das Stroma als Zielstruktur für neue Therapieansätze in den Fokus der Forschung gerückt. Bisher gibt es noch keine gezielte Therapie, die auf die Depletion des Tumorstromas abzielt. Das ist vermutlich auf die vorhandenen Tumormodelle zurückzuführen, denn es ist noch nicht gelungen, ein Modell der Tumormikroumgebung in der Maus zu etablieren (Liot et al., 2021).

1.3.1 Das medulläre Pankreaskarzinom (MPC): Ein seltener Subtyp

Haeberle and Esposito (2019) beschrieben sieben verschiedene histologische Subtypen des PDACs, das adenosquamöse Karzinom, das kolloidartige Karzinom, das hepatoide Karzinom, das siegelringzellige Karzinom, das undifferenzierte Karzinom, das undifferenzierte Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen und das medulläre Karzinom. Das MPC wurde erstmals von Goggins et al. (1998) beschrieben. Stand Januar 2025 finden sich 35 Fallberichte in der Literatur (Taboada et al., 2025). HROP68 ist das erste beschriebene MPC zu dem ein *Patient Derived Xenograft* (PDX) sowie eine primäre Zelllinie entwickelt werden konnte (von den Driesch & Flöttmann et al., 2022).

In der Zusammenschau der beschriebenen MPC-Fälle zeigt sich, dass sich dieser Subtyp stark vom PDAC unterscheidet. Die Bezeichnung medullär ergibt sich dabei aus der besonderen mikroskopischen Morphologie dieses schlecht differenzierten PDACs. Goggins et al. (1998) beschrieben das MPC als einen in drüsenartigen Formationen wachsenden Tumor mit schlecht definierbaren Zellgrenzen (syncytiales Wachstumsmuster). Darüber hinaus zeichnet er sich durch häufige peripankreatische Gewebsinvasion, ausgedehnte Nekrosen sowie intraepitheliale als auch stromale Lymphozyteninfiltration aus (Wilentz et al., 2000).

Genetisch unterscheidet sich das MPC vom Normaltyp-PDAC, welches meist *KRAS* mutiert ist (Bailey et al., 2016) durch den in der Hälfte der MPC-Fälle vorliegenden *KRAS*-Wildtyp (Taboada et al., 2025). Bei dem PDAC ist eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit 1–2 % sehr selten (Saad & Saikaly, 2022), während im Vergleich dazu eine Mismatch-Reparatur-Defizienz (dMMR) bzw. eine MSI beim MPC in etwa einem Drittel der Fälle vorliegt (Taboada et al., 2025). In seltenen Fällen sind Tumore des Pankreas mit histologisch medullärem Erscheinungsbild Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert (Samdani et al., 2015; Wilentz et al., 2000).

Wie auch beim PDAC korreliert die Häufigkeit eines MPCs stark mit der Prävalenz von Tumorerkrankungen bei Angehörigen ersten Grades (Wilentz et al., 2000). Allerdings konnten Taboada et al. (2025) trotz der überschaubaren Datenlage nachweisen, dass MPC-Patientinnen und -Patienten, die primär operiert wurden, ein längeres Gesamtüberleben erreichen als Betroffene mit Normaltyp-PDACs.

Aktuell gibt es keine MPC-spezifischen Leitlinien und kaum Erfahrung im klinischen Umgang mit diesem seltenen Subtyp. Jedoch scheint das FOLFIRINOX-Therapieschema beim MPC das längste Gesamtüberleben zu erreichen (de Jesus et al., 2024; Taboada et al., 2025). In einzelnen Fallberichten ist darüber hinaus auch der erfolgreiche Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei MPCs mit dMMR/MSI beschrieben worden (Andre et al., 2023; Marabelle et al., 2020; Taboada et al., 2025).

1.4 Molekularpathologie

Die Induktion einer azinär-duktaalen Metaplasie im Rahmen einer Pankreatitis ist eine der Theorien, welche als erster Schritt in Richtung der Formierung von Vorläuferläsionen, den PanINs, diskutiert wird (Wang et al., 2019). In der Pathologie werden drei Grade unterschieden (PanIN I-III). Daneben kommt es zu einer desmoplastischen Reaktion des Stromas, welche durch die Tumorzellen induziert wird. Diese unterliegt einer Entwicklung, parallel zu den PanINs. Zuerst kommt es zu einer Umstrukturierung des Bindegewebes, gefolgt von der Aktivierung von Fibroblasten und der Vermehrung der extrazellulären Matrix. Während das Stroma initial etwa 5 % des Tumorgewebes ausmacht, nimmt es mit fortschreitender Entwicklung des Tumors anteilig zu und kann final bis zu 90 % der Tumormasse bilden (Leppanen et al., 2019).

1. EINLEITUNG

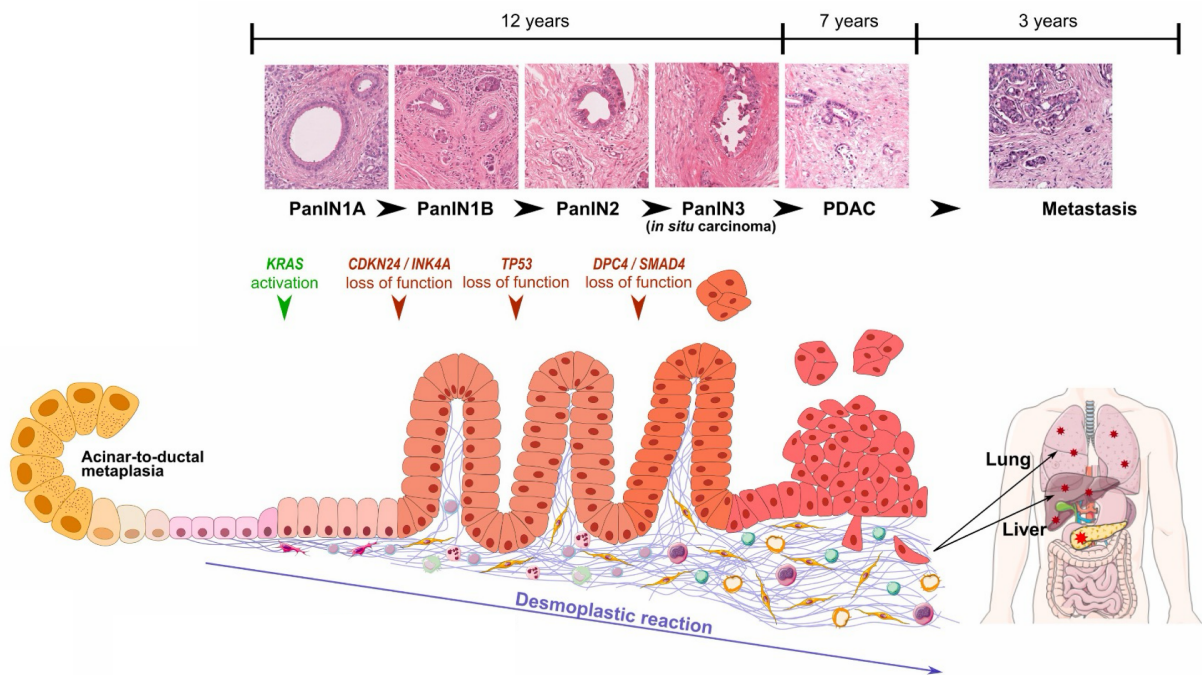


Abbildung 1: Tumorprogression (PanIN und desmoplastisches Stroma).

Anmerkung. Modifiziert von Liot et al. (2021). Schematische und mikroskopische Darstellung von gesundem und pankreatisch verändertem Pankreasgewebe. Progression von PanIN I hin zum invasiven PDAC mit entsprechender Entwicklung des desmoplastischen Stromas.

Onkogene KRAS-Mutation

Der Beginn der Tumorgenese liegt nach aktuellem Verständnis im Auftreten einer Mutation des *KRAS*-Onkogens, die in 92 % der PDACs nachzuweisen ist (Bailey et al., 2016). Dabei handelt es sich in 82 % der Fälle um eine Substitution am Codon 12, in 14 % geschieht dies am Codon 16 und in < 1 % am Codon 13 (Cox et al., 2014). Diese Codons kodieren für den Teil der katalytischen Domäne des GTPase-Transduktorproteins *KRAS*. Die katalytische Domäne dephosphoryliert *KRAS* GTP zu inaktivem *KRAS* GDP. Eine Alteration dieser GTPase führt zu einer dauerhaften Phosphorylierung von *KRAS* (*KRAS* GTP) und entsprechend zu einer dauerhaften Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege RAF/MEK/ERK und RAL-GEF. Diese wiederum führen zu einer Gewebsproliferation (Stephen et al., 2014). Eine onkogene *KRAS*-Mutation führt zu der Entstehung einer PanIN-Grad-I-Läsion. Erst der anschließende Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (*CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4*) macht eine Progression zu einem PDAC möglich (Aguirre et al., 2003).

Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4*

CDKN2A codiert für die Proteine ARF/p14 und p16/INK4A. Letzteres hat in der Pathogenese des PDACs einen größeren Einfluss und wird daher nachfolgend vorgestellt. Es handelt sich bei p16/INK4A um einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase CDK4, welche den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus

blockiert (Sherr, 2001). Auf die Mutation des *KRAS*-Onkogens folgt in der Tumorgenese meist ein Funktionsverlust von *CDKN2A*. Dieser Funktionsverlust ist elementar in der Entwicklung eines PDACs, da sonst ein nicht alteriertes p16, auch bei Vorliegen einer *KRAS*-Mutation, den Zellzyklus stoppen würde (Maitra et al., 2003). Auf Grund dieses Zusammenspiels kommt ein Funktionsverlust von *CDKN2A* beim PDAC mit 95 % ähnlich häufig vor wie eine onkogene *KRAS*-Mutation (Rozenblum et al., 1997).

TP53 codiert für den Transkriptionsfaktor p53, dieser induziert bei DNA-Schäden oder zellulärem Stress einen Zellzyklus-Arrest. Bei etwa 75 % der PDACs wurde ein Funktionsverlust dieses Gens nachgewiesen (Barton et al., 1991; Rozenblum et al., 1997).

Bei etwa 90 % der PDACs liegt ein Verlust der Heterogenität in dem *SMAD4*-Gen vor, während eine homogene Inaktivierung nur in etwa 50 % der PDACs nachweislich auftritt. *SMAD4* ist zentraler Regulator des TGF- β -Signalweges, welcher als Tumorsuppressor und -promoter agiert (Hahn et al., 1995).

Neben den zuvor angeführten Mutationen (*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4*) treten im PDAC eine Reihe weiterer variabler Mutationen auf. Diese beeinflussen vor allem die DNA-Reparatur, die Zellzyklus-Regulation, den TGF- β -Signalweg und die Chromatinmodifikation (Lennon et al., 2014).

1.5 Diagnostik

Eine große Herausforderung in der Detektion des Pankreaskarzinoms ist, dass lokal begrenzte Tumoren meist keine Symptome hervorrufen. Deshalb werden etwa 85 % der Tumoren erst im fortgeschrittenen, nichtoperablen Stadium entdeckt (Keane et al., 2014). In fortgeschrittenen Stadien ist das 5-Jahres-Überleben gering (regional fortgeschritten: 14,7 %, metastatisch: 3,1 %) (Keane et al., 2014).

Wenn der Tumor allerdings früh entdeckt wurde und lokal begrenzt war, lag das relative 5-Jahres-Überleben in den USA, laut der Überlebensanalyse „*Surveillance, Epidemiology, and End Results*“ des National Cancer Instituts, zwischen 2013 und 2019 bei 44,3 % (National Cancer Institute, 2022) (Die Daten wurden am 08.05.2023 abgerufen). Der Weiterentwicklung der Früherkennung kommt damit eine tragende Rolle in der klinischen Forschung zu.

Zu den ersten Symptomen der fortgeschrittenen Erkrankung zählen Oberbauchschmerzen, Rückenschmerzen, der schmerzlose Ikterus sowie Gewichtsverlust. Frühe Stadien der Erkrankung werden meist als Zufallsbefund entdeckt. Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom kommen unterschiedliche diagnostische Verfahren zum Einsatz. Zuerst wird ein Staging mittels Kontrastmittel-

unterstützter Computertomografie (CT) durchgeführt. Die Sensitivität bei Tumoren mit einer Größe von < 2 cm liegt allerdings nur bei 65 % (Chang et al., 2017). Die Diagnostik kann bei Bedarf mittels Magnetresonanztomografie bzw. Magnetresonanztomografie-Cholangiopankreatikografie, Ösophagogastroduodenoskopie und Positronenemissionstomografie in Kombination mit der Computertomografie komplementiert werden. Die Diagnose kann mittels endosonografisch gestützter Feinnadelaspiration oder diagnostischer Laparoskopie histologisch gesichert werden (Seufferlein et al., 2022). Die Tumormarker CEA und CA19-9 sind meist nur bei fortgeschrittener Erkrankung nachzuweisen (Seufferlein et al., 2022).

1.6 Therapie

Die Grundsäulen der Therapie des PDACs stellen die Operation und die Chemotherapie dar. Abbildung 2 illustriert die klinische Einteilung der Stadien mittels Bildgebung, von der das therapeutische Vorgehen abhängig ist. Diese Einteilung ist eng mit einer Prognose für das Überleben verbunden.

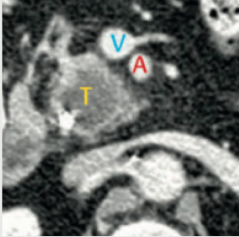
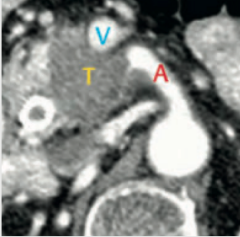
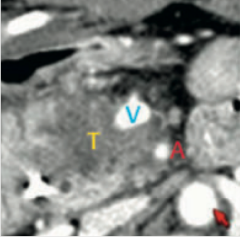
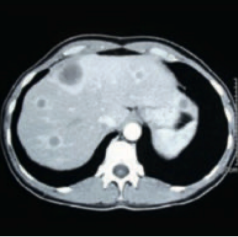
				
Inzidenz	20%	5–10%	20%	50–60%
tumorbedingte Veneninfiltration/ Metastasen	keine/geringe tumorbedingte Veneninfiltration	moderate tumorbedingte Veneninfiltration	ausgeprägte tumorbedingte Veneninfiltration	metastasiert
Resektabilität	resektabel	borderline	irresektabel	keine Resektion
erreichbarer R-Status	R0	R1 wahrscheinlich	R2 wahrscheinlich	R2
Rolle primärer OP	gut	suboptimal	kein Benefit	kein Benefit
Überleben	20–24 Monate	abhängig von Resektabilität	9–15 Monate	6–12 Monate

Abbildung 2: Stadieneinteilung des PDACs (cT1–cT4) anhand der Bildgebung und Prognose

Anmerkung. Übernommen von Belyaev and Uhl (2019). Vena mesenterica superior (V), Arteria mesenterica superior (A), und Tumor (T).

Die Entscheidung welche Therapie gewählt wird hängt neben dem Tumorstadium (s. Abbildung 2) auch von der physischen Verfassung der Patientin oder des Patienten ab. Letztere wird mittels des *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) Performance-Status objektiviert. Das Zusammenspiel von chirurgischer und medikamentöser Therapie, abhängig von Tumorstadium und ECOG Performance-Status, folgt einem Behandlungsalgorithmus, wie er in Abbildung 3 dargestellt ist.

1. EINLEITUNG

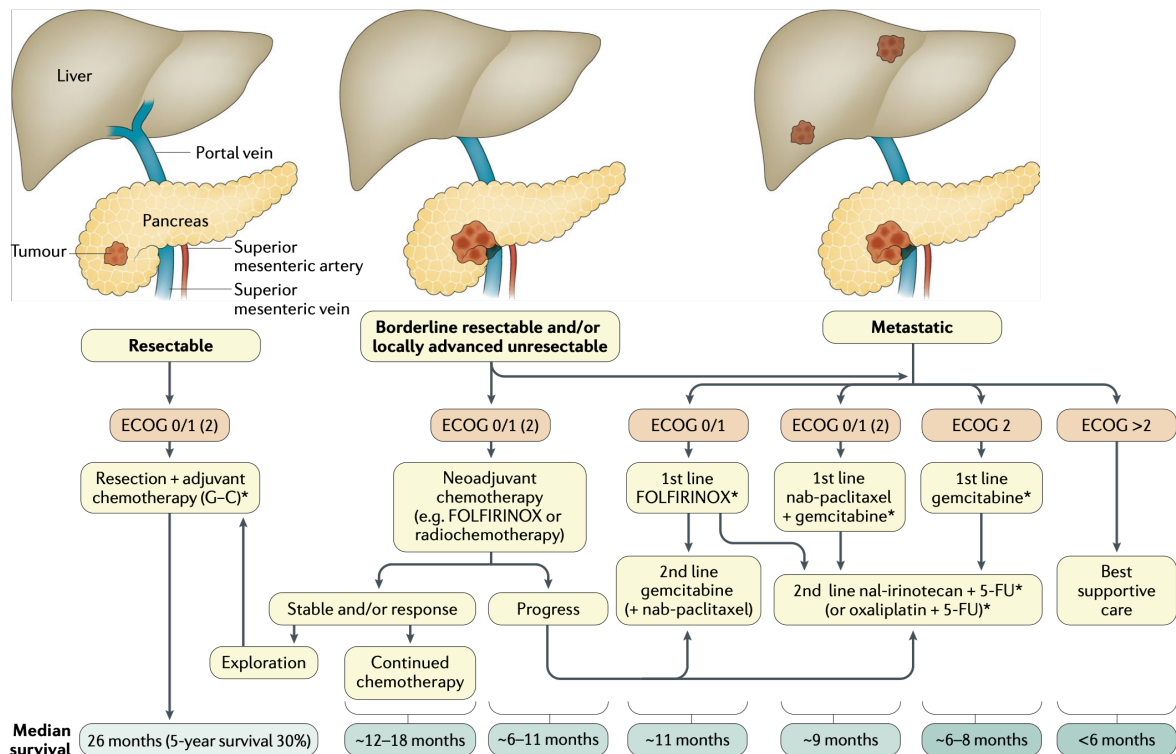


Abbildung 3: Behandlungsalgorithmus des PDACs

Anmerkung. Übernommen von Neoptolemos et al. (2018). Der Behandlungsalgorithmus ist abhängig von dem Tumorstadium und dem Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance-Status.

1.6.1 Chirurgie

Trotz massiver Bemühungen in der Entwicklung neuer medikamentöser Therapien, stellt die radikale operative Resektion bis heute die einzige Chance auf Heilung dar (Wei & Hackert, 2021). Allerdings ist der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose lediglich bei etwa 20 % der Patientinnen und Patienten resektabel (Kleeff et al., 2016). Verbesserungen in der chirurgischen Therapie des PDACs sind vor allem der Einführung neuer operativen Herangehensweisen zuzuschreiben, wie *Artery First Approach*, *Uncinate Process First*, *Triangle Operation* und weiteren (Wei & Hackert, 2021). Durch die Einführung einer adjuvanten Chemotherapie nach erfolgter Primärresektion konnte das Überleben von 30 Monaten auf 54 Monate und das 5-Jahres-Überleben auf etwa 30 % gesteigert werden (Conroy et al., 2018; Neoptolemos et al., 2012). Somit ist eine adjuvante Chemotherapie, auch nach erfolgreicher R0-Resektion, zwingend notwendig.

1.6.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie wird in der Behandlung des PDACs unter anderem als neoadjuvante Therapie eingesetzt, um bei einem initial nicht operablen, lokal fortgeschrittenen Karzinom ein *Downstaging* zu erreichen und den Tumor dann sekundär resektieren zu können. Weitaus häufiger wird die Chemotherapie als adjuvante Therapie, also nach erfolgreicher Operation, eingesetzt. Bei fortgeschrittenen Befunden, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose schon Metastasen vorliegen, wird eine palliative Chemotherapie angestrebt (Erstlinientherapie). Sollten sich im Verlauf nicht beherrschbare Nebenwirkungen einstellen oder der Tumor auf die Behandlung nicht ansprechen, wird auf die so genannte Zweitlinientherapie ausgewichen.

In der S3-Leitlinie (Seufferlein et al., 2022) werden aktuell unter anderem folgende medikamentöse Therapieoptionen für das PDAC aufgeführt: Gemcitabin-Monotherapie, Gemcitabin und Paclitaxel, Gemcitabin und Erlotinib sowie FOLFIRINOX. Nachfolgend werden die Wirkmechanismen der Substanzen sowie klinische Studien, welche maßgeblich zur Implementierung dieser Therapieregime in die Leitlinie beitrugen, vorgestellt. Die *in vitro*-Chemosensitivitätstestung, die in dieser Arbeit an den fünf Zelllinien durchgeführt wurde, sollte evaluieren, ob sich die Wirkung der etablierten Chemotherapie-Regime auf die MPC-Zelllinie von der Wirkung auf Normaltyp-Zelllinien unterschied.

Gemcitabin-basierte Therapien

Die Gemcitabin-Monotherapie ist, seitdem Burris et al. (1997) beweisen konnten, dass Gemcitabin der bis dahin etablierten 5-Fluorouracil (5-FU) Monotherapie in der Behandlung des PDACs überlegen war, die Standardtherapie des PDACs. Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin, dFdC) ist ein Cytidinanalogon und *Prodrug*, welches intrazellulär zu den zytotoxischen Metaboliten Gemcitabin-Diphosphat und -Triphosphat phosphoryliert (dFdCTP) wird (Heinemann et al., 1988). Die zytostatische Wirkung beruht vor allem auf der Hemmung der DNA-Synthese. Dabei wird einerseits die DNA-Polymerase von dFdCTP gehemmt und andererseits wird dFdCTP anstelle des Nukleosides Cytidin in die DNA eingebaut, was die Replikation unmittelbar beendet (Heinemann et al., 1988). Dadurch, dass dFdCTP nun das terminale Ende des DNA-Stranges bildet, kann dieser Replikationsfehler nicht durch die DNA-Reparaturenzyme erkannt werden (Gandhi et al., 1996). Zu den Nebenwirkungen gehören unter anderem Haarausfall, Nausea, Emesis, Mukositis, Myelosuppression, Niereninsuffizienz und Neuropathien (Ciccolini et al., 2016).

Gemcitabin und nab-Paclitaxel (Gem-Pac)

Um die Effektivität der Gemcitabin-Monotherapie zu steigern, wurden Gemcitabin-basierte Kombinationstherapien entwickelt, unter anderem Gemcitabin in Kombination mit *nano albumin bound* Paclitaxel (nab-Paclitaxel). Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane. Es bindet während der Mitose an das Beta-Tubulin und verhindert den Abbau der Mikrotubuli (Schiff & Horwitz, 1980). Paclitaxel wird in der pharmakokinetisch günstigeren Form des nab-Paclitaxel eingesetzt. Es hat unter anderem den Vorteil, dass es eine bessere Löslichkeit besitzt. Dadurch werden höhere Konzentrationen im Tumorgewebe erreicht (Desai et al., 2006). Die Nebenwirkungen sind vergleichbar zu denen von Gemcitabin, abgesehen von der Niereninsuffizienz welche nicht durch nab-Paclitaxel bedingt wird (Yardley, 2013).

Die AFACT-Studie (Tempero et al., 2022) verglich die Gemcitabin-Monotherapie mit der Kombinationstherapie GemPac. Es wurden 866 Patientinnen und Patienten, die zuvor primär reseziert wurden (R0 oder R1), entweder mit nab-Paclitaxel oder der Gemcitabin-Monotherapie adjuvant behandelt. Das Kombinationsregime erzielte ein signifikant höheres medianes Gesamtüberleben von 41,8 Monaten im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 37,7 Monaten.

Gemcitabin und Erlotinib (Gem-Erlo)

Ein großer Fortschritt in der Onkologie des letzten Jahrzehntes ist die Entwicklung sogenannter gezielter Therapien (*targeted therapies*) und deren Implementierung in die Patientenversorgung. Deren Vorteil ist, dass sie bedeutend weniger Nebenwirkungen als klassische Chemotherapeutika hervorrufen, dadurch besser verträglich sind und eine höhere Lebensqualität für die Betroffenen bedeuten. Beim PDAC scheiterten allerdings zielgerichtete Medikamente wie Cetuximab, Bevacizumab, Sorafenib, Axitinib, Aflibercept, welche sich bei anderen soliden Tumoren als Therapieoption etabliert haben (Lambert et al., 2017).

Die einzige gezielte Therapie, welche bisher beim PDAC in klinischen Studien ein längeres Gesamtüberleben erzielte, ist der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Inhibitor Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin (Seufferlein et al., 2022). In einer kanadischen Phase-III-Studie (Moore et al., 2007) wurden 569 Patientinnen und Patienten mit nicht operablem PDAC entweder mit der Kombinationstherapie GemErlo oder der Gemcitabin-Monotherapie als Erstlinientherapie behandelt. Die Gruppe, welche die Kombinationstherapie erhielt, erreichte ein längeres Gesamtüberleben (6,24 zu 5,91 Monaten). Die Stärke des Erlotinib induzierten Hautausschlages korrelierte mit einem längeren Gesamtüberleben. Interessanterweise konnten Moore et al. (2007) keine statistisch signifikante

Korrelation zwischen dem EGFR-Expressionsstatus des Tumors und dem Ansprechen auf die Kombinationstherapie nachweisen.

Der epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR ist beim PDAC in 30 bis 89 % der Fälle überexprimiert (Nedaeinia et al., 2014). Eine solche Überexpression korreliert zwar mit einer höheren Differenzierung der Tumore, sie hat allerdings keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Grapa et al., 2019).

Erlotinib bindet als ein Tyrosinkinase-Inhibitor an die intrazelluläre Kinasedomäne des transmembranen Glykoproteins EGFR (Grunwald & Hidalgo, 2003). Die blockierte Signalübertragung resultiert in einer Hemmung der nachgeschalteten Signalkaskaden, zu denen unter anderem RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT und JAK/STAT gehören, welche das Zellwachstum und die Zellproliferation stimulieren (Ciardiello & Tortora, 2008). Die Blockade dieser Signalwege kann zu einem Zellzyklus-Arrest führen oder auch die Apoptose induzieren. Zu den Nebenwirkungen gehört eine typische Hautreaktion, welche mit dem Ansprechen auf Erlotinib korreliert (Moore et al., 2007; Zeng et al., 2018).

FOLFIRINOX

Einer der bedeutendsten Fortschritte in der Entwicklung neuer Chemotherapie-Regime der letzten Jahre war die Entwicklung des FOLFIRINOX-Regimes (FOL: Folinsäure, F: 5-Flourouracil (5-FU), IRIN: Irinotecan, OX: Oxaliplatin). Um die Toxizität des FOLFIRINOX-Regimes zu verringern, wird häufig eine modifizierte Variante (mFOLFIRINOX) angewendet. Dabei wird entweder die Dosis von Irinotecan verringert oder auf den 5-FU-Bolus verzichtet.

5-FU ist die Hauptkomponente des FOLFIRINOX-Regimes. Dessen zytotoxischer Effekt basiert auf zwei Mechanismen. Einerseits bindet der aktive Metabolit 5-Fluor-dUMP an die Thymidylat-Synthetase, was zu einer Hemmung der DNA-Synthese und dem Zelltod führt. Andererseits wirkt 5-FU als Antimetabolit, dabei wird der phosphorylierte Metabolit 5-Fluor-UTP anstelle von der Pyrimidinbase Uracil in die RNA eingebaut, welches zu Fehlern beim Ablesen der RNA führt (Schilsky, 1998). Zu den Nebenwirkungen zählen Nausea, Emesis, Mukositis und Myelosuppression. Auch können 5-FU-Metabolite neuro- und kardiotoxisch wirken und mitunter einen koronaren Vasospasmus auslösen (Sorrentino et al., 2012). Die Wirkung von 5-FU kann durch die Kombination mit Folinsäure verstärkt werden, indem die Folinsäure die Thymidylat-Synthetase bindet und somit die Thymidylat-Konzentration senkt (Zoetemelk et al., 2020).

Irinotecan oder auch CPT-11 ist ein Inhibitor der Topoisomerase-I und hemmt die DNA-Synthese. Es kommt zu Doppelstrangbrüchen, welche zu einem Abbruch der Replikation und zur Apoptose führen. Zu den Nebenwirkungen zählen unter anderem Haarausfall, Nausea, Emesis, Diarrhöen,

Verstopfungen und Myelosuppression. Dosislimitierend sind vor allem die Neutropenie und schwere Diarrhöen (Kciuk et al., 2020).

Bei Oxaliplatin handelt es sich um eine Platin-Verbindung, deren zytostatische Wirkung auf der Bildung von DNA-Platin-Intrastrang-Addukten beruht. Werden diese nicht repariert, kommt es zu einer Blockade der DNA-Replikation und Translation, sodass schlussendlich der programmierte Zelltod eingeleitet wird (Seetharam et al., 2009). Zu den Nebenwirkungen zählen unter anderem Haarausfall, Nausea, Emesis, Mukositis, Myelosuppression und die periphere sensorische Neuropathie (Misset, 1998).

Die ACCORD11/PRODIGE4-Studie (Conroy et al., 2011) verglich das FOLFIRINOX-Regime mit der bis dahin etablierten Gemcitabin-Monotherapie bei 342 Patientinnen und Patienten im metastasierten Stadium. Das Ergebnis war ein signifikant höheres medianes Gesamtüberleben der FOLFIRINOX-Gruppe (11,1 zu 6,4 Monaten). Die im Jahr 2018 veröffentlichte *PRODIGE 24/CCTG PA.6*-Studie (Conroy et al., 2018) zeigte, dass FOLFIRINOX der Gemcitabin-Monotherapie auch in der adjuvanten Therapiesituation, bezogen auf das Gesamtüberleben, überlegen war. Die Studie schloss 493 Patientinnen und Patienten nach makroskopisch totaler Resektion ein. Es zeigte sich ein signifikant höheres medianes Gesamtüberleben bei der mFOLFIRINOX-Gruppe mit 54,5 Monaten im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 34,8 Monaten.

1.7 Chemoresistenz

Selbst im besten Falle (frühe Detektion des Tumors, Operation mit R0-Resektion und adjuvanter Chemotherapie) sterben die meisten Patientinnen und Patienten an einem Lokalrezidiv (Labori et al., 2016). Die Ursachen dieser schlechten therapeutischen Ergebnisse liegen unter anderem in unentdeckten Mikrometastasen und der Resistenz der PDAC-Zellen gegen die verwendeten Chemotherapeutika (Zeng et al., 2019).

Die Chemoresistenz besteht nach Chand et al. (2016) aus einem extrinsischen Element, der Hypoxie induzierten Chemoresistenz und einem intrinsischen Element, zu dem somatische Mutationen und die posttranskriptionelle Genregulation zählen.

Das desmoplastische Stroma komprimiert durch seine hohe Dichte Blutgefäße, welche den Tumor versorgen. Es dient als physikalische Barriere für den Transport von Chemotherapeutika hin zu den Tumorzellen (Feig et al., 2012). Dadurch entsteht ein hypoxisches Milieu mit geringem Sauerstoffpartialdruck und niedriger Glukosekonzentration (Koong et al., 2000). Der sich daraus ergebende Selektionsdruck fördert das Wachstum der am aggressivsten wachsenden Zellklone des

Tumors (Anderson et al., 2006). Diese Tumorzellen zeigen darüber hinaus die höchste Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Chand et al., 2016; Vineis et al., 2010).

Der Mechanismus der PDAC-Chemoresistenz durch somatische Mutationen ist noch weitestgehend ungeklärt (Chand et al., 2016). Es wird allerdings vermutet, dass durch die Konfrontation der Zellen mit der Chemotherapie ein so starker Selektionsdruck entsteht, dass Pro-Überlebens-Mutationen erworben werden (Chand et al., 2016). Ein Beispiel dafür wären sekundär erworbene Mutationen als Antwort auf die gezielte EGFR-Therapie mit Erlotinib, wie sie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom auftreten (Nurwidya et al., 2014).

Darüber hinaus gibt es komplexe Resistenzmechanismen gegen die jeweiligen Chemotherapeutika. Initial sprechen die Tumoren zwar häufig auf die Behandlung an, über die Zeit entwickeln sie allerdings Resistenzmechanismen, in deren Folge es zur Rezidiven kommt (Zeng et al., 2019). Besonders häufig ist dies bei Gemcitabin zu beobachten (Zeng et al., 2019).

1.8 Tumormodelle

Trotz großer Fortschritte in der chirurgischen sowie medikamentösen Behandlung des PDACs ist die Prognose weiterhin ausgesprochen schlecht (siehe oben). Die Patientinnen und Patienten erleiden trotz Chemotherapie in den meisten Fällen einen Rückfall, häufig in der Form eines Lokalrezidivs (Ratnayake et al., 2020). Auch konnten, trotz massiver Bemühungen in der Grundlagenforschung des PDACs, bisher viel zu selten präklinische Forschungsergebnisse, wie beispielsweise neue gezielte Tumorthérapien, erfolgreich in die Patientenversorgung implementiert werden (Logsdon et al., 2015). Denn während beispielsweise gezielte Tumorthérapien bei anderen Tumorentitäten das Überleben maßgeblich verbessern konnten (Kornek & Selzer, 2009), ist ein solcher Durchbruch beim PDAC nicht zu beobachten (Di Federico et al., 2022).

Wenn allerdings das Patientenkollektiv sorgfältig ausgewählt wird, können diese neuartigen Therapieansätze beim PDAC möglicherweise doch erfolgreich eingesetzt werden. Denn ein vielversprechender Ansatz besteht darin, im Rahmen der Präzisionsonkologie ausgewählten Patientinnen und Patienten mit Tumoren, welche besondere Eigenschaften aufweisen, diese innovativen Therapien zukommen zu lassen. Dies könnte beispielsweise bei immunogenen Tumoren oder solchen mit spezifischen Mutationen der Fall sein. Solche Eigenschaften sind beim PDAC die Ausnahme und können häufig nur bei bestimmten histologischen Subtypen, wie dem MPC, gefunden werden. Präklinische Modelle des MPCs werden daher benötigt, um die Effektivität dieser modernen Therapien zu untersuchen und auch um die Wirksamkeit herkömmlicher Chemotherapie-Regime zu evaluieren. Die Entwicklung des ersten MPC-Tumormodells in Form einer 2D-Zelllinie stellt einen

bedeutenden ersten Schritt dar, um zumindest einem Teil der PDAC-Betroffenen innovative Therapieoptionen zu bieten und möglicherweise eine verbesserte Prognose zu erreichen.

2D-Zelllinien

Die erste Zelllinie wurde 1951 aus einem Cervixkarzinom entwickelt, während hingegen die erste PDAC-Zelllinie erst ein Jahrzehnt später etabliert werden konnte (Dobrynin, 1963). 2D-Zelllinien wachsen als homogener *Monolayer* auf dem Boden von Kulturflaschen. Ein Vorteil dieses Tumormodell ist, dass es kosteneffektiv und einfach zu handhaben ist. Darüber hinaus eignen sich 2D-Zelllinien gut für Hochdurchsatzscreenings, sie sind genetisch modifizierbar und eignen sich für Mechanismus-orientierte Forschung (Yu et al., 2021).

Werden Zelllinien direkt aus dem Material des Primarius entwickelt, werden sie als primäre Zelllinien bezeichnet. Sekundäre Zelllinien werden hingegen aus PDX-Modellen etabliert. Zur Generierung eines PDX-Modells wird eine Probe des Primärtumors der Patientin oder des Patienten in eine immunsupprimierte Maus xenotransplantiert. Es wird zwischen orthotoper und subkutaner Transplantation der Tumorseite unterschieden. Der in der Maus gewachsene Tumor wird dann nach dem Erreichen einer spezifischen Größe wieder explantiert und kann in eine weitere Maus transplantiert werden.

Typisch für die Morphologie von PDAC-Zelllinien ist, dass sie meistens aus epithelartigen Zellen bestehen. Ein paar wenige Zelllinien weisen allerdings eine Mischung aus epithelartigen und spindelförmigen Tumorzellen auf (z.B. MIA PaCa-2, PK-59 und PK-45P) (Shichi et al., 2022).

In der Wissenschaft sind aktuell etwa 15 PDAC-Zelllinien weit verbreitet (Rückert et al., 2012). Viele dieser Zelllinien wurden dabei aus Metastasen oder besonders schnell wachsenden Tumoren etabliert (z.B.: AsPC-1, Capan-2, BxPC-3) (Dennaoui et al., 2021). Langsam wachsende Varianten sind demnach unterrepräsentiert. Das PDAC besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und Zellklone. Wird aus einem solchen heterogenen Tumor eine Zellkultur etabliert, setzt sich in der Regel eine Subpopulation schnell wachsender Klone durch. Das ist wahrscheinlich einer der Gründe, weshalb es zu Abweichungen im Mutationsrepertoire zwischen dem eigentlichen Tumor und der daraus etablierten Zelllinie kommt (Gillet et al., 2013). Hinzu kommt, dass an Zelllinien entwickelte therapeutische Ansätze sich auf lediglich einen der vielen Zellklone fokussieren und einen Großteil der heterogenen Tumormasse nicht berücksichtigen (Masters, 2000). Darüber hinaus haben an Zelllinien durchgeführte Chemosensitivitäts-Screenings nur eine inkonsistente Vorhersagekraft für das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie (Voskoglou-Nomikos et al., 2003). Die langen Kulturzeiten der permanenten Zelllinien sowie das häufige Passagieren führen dabei zu einem genetischen Drift (Kato et al., 1999;

McQueen et al., 1991). Dieser ist durch die genetische Instabilität von Tumor-Zelllinien bedingt, welche die Reproduzierbarkeit von Zellkultur-Experimenten beeinträchtigen kann (Quevedo et al., 2020). Trotz der Limitationen dieses Modells gibt es einen Bedarf an neu etablierten, genetisch diversen Zelllinien, welche direkt basierend auf dem Primärtumor der Patientin oder des Patienten etabliert werden sollten.

Ausgewählte Oberflächenmarker von PDAC-Zelllinien

PDAC-Zelllinien exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, welche die Eigenschaften der Zellen mitbestimmen. Im Rahmen einer umfassenden Charakterisierung können diese durchflusszytometrisch detektiert werden.

Bei dem *programmed death-ligand 1* (PD-L1) handelt es sich um den Liganden des *programmed cell death-protein 1* (PD-1). Ist PD-L1 auf Tumorzellen überexprimiert, kommt es zu einer Bindung von PD-L1 mit dem auf den T-Zellen exprimierten PD-1, welches in der Folge unter anderem zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation und damit zur Immunevasion führt. Therapeutisch kann PD-1 durch Checkpoint-Inhibitoren, wie zum Beispiel den Antikörper (AK) Pembrolizumab, gehemmt werden (Han et al., 2020).

Bei CD326 (EpCAM) handelt es sich um ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, welches als dominantes Oberflächenantigen auf CRC-Zellen bekannt ist. Im gesunden Pankreasgewebe kommt es ebenfalls vor und wird im PDAC überexprimiert (Patriarca et al., 2012). Bei CD66 oder CEA handelt es sich um einen Tumormarker, der auch klinisch Verwendung findet (Beauchemin & Arabzadeh, 2013).

Der *major histocompatibility complex 1* (MHC-1) oder auch humanes Leukozytenantigen 1 präsentiert zelleigene Peptide, die beim Proteinabbau in der Zelle entstehen, unter anderem den CD8+ T-Lymphozyten. Bei Pankreaskarzinomen kann es zu der selektiven Autophagie von MHC-1 kommen, welches dann einen Mechanismus der Immunevasion darstellt (Yamamoto et al., 2020) sowie einen Mechanismus der Resistenz gegenüber anti-PD-1-Therapie (Sade-Feldman et al., 2017).

MHC-2 findet sich auf antigenpräsentierenden Zellen und präsentiert den CD4+ T-Lymphozyten Protein- und Peptidfragmente. Die Expression von MHC-2 auf Tumorzellen geht mit einer erhöhten intratumoralen Entzündungsreaktion einher (Gaida et al., 2012) und kann darüber hinaus auch für Neoantigen-basierte Immuntherapien genutzt werden (Baleeiro et al., 2022).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz massiver Bemühungen in der Grundlagenforschung des PDACs gelingt es bisher kaum präklinische Forschungsergebnisse erfolgreich in die Patientenversorgung zu implementieren. Daher werden dringend neue Tumormodelle benötigt, welche die Heterogenität des PDACs abbilden.

Mit den bisher etablierten Therapieoptionen wurden in den letzten Jahren kaum Fortschritte in der Verbesserung des Überlebens beim PDAC erreicht. Aktuell wird die Onkologie vor allem im Bereich der sogenannten personalisierten Onkologie weiterentwickelt. Diese zielt unter anderem darauf ab, seltene Subtypen und spezielle Mutationen zu identifizieren und die jeweiligen Patientinnen und Patienten mit individuellen Behandlungsansätzen zu therapieren. So könnte zumindest für den kleinen Teil von seltenen PDAC-Fällen ein besseres Gesamtüberleben erreicht werden. Für die Entwicklung dieser zielgerichteten Therapien sind entsprechende präklinische Modelle notwendig. Für das seltene MPC gab es bis jetzt kein solches Modell.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von fünf Zelllinien aus gesammelten Tumorproben der BioBank Rostock einschließlich eines MPCs. Im Fokus sollte dabei der Vergleich der MPC-Zelllinie HROP68Tu2 zu vier Normaltyp-PDAC-Zelllinien stehen, um etwaige Unterschiede aufzuzeigen. Dafür wurden einerseits grundlegende Eigenschaften wie Verdopplungszeiten und Migrationsverhalten untersucht, aber auch die Expression einer großen Anzahl an Oberflächenantigenen, zu denen Tumormarker, Proteine für die Zell-Zell-Interaktion, Chemoresistenz sowie Immunogenität und Immunsuppression gehörten. Anschließend wurde das Ansprechen der MPC-Zelllinie HROP68Tu2 auf klinisch etablierte Therapieregime (FOLFIRINOX, Gemcitabin-Monotherapie, GemPac und GemErlo) untersucht und mit dem der Normaltyp-PDAC-Zelllinien verglichen. Abgerundet wurde die Charakterisierung durch eine Exom-Sequenzierung aller fünf Fälle und einer Analyse der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) von HROP68.

Mit dem ersten MPC-Modell können nun die Eigenschaften dieses Tumor mit denen des PDACs besser verglichen werden und erste präklinische Rückschlüsse auf das Therapieansprechen gewonnen werden. Perspektivisch kann die Charakterisierung als Grundlage weiterer Forschungsbemühungen dienen und dazu beitragen, neue Therapieansätze für das seltene MPC zu entwickeln und womöglich ein längeres Überleben der Erkrankten zu erzielen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
6-Well-Platte, steril, mit Deckel	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt
Microplate, 96 well, PS, U-Bottom, clear	Greiner Bio-one (Kremsmünster, AT)
24-well-plate, flat bottom, polystyrene, 1,86 cm ² , steril	TPP (Trasadingen, CH)
TC-Flasche, Stand., Vent. Cap (T25, T75, T175)	Sarstedt
Röhre (15 ml, 50 ml) PP	Sarstedt
Sarstedt Serological Pipette (2ml, 5ml, 10ml)	Sarstedt
Pasteur Pipettes, glass unplugged	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen farblos (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt
5000µl Gilson-Type Graduated Macro Tip	Starlabgroup (Hamburg, DE)
TipOne Repeat Dispenserpipettenspitzen (steril) (2,5 ml, 5ml)	Starlabgroup
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß braun (0,5ml, 1,5ml)	Sarstedt
CryoPure Gefäß 1,6ml, weiß	Sarstedt
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific
Röhre, 5 ml, 75 x 12 mm	Sarstedt
Röhrchen, 1,3ml, PP, 8,5/44 mm, runder Boden	Greiner Bio-one
Deep Well Plate	Sarstedt
96-Well-Multiply Half-Skirt	Sarstedt
96-Well-PCR-Platte(n)	Sarstedt
2ml Tubes mit Teflonkügelchen	Sarstedt
1,5ml SafeSeal Micro Tubes (DNase; RNase frei)	Sarstedt
PerfectBind® DNA Column	PeqLab Biotechnologie (Erlangen, DE)
8ter PCR stripes	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, DE)
Collection Tubes	Sarstedt

Tabelle 3: Geräte

Geräte	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank	Memmert (Schwabach, DE)
Sicherheitswerkbank S@FEFLO 1.2	BIO AIR (Pero, IT)
Sicherheitswerkbank MSC 1.2	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskopkamera Axiocam 105 color	Carl Zeiss
Mikroskop CKX41	Olympus (Tokio, JP)
Heizplatte	Gestigkeit (Düsseldorf, DE)
Wasserbad WNE 7	Memmert
Zentrifuge ROTINA 420R	Hettich (Tuttlingen, DE)
Zentrifuge MIKRO 200	Hettich
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kühlschrank (4 °C, –20 °C, –80 °C)	Liebherr (Bulle, CH)
PIPETBOY acu 2 Integra	INTEGRA (Biebertal, DE)
Vakuumpumpe VACUSAFE	INTEGRA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen, DE)
Pipetman-Pipetten	Gilson (Middleton, WI, USA)
Research® plus Pipetten	Eppendorf (Hamburg, DE)
Research® plus Mehrkanalpipetten	Eppendorf
HandyStep	BRAND (Wertheim, DE)
HandyStepS	BRAND
VORTEX GENIE 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
ROCKER 3D digital Shaker	IKA (Staufen, DE)
FACS Calibur™	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)
Gelelektrophoresekammer Biometra	Analytik Jena (Jena, DE)
Magnetrührer IKA RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)
KERN EW150-3M	Kern&Sohn (Balingen, DE)
PH-Meter wtw inoLab pH 720	Wtw (Weilheim, DE)
PCR UV ³ /HEPA Cabinet	Analytik Jena GmbH (Jena, DE)
Heizblock HBT-1-131	Haep Labor Consult (Bovenden, DE)
MyCycler™ thermal cycler	BIO RAD (Hercules, CA, USA)
BIO-PRINT ST4	VILBER LOURMAT (Collégien, FR)
Tecan Infinite 200 Pro	Tecan Group AG (Männedorf, CH)
CTL ImmunoSpot S5 UV Analyzer	ImmunoSpot (Cleveland, OH, USA)
Homogenisator Precellys®	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, DE)
ThermoMixer	Eppendorf
Gelelektrophorese	Analytik Jena GmbH
NanoDrop1000	Peqlab Biotechnologie
Bio-Print St4	VILBER LOURMAT
3500 Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)

Tabelle 4: *Chemikalien und Reagenzien*

Produktbezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS)	PAN-Biotech (Aidenbach, DE)
Medium DMEM/F12, w: L-Glutamine, w: 1,2g/L NaHCO ₃	PAN-Biotech
L-Glutamine 200nM	PAN-Biotech
Fetal Calf Serum (FCS)	PAN-Biotech
Trypsin / EDTA, 0,05 % / 0,02 % in PBS	PAN-Biotech
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt, DE)
Trypanblau	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kristallviolett	Carl Roth
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)	Carl Roth
Ethanol 96 Vol.% (vergällt)	WALTER CMP (Kiel, DE)
Bacillol	Hartmann
Albumin Fraktion V, Protease frei	Carl Roth
Natrium Chlorid (NaCl)	Carl Roth
Kalium Chlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, DE)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Proteinase K, (20mg/ml)	Bioron (Ludwigshafen, DE)
RNase A (20mg/ml)	Roboklon (Berlin, DE)
100% EtOH, unvergällt	Morphisto (Offenbach am Main, DE)
DEPC-Wasser	Carl Roth
Agarose	Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
100 bp – DNA Ladder	Applied Biosystems
Bromophenolblau-Natriumsalz	Applichem
10x Complete Buffer	Bioron
dNTPs	Promega (Madison, USA)
DSF-Taq Polymerase	Bioron
GeneScanTM-500 LIZTM Size Standard	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
Glycerin (50%)	Merck
Xylencyanol FF	Applied Biosystems
GeneScanTM-500 LIZTM Size Standard	Applied Biosystems
highly deionized formamide (HiDi)	Applied Biosystems

Tabelle 5: Ausgewählte Ansätze für die DNA-Isolation und PCR

Ansatz	Komponenten	Volumen [μl]
TE-Puffer	Tris-HCL pH 8,0 (10 mM)	0,6
	EDTA (1mM)	6.000
DNA-Lysemix	DNA-Lyse Puffer-T	400
	Proteinkinase K	20
	RNase A	15
PCR-Mastermix	10xPCR-Puffer	2,5
	dNTP's (10 mM)	0,5
	forward Primer (10 pMol/μl)	0,5
	reverse Primer (10 pMol/μl)	0,5
	Taq Polymerase	0,2
	destilliertes Wasser	150,4
PCR-Mix (pro Reaktion 11,5 μl)	gDNA	1
	10xPCR-Puffer complete	1,35
	dNTP-Mix	0,25
	Primer-Mix	2,0
	DSF-Taq Polymerase	0,1
	DEPC-Wasser	7,9

Tabelle 6: Medikamente

Wirkstoff	Konzentration [mM]	Molekulargewicht [g/mol]
Folinsäure	21,12	473,33
Fluorouracil	385	130,08
Irinotecan	34,09	586,68
Oxaliplatin	12,58	397,28
Gemcitabin	263,2	263,20
Paclitaxel	7,027	853,90
Erlotinib	20	393,44

Anmerkung. Alle Wirkstoffe wurden von der Apotheke der Universitätsmedizin Rostock bezogen.

Tabelle 7: Kits

Kit	Hersteller
PlasmoTest™-Mycoplasma Detection Kit	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
Safety Line „Tissue DNA KITS“	peqLab

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Ansatz	AK	Spezies	Isotyp	Clone	Label	Hersteller
2	Anti-Human	Maus	IgG1	PPV-06	FITC	Immunotools (Friesoythe, DE)
3	Anti-Human	Maus	IgG1	PPV-06	PE	Immunotools
4	Anti-Human	Maus	IgG1	PPV-06	APC	Immunotools
5	Anti-Maus	Kaninchen	IgG	Poli-klonal	FITC	Dako, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
6	Anti-Human	Ziege	IgG	Poli-klonal	FITC	Bethyl (Montgomery, TX, USA)
7, 12	CD66adecb, CEA	Maus	IgG1	6G5j	FITC	Immunotools
8	CD13, AP-N	Maus	IgG1	WM15	PE	Immunotools
9	CD227, MUC-1	Maus	IgG1	MOPC-21	APC	Biolegend (San Diego, CA, USA)
10	CD54, ICAM1	Maus	IgG2b	1H4	FITC	Immunotools
	CD15	Maus	IgM	MEM-158	PE	Immunotools
	MHC I	Maus	IgG2a	W6/32	APC	Immunotools
11	CD86, B7-2	Maus	IgG1	BU63	FITC	Immunotools
	CD80, B7-1	Maus	C3H	2D10	PE	eBioscience, Thermofisher
	CD29	Maus	IgG1	MEM-101A	APC	Immunotools
12	CD71, TFR	Maus	IgG1	MEM-75	APC	Immunotools
13	CD326, EpCAM	Maus	n.a.	HEA-125	PE	Miltenyi (Mönchen- Gladbach, DE)
14	CD58, LFA III	Maus	IgG1	MEM-63	PE	Immunotools
	CD152, CTLA4	Maus	IgG1	L3D10	APC	Biolegend
15	CD95, FasR	Maus	IgG1	LT95	FITC	Immunotools
	CD178, FasL	Maus	IgG1	NOK-1	PE	eBioscience, Thermofisher
16	CD90	Maus	IgG1	AS02	FITC	Dianova, Biozol (Eching, DE)
	MHC II	Maus	IgG2a	LT-DR	PE	Immunotools
17	CD26, DPP4	Maus	IgG1	2A6	PE	eBioscience, Thermofisher
	CD40, TNFRSF	Maus	IgG1	HI40a	APC	Immunotools
18	MSLN	Maus	IgG2b	A15125D	-	Biolegend
19	PD-1 (Pembrolizumab)	Human			-	Zentralapotheke UMR
20	PDL1 (Atezolizumab)	Human			-	Zentralapotheke UMR
21	HER1, EGFR (Cetuximab)	Human			-	Zentralapotheke UMR
22	HER2 (Trastuzumab)	Human			-	Zentralapotheke UMR
23	RP215	Maus			-	Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA)

Anmerkung. Ansatz 2 bis 4: Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie, Ansatz 5 und 6: Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie, Ansatz 7 bis 23: spezifische Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Tabelle 9: Primer für humanspezifische Cytochrom B PCR und STR Multiplex PCR

Experiment	Staining	Locus	Primer	Sequenz
HCytB PCR	-	Cyt_b	For.	TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATTA
	-		Rev.	ACTTGTCGAATGATGGTAAAAGG
STR Mp. PCR	FAM TM	vWA	For.	5'-Fam-GCC CTA GTG GAT GAT AAG AAT AAT CAG TAT GTG-3'
			Rev.	5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3'
		TH01	For.	5'-Fam-ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG-3'
			Rev.	5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3'
		TPOX	For.	5'-Fam-ACT GGC ACA GAA CAG GCA CTT AGG-3'
			Rev.	5'-GGA GGA ACT GGG AAC CAC ACA GGT TA-3'
		CSF1PO	For.	5'-Fam-AAC CTG AGT CTG CCA AGG ACT AGC-3'
			Rev.	5'-TTC CAC ACA CCA CTG GCC ATC TTC- 3'
	HEX TM	D5S818	For.	5'-Hex-GGT GAT TTT CCT CTT TGG TAT CC-3'
			Rev.	5'-AGC CAC AGT TTA CAA CAT TTG TAT CT-3'
		D7S820	For.	5'-Hex-ATG TTG GTC AGG CTG ACT ATG- 3'
			Rev.	5'-GAT TCC ACA TTT ATC CTC ATT GAC- 3'
		D16S539	For.	5'-Hex-GGG GGT CTA AGA GCT TGT AAA AAG-3'
			Rev.	5'-GTT TGT GTG TGC ATC TGT AAG CAT GTA TC- 3'
		D13S317	For.	5'-Hex-ATT ACA GAA GTC TGG GAT GTG GAG GA- 3'
			Rev.	5'-GGC AGC CCA AAA AGA CAG A-3'
	TAMRA TM	D13S317	For.	5'-ACC TCA TCC TGG GCA CCC TGG TT- 3'
			Rev.	5'-Fam-AGG CTT GAG GCC AAC CAT CAG-3'

Anmerkung. Humanes Cytochrom B (HCytB), Forward (For.), Reverse (Rev.), Short Tandem Repeat Multiplex PCR (STR Mp. PCR), FAMTM (494nm) blau, HEXTM (535nm) grün, TAMRATM (560nm) rot. Alle Primer wurden von Metabion (Martinsried, DE) bezogen.

Tabelle 10: Software und Programme

Software	Firma
Microsoft Excel 2022	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Graph Pad Prism 5.02	Dotmatics (Boston, Massachusetts, USA)
ZEN core 3.0	Zeiss
IBM SPSS Statistics 25	IBM (Armonk, NY, USA)
FCSalyser 0.9.21 – alpha	Sven Mostböck, Vienna, A; https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/
Bio-Print St4	Vilber Lourmat
Intas Capture	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, DE)
GeneMapper Software	Thermo Fisher Scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Probenaufbereitung und Etablieren von Zelllinien

Die Tumorproben, aus welchen die Zelllinien etabliert wurden, bilden die Grundlage dieser wissenschaftlichen Arbeit. Diese Proben wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Rostock im Rahmen des Projektes: „BioBank Rostock“ gewonnen (Bürtin et al., 2021). Das Sammeln der Proben und die Verwendung des humanen Materials in Experimenten wurden durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock genehmigt (A 2018-0054). Nach schriftlicher Zustimmung wurden Patientinnen und Patienten in das Projekt aufgenommen. Im Anschluss an die Operation erfolgte die Probenaufarbeitung, die Integration in die Biobank und das Anlegen von primären und sekundären Zellkulturen durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Molekulare Onkologie und Immuntherapie (MOI). Die Pseudonymisierung der Patientinnen und Patienten und der zugehörigen Proben erfolgte wie in Tabelle 11 und Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 11: Definition der Fall-ID und Proben-ID

Proben-ID			
Fall-ID			
Präfix	Entität	Konsequente Patienten Nummer (X)	Spezifikation und Nummer (X)
HRO	P	X	TuX MetX

Anmerkung. Hansestadt Rostock (HRO), Pankreas (P), Tumor (Tu), Metastase (Met). Beispiel: HROP68Tu2: Hansestadt Rostock (HRO), Pankreas (P), Fallnummer (68), Rezidiv (Tu2).

Tabelle 12: Definition der PDX-ID

PDX-ID			
	N ₂ Lagerung	Maus Passage	Maus Nummer
Fall ID	f	TX	MX

Anmerkung. Patient derived xenograft (PDX), PDX generiert aus vital gefrorener primärer Tumorprobe (f), Maus Transfer (T), Maus Nummer (M.) Beispiel: HROP40 T1 M2: Proben-ID (HROP40), PDX generiert aus frischer Tumorprobe, Maus Transfer 1 (T1), Maus Nummer 2 (M2).

Aufbereitung des Resektats

Nach der Operation wurde das Resektat in das Institut für Pathologie verbracht. Durch eine Pathologin oder einen Pathologen wurde ein Stück aus dem Tumor entnommen, welches für die histopathologische Untersuchung irrelevant war. Im Zellkulturlabor wurde die Probe in einer Petrischale in circa 30 mm³ große Würfel geschnitten. Diese wurden vital (*Fetal Calf Serum*; FCS + 10 %

Dimethylsulfoxid; DMSO und) und nicht vital (gefrorene Zellpellets) in flüssigem Stickstoff (N₂) bei – 176 °C gelagert. Neben dem Tumormaterial wurden auch Blutproben sowie gesundes Gewebe in die BioBank integriert. Die Aufbereitung des Resektats erfolgte durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG MOI.

Anlegen von primären Zellkulturen

Für das Anlegen von Primärzellkulturen aus dem Patientenmaterial wurden Zellen, die nach dem Zerteilen des Tumors in der Petrischale verblieben, genutzt. Diese Zellsuspension wurde in eine Kollagen-beschichtete 6-Well-Platte mit sechs unterschiedlichen Medien überführt. Die Kultur der Primärzellen erfolgte bei Standard-Kulturbedingungen im Brutschrank. Das Anlegen von primären Zellkulturen erfolgte durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG MOI.

Anlegen von sekundären Zellkulturen

Zur Expansion des Tumorgewebes und zu *in vivo*-Versuchen wurden im Rahmen des Projektes „BioBank Rostock“ sogenannte *Patient-Derived Xenografts* (PDX) angelegt. Wie von Bürtin et al. (2021) beschrieben, erfolgte die Implantation von Tumorfragmenten entweder direkt oder nach Kryokonservierung subkutan in die Flanken der Mäuse. Nach Erreichen einer Zielgröße von 1.500 mm³ wurden diese Tumoren chirurgisch entfernt, in Petrischalen zerkleinert und die Zellen vereinzelt. Das Anlegen von Zellkulturen erfolgte wie zuvor beschrieben. In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden PDX-Proben für die Etablierung von sekundären Zelllinien sowie Mutationsdaten von PDX-Material verwendet. Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Registrierungsnummer: LALLF M-V/ TSD/7221.3-1-007/19). Das Anlegen von PDX sowie den sekundären Zellkulturen erfolgte durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG MOI.

Etablieren von Zelllinien

Die initiale Etablierung der Zelllinien erfolgte durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG MOI. Das Wachstum der Zellen in der 6-Well-Platte wurde regelmäßig unter dem inversen Mikroskop beurteilt. Nach ein- bis dreimaligem Passagieren und dem Erstellen von kryokonservierten vitalen Backups (s. 2.2.2) wurden die Zellen aus dem Well in eine T25-Kulturflasche überführt. Nach weiterem ein- bis dreimaligen Passagieren und Erstellen von Backups erfolgte die Umstellung auf Standardmedium (5 %-iges Vollmedium; 5 % VM) (s. 2.2.2).

2.2.2 Zellkultur

Steriles Arbeiten

Kontamination mit Mikroorganismen, vor allem mit Mykoplasmen, stellt in der Etablierung und bei der Durchführung von Zellkultur-Experimenten ein Problem dar. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Zellkultur-Experimente stets steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach jeder Nutzung mit Bacillol (Propan-1-ol, Propan-2-ol und Ethanol) desinfiziert.

Kultivierung und Passagieren

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen T25, T75 und T175 mit Ventildeckel im CO₂-Brutschrank bei Standard-Kulturbedingungen von 5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden entweder in 5 % VM oder 10 % VM (Vollmedium) kultiviert (s. Tabelle 14). Dafür wurden 8 ml L-Glutamin (200 mM), entweder 25 ml FCS (für 5 % VM) oder 50 ml FCS (für 10 % VM) zu einer Flasche mit 500 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12) Medium hinzugegeben. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert.

Das Medium wurde regelmäßig gewechselt. Dabei diente die Gelbfärbung des im Medium enthaltenen Indikators Phenolrot und der Anteil apoptotischer Zellen im Überstand als Orientierung. Das Passagieren erfolgte bei 70 % Konfluenz im exponentiellen Wachstum. Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen wurde zuerst das Medium mit der Pasteurpipette und der Vakuumpumpe abgesaugt, mit *Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution* (DPBS) gewaschen und anschließend Trypsin/EDTA hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf der Heizplatte bei 37 °C wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen gegen die Kulturflaschen manuell abgelöst. Die Zellen wurden in das Medium aufgenommen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und gezählt (siehe unten).

Aus dieser Suspension konnten nun Zellen für Experimente gewonnen werden und die Zellen in einem bestimmten Split-Verhältnis (z.B. 1:5) wieder in die Kulturflasche zurückgegeben werden. Dabei wurde das Trypsin/EDTA durch das FCS im Medium antagonisiert.

Bei jedem Passagieren erhöht sich die Passage um den Faktor eins. Um sicherzustellen, dass die Zelllinien stabil laufen, wurden Experimente erst ab Passage 15 begonnen und lediglich bis Passage 45 durchgeführt. Alle Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten, möglichst in einem Rahmen von maximal zehn Passagen, durchgeführt, um so den Einfluss des genetischen Drifts zu minimieren.

Bestimmung der Zellzahl

Das Zählen der Zellen erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Zur Unterscheidung vitaler und nicht vitaler Zellen wurde eine Färbung mittels Trypanblau durchgeführt. Trypanblau dringt durch geschädigte Zellmembranen von nicht vitalen Zellen und färbt diese blau. Zuerst wurde eine 0,4 % Trypanblau-Lösung angesetzt. Zur Färbung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit der 0,4 % Trypanblau-Lösung versetzt. Es wurde der Mittelwert der Zellzahl der Großquadrate (GQ) bestimmt. Die Anzahl der Zellen pro ml (D) wurde mit folgender Formel berechnet.

$$D = \text{Mittelwerte der GQ} \times 10^4 \times DF$$

D Konzentration der Zellen pro ml

DF Dilution factor (Verdünnungsfaktor) bei 1:1-Verdünnung = 2

Kryokonservierung und Auftauen

Um im Verlauf der Experimente auf niedrigere Passagen zurückgreifen zu können, wurden die Zellen kryokonserviert. Verwendet wurde dafür 10 %iges DMSO-Medium (Einfriermedium, FM). Dieses verhindert beim Einfrieren der Zellen die Bildung von Kristallen, welche die Zellen irreversibel schädigen würden.

Zur Kryokonservierung wurden 3×10^6 Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen transferiert, für 7 min bei 286 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 1,5 ml FM resuspendiert und in CryoPure Gefäß 1,6 ml überführt. Diese wurden mit dem Cryo 1 °C Freezing Container um 1 °C pro Minute auf –80 °C im Gefrierschrank heruntergekühlt. Für die BioBank Rostock wurden Proben für die Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Für das Auswaschen des im FM enthaltenen zytotoxischen DMSO wurden die Zellen in 8,5 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen, für 7 min bei 286 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium aufgenommen und in eine T25-Kulturflasche überführt. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene, nicht adhärente Zellen zu entfernen und DMSO-Rückstände auszuwaschen.

Gefrorene Zellpellets für molekularbiologische Untersuchungen

Für die Verwendung in molekularbiologischen Untersuchungen wurden 3×10^6 Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen transferiert, für 7 min bei 286 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Auswaschen der Mediumsreste wurde das Pellet in 1,5 ml DPBS resuspendiert und in ein

entsprechendes Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde erneut für 7 min bei 286 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in flüssigen Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3 Mykoplasmen-Nachweis

Mykoplasmen sind Bakterien, welche keine Zellwand besitzen und durch Membranporen in Tumorzellen gelangen können. Diese Bakterien sind gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent. Im Zellkulturlabor stellt die Kontamination mit Mykoplasmen ein häufiges Problem dar. Daher wurde monatlich ein Test auf eine etwaige Mykoplasmen-Kontamination durchgeführt.

Dafür wurden zuerst 500 µl Medium aus den Kulturflaschen entnommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Medium musste für mindestens 96 h in der Kulturflasche inkubieren. Die Probe wurde für 15 min bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekocht und dann bis zur Durchführung des Tests bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für den Mykoplasmen-Nachweis wurde das Plasmotest™-Mycoplasma Detection-Kit verwendet. HEK-Blue™-2 Zellen produzieren, wenn Mykoplasmen an ihren Toll-like Rezeptor 2 binden, SEAP (*secreted embryonic alkaline phosphatase*). Dieses kann durch HEK-Blue™ Detection Medium sichtbar gemacht werden, welches durch Kontakt mit SEAP eine blaue Farbe annimmt.

2.2.4 DNA-Isolation

Für die Isolation von genomischer DNA (gDNA) wurden das Tissue DNA Kit (peqLab) und gefrorene Zellpellets verwendet, welche wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt wurden. Als Vergleichsprobe wurde Originaltumormaterial der Patientinnen und Patienten verwendet (max. 30 mg Gewebe). Aus vital gefrorenen Proben wurde mit PBS das FM ausgewaschen. Die DNA-Isolation gliederte sich in fünf Schritte: Homogenisieren, Lyse, Laden und Binden, Waschen sowie Trocknen und Eluieren.

Für die Lyse wurde die Probe in ein Lysegefäß überführt, mit 100 µl TE-Puffer (s. Tabelle 5) versetzt und zweimal 20 s mit 10 s Pause bei 6.500 g mithilfe des Homogenisators Precellys homogenisiert. Der Homogenisator wurde durch das Institut für Biochemie der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Anschließend wurde die Probe mit 375 µl Lysemix versetzt, für 60 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in dem ThermoMixer inkubiert und abschließend für 30 s bei 10.000 g zentrifugiert.

In Collection Tubes wurden 200 µl DNA Binding Puffer und 200 µl Überstand der Lyse mit der Pipette vermischt. Diese Lösung wurde dann auf PerfectBind®-DNA Columns pipettiert, die Säule in die Collection Tubes gesteckt und für 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die DNA befand sich jetzt in der Säulenmatrix. Der Säulendurchfluss wurde verworfen.

Die Säulenmatrix wurde zweimal gewaschen. Dafür wurden in die *PerfectBind®-DNA Columns* 650 µl DNA-Wash-Puffer pro *Perfect Bind Collum* hinzugefügt und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Abschließend wurde die Säule in das geleerte 2 ml Collection Tube gesteckt und für 2 min bei 10.000 g trocken zentrifugiert.

Zum Herauslösen der DNA aus der Säulenmatrix (eluieren) wurde die Säule in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Pro Reaktionsgefäß wurden 75 µl Elution-Puffer (70 °C) auf die Säulenmatrix pipettiert, für 3 min in der Waagerechten inkubiert und anschließend für 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Das Eluieren wurde zweimal durchgeführt. Die Säule wurde verworfen und die isolierte DNA bei 4 °C gelagert.

Um die Qualität der isolierten DNA und deren Konzentration zu bestimmen, wurde der Nanodrop1000 verwendet. Als Referenzprobe wurde Elution-Puffer verwendet. Die Messung wurde bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA, durchgeführt. DNA-Konzentrationen > 12,5 ng/µl wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser verdünnt.

2.2.5 PCR-Nachweis des humanen Cytochrom-B

In Folge des Einbringens von humanem Tumormaterial in immunsupprimierte Mäuse kann es zu der Ausbildung von Lymphomen kommen, diese können murinen Ursprungs sein oder EBV assoziiert sein (Moyer et al., 2019; Zhang et al., 2015). Um nachzuweisen, dass der in der Maus passagierte Tumor humanen Gewebes entsprach, wurde das humane *Cytochrom-B*-Gen mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Auf Grund seiner speziesspezifischen Unterschiede kann dieses Gen zum Nachweis des humanen Ursprunges einer Probe herangezogen werden (Matsuda et al., 2005).

Für die PCR wurde gDNA verwendet, welche wie in 2.2.4 beschrieben isoliert wurde. Zuerst wurde ein 2 %iges Agarosegel angefertigt. Dafür wurden 120 ml TRIS-EDTA-Acetat -Puffer (TEA-Puffer) und 2,4 g Agarose gemischt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle bei 800 W gekocht, bis sich die Feststoffe lösten. Anschließend folgte die Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid. Das Agarosegel wurde, unter Vermeidung von Luftblasenbildung, in den Gelschlitten gegossen und der Kamm für 15 min eingeführt. Nach dem Abkühlen wurde der Gelschlitten in die mit TEA-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gestellt.

In einem 8er-PCR-Strip wurde der PCR-Mastermix vorgelegt (s. Tabelle 5). Pro Tube wurden 2 µl der in Elution-Puffer gelösten gDNA der entsprechenden Probe pipettiert. Die PCR wurde mittels des MyCycler™ unter folgendem Programm durchgeführt:

Denaturieren:	2 min	94 °C
Primer Hybridisierung: 40x:	30 s	94 °C
	30 s	57 °C
	30 s	72 °C
Amplifizierung:	5 min	72 °C

Die PCR-Proben wurden zentrifugiert und zur Erhöhung der Dichte mit Loading Dye im Verhältnis 1:6 versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden pro Probe 10 µl in die entsprechenden Taschen des Agarosegels pipettiert, auch 10 µl einer 100-Basenpaar(Bp)-Leiter wurden hinzugefügt. Eine Spannung von 75 V wurde für 60 min angelegt. Die Auswertung erfolgte mit dem Bio-Print St4 und der Intas Capture Software.

2.2.6 STR-Analyse

Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurde eine *Short Tandem Repeat* (STR)-Analyse (genetischer Fingerabdruck) durchgeführt, um etwaige Verwechslungen von Proben auszuschließen und den Ursprung der Zelllinien von der Patientin oder dem Patienten (*donor origin*) nachzuweisen. Dafür wurden die etablierten Zelllinien mit Patientenmaterial (entweder Normalgewebe oder Tumorgewebe) verglichen. Bei STRs oder auch Mikrosatelliten handelt es sich um repetitive, nicht codierende DNA-Sequenzen, die eine Länge von zwei bis sechs Basenpaaren aufweisen. Die Erstellung des genetischen Fingerabdruckes erfolgte mittels Multiplex-PCR mit anschließender Kapillarelektrophorese. Dafür wurden neun Genloci im Bereich der STR analysiert.

Bei der Multiplex-PCR handelt es sich, im Unterschied zu der klassischen Singleplex-PCR, um ein PCR-Verfahren mit dem zeitgleich mehrere Genloci amplifiziert werden können. In diesem Fall wurden fluoreszenzmarkierte Primerpaare, welche mit drei verschiedenen Markern markiert wurden (FAMTM, HEXTM und TAMRATM), verwendet. Für die Fragmentlängenanalyse wurde eine Kapillarelektrophorese durch das Institut für Pathologie durchgeführt. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden durch das Anlegen einer Spannung der Länge nach in einer Kapillare aufgetrennt. Ein Laser regte die PCR-Produkte an und ein Detektor erfasste die Fluoreszenzemission.

Die STR-Analyse wurde von Herrn Mathias Krohn, Mitarbeiter der AG MOI, durchgeführt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mittels *GeneMapper Software*.

2.2.7 Whole Exome Sequencing (WES)

Die Sequenzierung erfolgte im Rahmen des Verbundprojektes „*Peptid-basierte Immunisierungsstrategien bei Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs*“ (PiCoP) der Universitätsmedizin Rostock und der Universitätsmedizin Greifswald sowie dem Biotechnologie-Unternehmen Centogene (Rostock, DE) (PiCoP-Centogene). Das WES wurde durch Centogene, wie in Trujillano et al. (2017) beschrieben, durchgeführt.

Zuerst wurde DNA unter Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit aus den Tumorproben isoliert. Die Qualität und Konzentration der DNA wurden photometrisch bestimmt. Dabei wurde das Exom mittels des AmpliSeq Exome RDY Kit amplifiziert. Mittels des Nextera Rapid Capture Exome Kit wurden 214.405 Exome markiert. Die Sequenzierung der amplifizierten Zielregionen erfolgte mittels HiSeq4000 Sequencers. Bei der verwendeten Exome-Version handelte es sich um Centogenes „CentoXome“, welches auf dem *Twist Bio Human Core Exome* beruht und 33.000 Gene umfasst (von den Driesch & Flöttmann et al., 2022). Diese Gene stellen nur etwa 1 % des menschlichen Genoms dar, sind allerdings für 85 % der bekannten pathogenen Varianten verantwortlich, welche mit humanen Krankheitsbildern assoziiert sind. Die Sequenzierungsdaten wurden mittels bcl2fastq Software 2.17.1.14 (Illumina) in das fastq-Format konvertiert (Matschos et al., 2021). Die Klassifikation der Mutationen in Hinblick auf deren pathologische Relevanz wurde mittels einer automatischen Abfrage in ClinVar erstellt und anschließend manuell evaluiert (von den Driesch & Flöttmann et al., 2022).

2.2.8 MSI-Score

Zum Nachweis einer möglichen dMMR und daraus resultierenden MSI wurde der Status der Mikrosatelliten untersucht. Der MSI-Score wurde, wie von Niu et al. (2014) beschrieben, bestimmt. Dafür wurden die WES-Daten von Tumorproben und korrespondierenden Proben aus gesundem Gewebe verglichen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MSIsensor, welches automatisch spezifische Stellen im Genom, an denen somatische Mutationen auftreten können (*somatic sites*), detektiert. Dabei handelt es sich um homopolymere von mindestens 5 Bp und Mikrosatelliten. Anschließend folgte ein Vergleich der Anzahl der somatischen Mikrosatelliten-Mutationen mit der Anzahl der totalen somatischen Mikrosatelliten. Eine Mutationsrate von $\leq 3,5$ % wurde als mikrosatellitenstabil (MSS, Mikrosatellitenstabilität) angesehen, 3,5 bis 20 % als niedrige MSI (MSI-Low) und ≥ 20 % als hohe MSI (MSI-High) (Niu et al., 2014).

2.2.9 Wachstumskinetik und Verdopplungszeit

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens und zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurde ein kolorimetrischer, Kristallviolett-basierter (KV) Assay nach Gillies et al. (1986) genutzt. Der basische Farbstoff färbte dabei DNA-assoziierte Nukleoproteine an. Die so bestimmte Zellmasse war proportional zur Zellzahl.

Für die Färbung wurde eine 0,2 %ige KV-Lösung angesetzt. Dafür wurden 0,2 g KV in 98 ml destilliertem Wasser und 2 ml 96 %iges Ethanol gelöst. Für das Erstellen der Wachstumskinetik wurden zuerst 1×10^4 bis 4×10^4 in 1,5 ml des jeweiligen Mediums in eine 24-Well-Platte (Kollagen-beschichtet oder unbeschichtet) ausgesät. Nach 72 h wurde das Medium in den vier Wells der ersten Spalte abgesaugt und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml 0,2 %iges KV je Well hinzugegeben, für 20 min inkubiert und anschließend dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Im Abstand von 24 oder 48 h erfolgte das Anfärben der Spalten. Nach der letzten Färbung wurde die Platte für mindestens 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Das KV wurde in 0,5 ml 1 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)-Lösung für mindestens 1 h auf dem Schüttler bei 30 rpm gelöst. Die Absorption wurde mit dem Tecan infinite 200 Pro bei 540 nm mit einer Bandbreite von 9 nm und einer Referenz von 620 nm an zwölf Messpunkten je Well gemessen.

Aus der Absorption wurde in Microsoft Excel eine Wachstumskinetik erstellt und die Verdopplungszeit mit folgender Formel bestimmt.

$$N(t) = N_0 \times e^{\lambda t}$$

$$DT = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

$N(t)$	Zellzahl bei t
N_0	Zellzahl an Tag 3
λ	Wachstumsrate
t	Zeit [h]
DT	Doubling Time [h]

Die Experimente wurden in unabhängigen Triplikaten, in einem Rahmen von maximal zehn Passagen, durchgeführt. Die Anzahl an verwendeten Zellen für jedes Well wurde so gewählt, dass die Wells am letzten Tag eine Konfluenz von circa 70 % erreichten. So wurde sichergestellt, dass sich die gemessene Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellkulturen befand. Die verwendete Zellzahl wurde in Vorexperimenten bestimmt. Bei HROP40 T1 M2 und HROP68Tu2 traten starke Randeffekte (*edge-effects*) auf. Um diese zu minimieren, wurden beschichtete 24-Well-Paltnen genutzt. In Vorexperimenten konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Wachstumsgeschwindigkeit auf den beschichteten und unbeschichteten Platten signifikant unterschied.

2.2.10 Migrationsmessung mittels Scratch-Assay

Für die Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit wurden 5×10^5 Zellen in 4 ml Medium in ein Well einer 6-Well-Platte überführt und bei Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Für den *Scratch-Assay* ist ein konfluenter Zellrasen nötig, dieser wurde täglich mit dem inversen Mikroskop kontrolliert und bei Bedarf das Medium gewechselt.

Bei Erreichen von 100 % Konfluenz wurden mit einer 10 µl-Pipettenspitze drei vertikale Kratzer (*Scratches*) durch den Zellrasen gezogen. Teilweise kam es zu Ablösungen des Zellrasens an den Rändern des *Scratches*. Daher wurde von den drei *Scratches* der gewählt, welcher die geringsten Ablösungseffekte zeigte. Das vorher verwendete 5 %ige VM wurde abgesaugt, anschließend mit 2 ml PBS gewaschen und es wurden 4 ml 0 %iges VM hinzugegeben.

Das FCS im Kulturmedium ist essenziell für die Zellteilung der Tumorzellen. Durch den Einsatz von 0 %igem VM ist es möglich, primär die Zellmigration zu quantifizieren und Effekte der Zellproliferation zu minimieren.

Die Zelllinie HROP75 T0 M4 tolerierte den Wechsel von 10 %igem VM auf 0 %iges VM nicht und löste sich im Laufe der vier Tage ab. Daher wurde die niedrigste FCS-Konzentration bestimmt, bei der sich die Zellen nicht ablösten. Diese lag bei 1,5 % FCS.

Mit dem Zeiss-Primovert wurden bei zehnfacher Vergrößerung Fotos des Kratzers angefertigt. Mit dem Lineal-Tool in ZEN core 3.0 wurden drei horizontale Messungen der Breite des zellfreien Kratzers (zwischen den Wundrändern) auf unterschiedlichen Höhen vorgenommen. Die Messung wurde alle 24 h an den vier folgenden Tagen wiederholt. Dazu wurde mit Medium gewaschen, um Zellen aus dem Überstand zu entfernen.

Die Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit (*MS*) erfolgte in Microsoft Excel mit folgender Formel. Dafür wurden die Mittelwerte der drei gemessenen Distanzen eines jeden Tages verwendet.

$$MS = \frac{D_1 - D_x}{t}$$

<i>MS</i>	Migration Speed [µm/h]
<i>D₁</i>	Distanz Tag 1 [µm]
<i>D_x</i>	Distanz Tag 4 oder Distanz des letzten Tages vor schließen der Wunde [µm]
<i>t</i>	Zeit [h]

2.2.11 Chemosensitivitätstestung

Für die Untersuchung der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den verwendeten Medikamenten wurde ein KV-basierter Assay verwendet (s. 2.2.9). Als Zielwerte wurden die jeweiligen inhibitorischen Konzentrationen 50 (IC_{50}) bestimmt. Unter der IC_{50} versteht man diejenige Konzentration des verwendeten Medikamentes, bei der 50 % der Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, abgestorben sind.

Für die Bestimmung der Chemosensitivität wurden an Tag 0 in eine 96-Well-Platte jeweils 150 μ l Zellsuspension je Well ausgesät und für 24 h unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Für jede Zelllinie wurden unterschiedliche Zellzahlen verwendet (s. Tabelle 14). Auf Grund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten konnte nur so gewährleistet werden, dass nach sieben Tagen die Wells zu circa 70 % konfluent bewachsen waren. So wurde die Wirkung der Medikamente auf die exponentielle Wachstumsphase der Monolayerkulturen abgestimmt. Diese Zellzahlen wurden in Vorexperimenten für jede Zelllinie bestimmt.

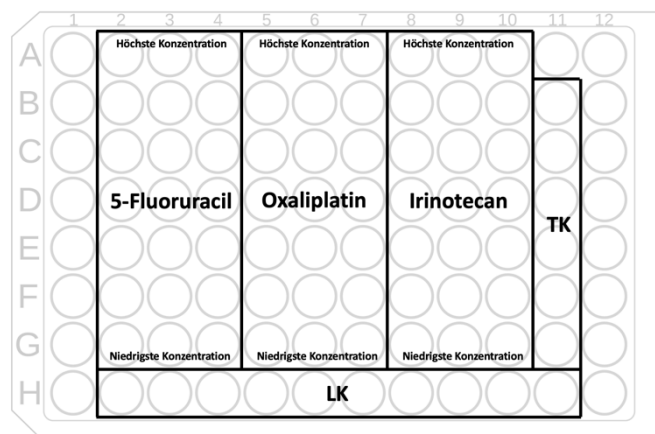


Abbildung 4: Beispiel für das Layout einer 96-Well-Platte für die Chemosensitivitätstestung

Anmerkung. (LK = Lebendkontrolle, TK = Totkontrolle)

Für die erste Behandlung nach 24 h (Tag 1) wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Chemotherapeutika in Zentrifugationsröhrchen 1,3 ml angesetzt. In jedes Well wurden 50 μ l verdünnter Chemotherapeutika mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Zu den Wells der Lebendkontrolle wurden 50 μ l Medium hinzugegeben. Das Medium aus den Wells der Totkontrolle wurde abgesaugt und mit 200 μ l PBS ersetzt. Für die zweite Behandlung nach 96 h (an Tag 4) wurde das Medium aus den behandelten Wells und der Lebendkontrolle abgesaugt. In jedes Well wurden mit der Mehrfachdispenser-Pipette 150 μ l Medium hinzugegeben. In die behandelten Wells wurden anschließend die Chemotherapeutika wie an Tag 1 pipettiert. Um nach 168 h (Tag 7) die Zellen anzufärben, wurde das Medium entfernt und einmal mit 100 μ l PBS gewaschen.

Bei HROP75 T0 M4 zeigte sich, dass sich die Zellen beim Färben ablösten, daher wurde zu den Zellen 100 µl 96 % Ethanol hinzugegeben, um sie vor dem Färben zu fixieren. Nach 10 min wurde das Ethanol entfernt und einmal mit 100 µl PBS gewaschen.

Anschließend wurden 50 µl 0,2 % KV je Well hinzugegeben und für 20 min auf dem Schüttler bei 30 rpm inkubiert. Danach wurde dreimal mit 100 µl PBS gewaschen. Nach der Färbung wurde die Platte für mindestens 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Das KV wurde durch 100 µl 1 %iges SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)-Lösung je Well für mindestens 1 h auf dem Shaker aufgelöst. Die Absorption wurde mit dem Tecan Reader Infinite 200 Pro bei 540 nm mit einer Bandbreite von 9 nm und einer Referenz von 620 nm an fünf Messpunkten je Well gemessen.

Zur Erstellung der Dosiswirkungskurve und der Berechnung der IC₅₀-Werte wurden Excel und Graph Pad Prism 5 genutzt und die Viabilität mit folgender Formel bestimmt.

$$Viabilität = \frac{OD_{Probe} - OD_{TK}}{OD_{LK} - OD_{TK}}$$

<i>Viabilität</i>	[%]
<i>OD_{Probe}</i>	Optical Density der Probe
<i>OD_{TK}</i>	Optical Density der Totkontrolle
<i>OD_{LK}</i>	Optical Density der Lebendkontrolle

Um in Graph Pad Prism 5 die IC₅₀-Werte möglichst genau zu bestimmen, waren möglichst viele Messwerte, zwischen 0 und 100 %iger Viabilität, nötig. Auf Grund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber den einzelnen Chemotherapeutika war es nicht möglich, die gleichen Höchstkonzentrationen und Verdünnungsfaktoren für alle Zelllinien zu verwenden. Daher wurde in Vorexperimenten der Sensitivitätsbereich der Zelllinien gegenüber den einzelnen Medikamente grob bestimmt. Daraus wurden die Maximal- und Minimalkonzentrationen, sowie der Verdünnungsfaktor für die einzelnen Experimente abgeleitet.

Zuerst wurden die Zelllinien auf ihrer Sensitivität gegenüber den einzelnen Chemotherapeutika getestet: 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Gemcitabin, Paclitaxel und Erlotinib. Anschließend wurde ihre Sensitivität gegenüber den Kombinationen FOLFIRINOX, GemPac und GemErlo getestet. Dafür wurden die Kombinationen im molaren Verhältnis, analog zu dem Verhältnis in der klinischen Anwendung, angesetzt (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Molares Verhältnis der Kombinationstherapien

Kombinationsregime	Einzelne Therapeutika	Molares Verhältnis
FOLFIRINOX	Folinsäure	1,07
	Irinotecan	1,00
	5-FU	80,95
	Oxaliplatin	0,80
GemPac	Gemcitabin	1,00
	Paclitaxel	0,04
GemErlo	Gemcitabin	1,00
	Erlotinib	38,20

Anmerkung. Die molaren Verhältnisse für FOLFIRINOX und GemPac wurden von Begg et al. (2020) und die für Gem Erlo von (Moore et al., 2007) übernommen.

Die Interaktionen zwischen 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin wurden nicht bestimmt, da die möglichen Kombinationsmöglichkeiten dieser Medikamente nicht von klinischer Relevanz sind (Seufferlein et al., 2022). Zur Bestimmung der Interaktion wurde der *Combination Index* (CI) genutzt, wie in Begg et al. (2020) beschrieben. Dieser wurde, wie hier am Beispiel von GemPac dargestellt, berechnet:

$$CI = \frac{IC_{50} \text{ von GemPac relativ zu Gemcitabin}}{IC_{50} \text{ von Gemcitabin}} + \frac{IC_{50} \text{ von GemPac relativ zu Paclitaxel}}{IC_{50} \text{ von Paclitaxel}}$$

Dabei indizieren entsprechende CI-Werte die unterschiedlichen Interaktionsmodi (CI > 1,3: Antagonismus; CI = 1,1-1,3: moderater Antagonismus; CI = 0,9-1,1 additiver Effekt; CI = 0,8-0,9 leichter Synergismus; CI = 0,6-0,8: moderater Synergismus; CI = 0,4-0,6 Synergismus und CI = 0,2-0,4 starker Synergismus) (Begg et al., 2020).

2.2.12 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Mittels hydrodynamischer Fokussierung entsteht im Durchflusszytometer eine Einzelzellsuspension, welche an einem Laser vorbeigeleitet wird. Das Licht trifft auf die Zelle und wird vom Photomultiplier detektiert. Trifft der Laserstrahl axial auf die Zelle, wird dieser in der Zelle gebeugt und axial detektiert. Man spricht von vorwärts gestreutem Licht oder auch dem *Forward Scatter* (FSC). Dabei ist die Intensität des FSC proportional zum Durchmesser der Zelle. Zur Messung seitlich gestreuten Lichtes, dem *Side Scatter* (SSC), wird das Licht orthogonal detektiert. Die Intensität des SSC ist proportional zur Granularität der Zelle.

Bei der Primärfärbung wurden spezifische AK mit fluoreszierende Farbstoffen verwendet. Für die Sekundärfärbung wurden die Antigene zuerst durch unmarkierte AK gebunden. In einem zweiten Schritt wurde, mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären AK, der primäre AK sichtbar gemacht.

Für die Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur wurden für jeden Färbeansatz $2,5 \times 10^5$ Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgte eine Resuspension in 1 ml DPBS pro 1×10^6 Zellen und ein erneutes Zentrifugieren mit abschließendem Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 200 µl Färbepuffer (PBS mit 3 % Albumin) pro Ansatz resuspendiert und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt.

Für die Färbung wurde zu jedem Ansatz Färbepuffer hinzugefügt, sodass mit den 4 µl AK ein Volumen von 100 µl je Well erreicht wurde. Mit einer Mehrkanalpipette wurde das Zellpellet, der Puffer und die AK in den Wells resuspendiert. Die verwendeten AK sind in Tabelle 8 aufgeführt, die Färbeansätze im Anhang (s. Tabelle 31).

Nach 30-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei 4 °C wurde die Platte zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Jedes Well wurde zweimal mit 150 µl Färbepuffer gewaschen, zentrifugiert und abgekippt, um nicht-gebundene AK auszuwaschen.

Für die Primärfärbung wurden die Pellets in 100 µl Färbepuffer aufgenommen und in 5-ml-Röhrchen überführt, in welche vorher 100 µl Färbepuffer vorgelegt wurde. Für die Sekundärfärbung wurden die Pellets mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Nach 30-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei 4 °C wurden die Ansätze zweimal, wie zuvor beschrieben, gewaschen und in die entsprechenden Röhrchen für das FACS Calibur überführt.

Als Kontrollen wurden Isotypkontrollen mit Anti-Human IgG1 AK in FITC, PE und APC vorgenommen und Kontrollen mit den Sekundär-AK Anti-Maus und Anti-Human (s. Tabelle 8). Durchflusszytometrische Untersuchungen erfolgte mit dem FACS Calibur. Je Messung wurden mindestens 2×10^4 Events gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels FCSalyser 0.9.21-alpha. Zur Auswertung wurde eine Vorlage erstellt, die für alle Zelllinien angewendet wurde. Die *Gates* wurden entsprechend gewählt, dass in der ungefärbten Kontrolle weniger als 4 % der Zellen positiv für die jeweiligen Farben (FITC, PE und APC) waren. An dieser Stelle wurde die ungefärbte Kontrolle verwendet, da sich in der Isotyp-Kontrolle keine signifikanten Färbungen zeigten. Es wurden zwei Messgrößen erhoben, der Anteil der gefärbten Zellen in Prozent und das *Mean Fluorescence Intensity Ratio* (MFIR), welche sich aus der MFI der Probe sowie der Kontrolle errechnet (siehe Formel).

$$MFIR = \frac{MFI_{Probe}}{MFI_{Kontrolle}}$$

<i>MFIR</i>	<i>Mean Fluorescence Intensity Ratio</i>
<i>MFI-Probe</i>	<i>Mean Fluorescence Intensity der Probe</i>
<i>MFI-Kontrolle</i>	<i>Mean Fluorescence Intensity der Kontrolle</i>

2.2.13 Statistik

Für die statistische Auswertung der Chemosensitivitätstestung, der Migrationsgeschwindigkeit und der Verdopplungszeit wurden die fünf Zelllinien miteinander verglichen (drei bis vier Messwerte). Die Annahme einer Normalverteilung ist wegen der geringen Datenlage nicht gerechtfertigt. Um zu ermitteln, ob zwischen den Werten der unabhängigen Gruppen (Zelllinien) ein signifikanter Unterschied bestand, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dafür wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Bei dem Test handelt es sich um ein nicht-parametrisches Testverfahren, welches auf Rangdaten basiert und daher keine Annahmen über die Verteilung der Daten macht. Dieser ist als Erweiterung des Mann-Whitney-U-Tests in der Lage, auch Unterschiede von mehr als zwei Gruppen, wie hier gefordert, zu untersuchen.

Bei Vorliegen eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den Zelllinien wurde zum Vergleich der einzelnen Gruppen (Zelllinien) untereinander eine Post-hoc-Analyse (Dunn-T-Test) angeschlossen. Dieser Test basiert ebenfalls auf Rangdaten und kann für nicht-normalverteilte Daten angewendet werden. Um das Problem multipler Vergleiche zu berücksichtigen, wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Diese Korrektur passt das Signifikanzniveau der einzelnen Tests an, um das Risiko von Typ-I-Fehlern zu reduzieren.

Um Korrelationen zwischen der Expression von Oberflächen-Antigenen und dem Ansprechen auf Medikamente (IC_{50}) zu bestimmen, wurde eine Korrelationsanalyse gerechnet. Zur Bewertung der Korrelation wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics 25 (IBM).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von Zelllinien

In der Forschungsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie wurden seit 2007 Pankreaskarzinomproben in die BioBank aufgenommen. Aktuell befinden sich (Stand: 01.10.2022) 155 Fälle in der BioBank. Aus dem Probenmaterial wurden im Laufe der Zeit primäre und sekundäre Zelllinien angelegt (s. 2.2.1). Aus diesen wurden zwölf vielversprechende Pankreaskarzinom-Zelllinien gewählt, um diese zu charakterisieren.

In zwei Fällen (HROP10 T5 M2 und HROP25 T0 M2) starben die Zellen im Laufe des Passagierens, bei zwei weiteren Zelllinien verdrängten schneller wachsende Fibroblasten die Tumorzellen (HROP100 und HROP100 T0 M1). Die Etablierung einer weiteren Zelllinie (HROP54 T1 M2) zögerte sich so weit hinaus, dass sie nicht mehr in diese Arbeit aufgenommen werden konnte.

Im Rahmen der Qualitätssicherung wurde eine humanspezifische Cytochrom-B-PCR, zum Nachweis des humanen Ursprungs, durchgeführt. Abbildung 5 zeigt eine Aufnahme des Agarosegels der PCR, welche wie in 2.2.5 beschrieben, durchgeführt wurde. Die Banden der Zelllinien HROP75 T0 M4, HROP75, HROP40 T1 M2, HROP88 und HROP68Tu2 befanden sich auf Höhe der Positivkontrolle. Daher ist von einem humanen Ursprung der Zellen auszugehen. Die Banden von HROP67 T1 M2 und HROP88 T0 M2 befanden sich auf Höhe der Negativkontrollen. Somit war von einem nicht humanen Ursprung des Zellmaterials auszugehen.

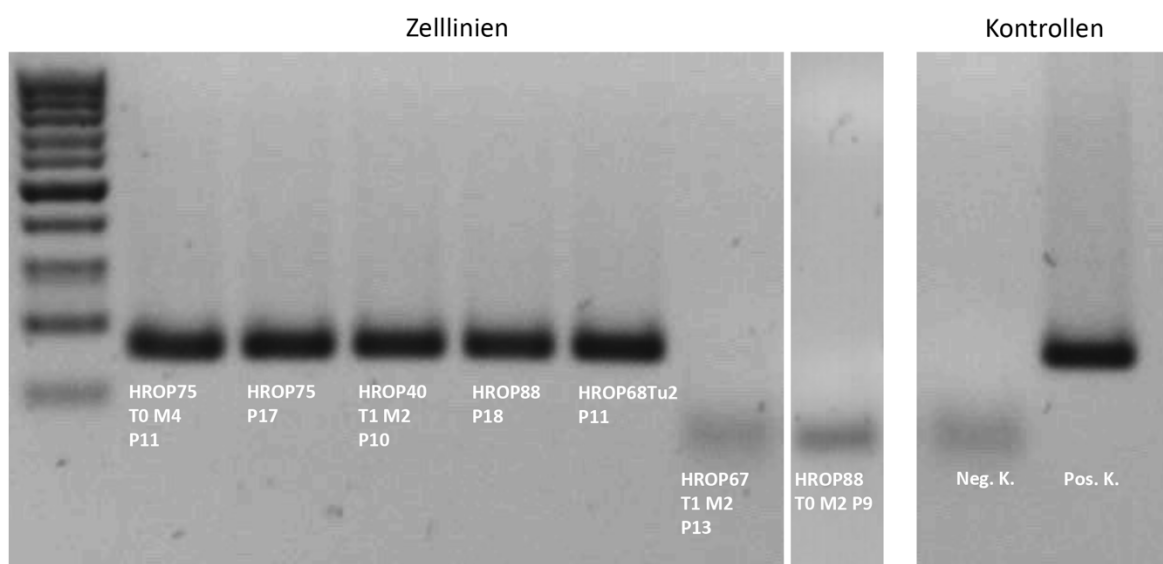


Abbildung 5: Nachweis von humanem Cytochrom-B mittels PCR

Anmerkung. 100 bp-Ladder links. Negativkontrolle (Neg. K.), Positivkontrolle (Pos. K.).

Aus 155 Pankreaskarzinom-Fällen der Biobank konnten fünf immortale Zelllinien etabliert werden. Darunter waren drei primäre Zelllinien (HROP68Tu2, HROP75 und HROP88) und zwei sekundäre Zelllinien, welche aus PDX-Modellen etabliert wurden (HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4).

Tabelle 14: Basisdaten der etablierten Zelllinien

Zelllinie	Medium	Ausbeute aus T75 bei 70% Konfluenz in Mio.	Tage nach 1:5 Split bis 70% Konfluenz	Zellzahl WK (24-Well-Platte)	Zellzahl CS (96-Well-Platte)
HROP68Tu2	5 % VM	5	9–10	40.000	10.000
HROP40 T1 M2	5 % VM	7	7	25.000	2.000
HROP75	5 % VM	10	5–6	10.000	1.500
HROP75 T0 M4	10 % VM	12	4–5	10.000	1.500
HROP88	5 % VM	6	6	10.000	2.000

Anmerkung. Vollmedium (VM), Kulturfäche mit 75 cm² (T75), Wachstumskinetik (WK) und Chemosensitivitätstestung (CS).

3.2 Patientendaten

In Tabelle 15 sind grundlegende Daten zu den Patientinnen und Patienten aufgeführt. Die Zelllinien wurden aus Tumoren von zwei weiblichen Patientinnen und zwei männlichen Patienten etabliert. Das rückfalllose Überleben betrug im Mittel fünf Monate und das Gesamtüberleben 16 Monate. HROP88 hat weitere adjuvante Therapien abgelehnt und sich mutmaßlich der weiteren ärztlichen Betreuung entzogen. Daher liegen keine Informationen über das Auftreten eines möglichen Rezidives oder Metastasen vor.

Tabelle 15: Allgemeine Patientendaten

Patienten-ID	Alter	Geschlecht	Metastase	Rezidiv	RFS	OS
HROP68	64	m	Gehirn	Ja	10	23
HROP40	50	w	Leber	Nein	6	24
HROP75	66	w	Lymphknoten	Ja	0	9
HROP88	69	m	n.a.	n. a.	n. a.	9
MW (SD)	62 (±8)				5 (±5)	16 (±8)

Anmerkung. Rückfallloses Überleben (RFS), Gesamtüberleben (OS), Mittelwert (MW) und absolute Standardabweichung (SD) sind in Monaten angegeben. Weiblich (w), männlich (m), nicht verfügbar (n. a.).

Tabelle 16 führt grundlegende Informationen über die Therapie der Patientinnen und Patienten auf. Im Besonderen ist dabei zu erwähnen, dass bei HROP68 unter dem mFOLFIRINOX-Regime ein 5-FU-induzierter koronarer Vasospasmus auftrat, weshalb die Therapie zu Gem+nabPac gewechselt wurde. Eine bei HROP68 im Verlauf aufgetretene Hirnmetastase wurde mittels Bestrahlung behandelt. In der Kohorte wurde lediglich im Fall HROP75 eine neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt (FOLFIRINOX).

Tabelle 16: Übersicht über Therapien

Patienten-ID	Erstlinientherapie		Zweitlinientherapie			OP
	Intention	Substanz	Intention	Substanz	Bestrahlung	
HROP68	adj	mFOLFIRINOX	pall	Gem+nabPac	ja	lokal
HROP40	pall	FOLFIRINOX	pall	FOLFOXIRI	-	Leber
HROP75	neoadj	FOLFIRINOX	adj	FOLFIRINOX	-	-
HROP88	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

Anmerkung. Nicht verfügbar (n. a.), Sekundäre Operation (OP), palliativ (pall), adjuvant (adj), neoadjuvant (neoadj), Resektion einer Lebermetastase (Leber), Resektion eines Lokalrezidives (lokal).

3.3 Pathologie

Die Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen wurden den Pathologieberichten des Institutes für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock entnommen. Tabelle 17 fasst das jeweilige Staging und Grading der Resektate zusammen. Anschließend wird kurz auf die histopathologischen Besonderheiten von HROP68 eingegangen.

Tabelle 17: Histopathologie

Proben-ID	Typ	Staging							Grading
		T	N	M	L	V	Pn	UICC	G
HROP68	PDAC (MPC)	pT3	pN2	Mx	L0	V1	Pn0	3	3-4
HROP68Tu2	PDAC (MPC)	pT3	pN2	Mx	L0	V1	Pn0	3	3-4
HROP40	PDAC	pT3	pN0	M0	L0	V0	Pn1	2B	2
HROP75	PDAC	pT3	pN2	M1(LYM)	L0	V0	Pn0	4	3
HROP88	PDAC	pT2	pN1	Mx	L1	V0	Pn1	2B	3

Anmerkung. Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), medulläres Karzinom des Pankreas (MPC), Tumor (T), maximaler Tumordurchmesser ≤ 4 cm (pT2), maximaler Tumordurchmesser > 4 cm (pT3), Nodus (N), keine regionären Lymphknoten-Metastasen (pN0), 1–3 regionäre Lymphknoten Metastasen (pN1), > 4 regionäre Lymphknoten Metastasen (pN2), Fernmetastasen nicht beurteilbar (Mx), Keine Fernmetastasen (M0), Fernmetastasen vorhanden (M1), Lymphgefäßinvasion (L), keine Lymphgefäßinvasion (L0), Lymphgefäßinvasion vorhanden (L1), Veneninvasion (V), keine Veneninvasion (V0), Veneninvasion (V1), perineurale Invasion (Pn), keine perineurale Invasion (Pn0), perineurale Invasion (Pn1), UICC-Stadieneinteilung (UICC), Grading (G), mäßig differenziert (G2), schlecht differenziert (G3), undifferenziert (G4).

Der Primarius von HROP68 stellte sich makroskopisch als inhomogener, zerfallender, etwa 10 cm durchmessender Tumor mit vielen Nekroseherden dar. Der Stroma-Anteil war bedeutend geringer als für ein PDAC üblich. Durch die morphologische Beurteilung des Tumors wurde er als MPC klassifiziert. Auffällig war eine intraepitheliale und intrastromale Invasion von CD8+ T-Zellen. In der Zusammenschau mit der sehr kräftigen PDL-1 Färbung konnte von einem immunreaktiven Subtyp ausgegangen werden. Es zeigten sich MLH1 und MSH2 markierte Tumorzellkerne. Zur weiteren Beurteilung des MS-Status wurde eine Multiplex-PCR mit fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarkern des Bethesda-Panels (Boland et al., 1998) (Bat26, Bat25, D5S346, D2123 und D17S250) sowie

dem quasi-monomorphen Marker Cat25 und anschließender Kapillarelektrophorese durchgeführt. Es wurden keine zusätzlichen Banden nachgewiesen. Eine *In-Situ*-Hybridisierung von *Epstein-Barr Virus encoded small nuclear RNA* ergab keinen Anhalt für ein EBV assoziiertes MPC. Im direkten Vergleich von Rezidiv und Primarius zeigte sich eine große Übereinstimmung. Folglich wurde vom Vorliegen eines Rezidivs des zuvor operierten Tumors ausgegangen.

3.4 STR-Analyse

Mittels STR wurden neun Genloci (s. Anhang: Tabelle 25) untersucht. Diese wurden mittels Multiplex-PCR amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. Um die PCR-Produkte den entsprechenden Allelen zuzuordnen, wurde ihre Länge (in Bp) mit der Tabelle (s. Anhang: Tabelle 25) verglichen. In Tabelle 18 sind die entsprechenden Allele, passend zu der jeweiligen Probe, aufgelistet. Darüber hinaus ist das ermittelte Geschlecht angegeben, dabei entsprachen zwei Peaks zwischen 210 und 220 Bp dem männlichen (XY) und ein Peak dem weiblichen Genotyp (XX). Lücken in der Tabelle entsprechen einem Allel-Verlust.

Die meisten Abweichungen im DNA-Profil wurde zwischen den Proben von HROP68 nachgewiesen. Bei den Markern TH01, CSF1PO und D13S317 kam es zu einem Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) in der Zelllinie. Markerabweichungen waren bei Allel 1 zu beobachten. Bei Marker D5S818 präsentierte sich bei der Probe des Primarius (HROP68 xxx) eine Homozygotie, während HROP68 Tu2 heterozygot war (Allel-Zugewinn). Die etablierte Zelllinie HROP68Tu2 P11 zeigte verglichen mit HROP68Tu2 eine LOH. Der Marker D7S82 war bei HROP68 xxx heterozygot, bei HROP68Tu2 und HROP68Tu2 P11 homozygot (Allel-Zugewinn). Der Geschlechtsmarker Amelogenin zeigte eine Abweichung der Zelllinie HROP68Tu2 P11 (w) zu dem Primarius HROP68 xxx (m) und dem Rezidiv HROP68Tu2 (m).

Das DNA-Profil von HROP40 N und HROP 40 T1 M2 P10 unterscheidet sich in den Markern TH01 (Allel 2), TPOX (Allel 1) und CSF1PO (Allel 1). Das bestimmte Geschlecht „w“ war identisch mit dem der Patientin. Das DNA-Profil von HROP75 präsentierte eine LOH bei dem Marker vWA (Allel 1) und D13S317 (Allel 2). Darüber hinaus wurde eine Markerabweichung in TH01 (Allel 2) nachgewiesen. Das DNA-Profil von HROP88 zeigte eine LOH bei dem Marker D16S539 (Allel 2). Abweichungen wurden bei den folgenden Markern festgestellt: TH01 (Allel 2) und TPOX (Allel 1). Eine Änderung im Geschlechtsmarker wurde bei HROP88 P18 (m) im Vergleich zu HROP88 N (w) und HROP88 xxx (w) festgestellt. Allen fünf Zelllinien kann auf Grundlage der STR-Analyse der Ursprung der Zelllinien von der Patientin oder dem Patienten nachgewiesen werden.

Tabelle 18: Allelbestimmung mittels STR-Analyse

Proben Name	FAM™						HEX™						TAMRA™				
	vWA		TH01		TPOX		CSF1PO		D5S818		D7S82		D16S539		D13S317	AMEL	
	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	Allel	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
HROP68 xxx	16	17.1	9	9.2	7.3	10.3	9.3	11	12		12		9	12	8	11	m
HROP68Tu2	16	17.1	9	9.3	7.3	10.3	10	11	12	13.1	12	13	9	12	8	11	m
HROP68Tu2 P11	16	17		9.3	7.3	10.3		11		13.1	12	13	9	12	8		w
HROP40 N	13.2	17.1	6	9.3	8		10	11	11	13.1	9	11	11	13	9	12	w
HROP40 T1 M2 P10	13.2	17.1	6	9.2	7.3		9.3	11	11	13.1	9	11	11	13	9	12	w
HROP75 Tu	15	17.1	6	9.2	7.3	9.3	12		11	13.1	8	10	9	14	8	10	w
HROP75 P17		17.1	6	9.2	7.3	9.3	12		11	13.1	8	10	9	14		10	w
HROP75 T0 M4 P11		17.1	6	9.3	7.3	9.3	12		11	13.1	8	10	9	14	8	10	w
HROP88 N	12.3	18.1	7	9.3	9	10.3	9.3	11	12	13.1	9	12	12	13	11	12	m
HROP88 xxx	12.3	18.1	7	9.3	8.3	10.3	9.3	11	12	13.1	9	12	12	13	11	12	m
HROP88 P18	12.3	18.1	7	9.2	8.3	10.3	9.3	11	12	13.1	9	12	12		11	12	w

Anmerkung. Normalgewebe (N), Tumorgewebe (Tu), weiblich(w), männlich (m), bestehende Unklarheit, ob es sich um Tu oder N handelt (xxx).

3.5 Molekularpathologie (WES und MSI-Score)

WES

In Tabelle 19 sind, mittels WES nachgewiesene, Mutationen aufgelistet, deren klinische Signifikanz als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft wurde. Den jeweiligen Proben ist der Anteil der mutierten Allele zugeordnet.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind Mutationen, deren Signifikanz als unsicher eingeschätzt wurde, hier nicht aufgeführt. Darüber hinaus sind Mutationen von nicht codierenden Transkripten, Introns, synonyme Mutationen und Mutationen, welche weniger als 15 % der Allele betrafen, hier nicht aufgeführt. Diese Daten finden sich im Anhang (s. Tabelle 27).

In Tabelle 19 sind von HROP68 die Mutationsdaten des Primarius (HROP68 Tu1) und des Rezidivs (HROP68 Tu2) dargestellt. Die Ergebnisse der WES-Analyse der entsprechenden PDX-Modelle finden sich aus Gründen der Übersicht im Anhang (s. Tabelle 27). Von dem Tumor HROP40 wurde keine WES-Analyse durchgeführt, da die Proben bereits vor Beginn des PiCoP-Projektes gesammelt wurden.

Tabelle 19: WES: Pathogene und wahrscheinlich pathogene Mutationen

Gen	Ref	Alt	Typ	Peptid	dbSNP ID	Klin Sig	HROP68 Tu1	HROP68 Tu2	HROP75	HROP75 fT0 M3	HROP88
FOXG1	CG	C	Del.	Glu154fs	rs398124204	p	54	49			
KRAS	C	T	Miss.	Gly12Asp	rs121913529	p	18	35			
KRAS	C	A	Miss.	Gly12Val	rs121913529	p			70	66	30
SMAD4	G	A	Miss.	Gly386Asp	rs121912580	wp / p					45
TP53	G	A	Miss.	Arg282Trp	rs28934574	wp / p			100	99	
TP53	C	T	Miss.	Arg175His	rs28934578	p					29

Anmerkung. Referenz (Ref), Alteration (Alt), Deletion (Del.), Missense (Miss.), codierendes Peptid (Peptid), klinische Signifikanz (Klin Sig), pathogen (p), wahrscheinlich Pathogen (wp).

Alle untersuchten Tumorproben wiesen pathogene KRAS-Mutationen auf. HROP75 und HROP88 wiesen dabei eine andere Missense-Mutation als HROP68 auf. Auch eine TP53-Mutation wurde bei allen Tumorproben detektiert. Für HROP88 wurde eine pathogene TP53-Mutation nachgewiesen. Bei HROP75 wurde eine pathogene bzw. wahrscheinlich pathogene TP53-Mutation mit einem hohen Anteil betroffener Allele festgestellt. Vergleichbar hoch war die Anzahl der betroffenen Allele der TP53-Mutation von HROP68. Diese wird von ClinVar allerdings lediglich als Mutation unsicherer Signifikanz eingeordnet (s. Tabelle 27). Eine SMAD4-Mutation wurde bei HROP88 nachgewiesen. Es

wurden darüber hinaus keine Mutationen in den folgenden MMR-Genen nachgewiesen: *MHL1*, *MSH1*, *MSH6*, *PMS2* und *EPCAM*.

In Tabelle 27 (s. Anhang) lässt sich die Anzahl der nachgewiesenen Mutationen zwischen Patientenmaterial und PDX-Modellen vergleichen. Im angewendeten Tumorpanel wurden sieben Mutationen bei HROP68 Tu1 und acht Mutationen bei HROP68 Tu2 detektiert. Im Kontrast dazu steht die höhere Anzahl an Mutationen der korrespondierenden PDX-Modelle. HROP68Tu1 T1 M1 wies dabei 44 und HROP68Tu2 fT0 M2 46 Mutationen auf. Eine ähnliche Beobachtung lässt sich bei HROP75 mit zwei Mutationen und der vergleichsweise hohen Zahl von zwölf Mutationen des PDX (HROP75 fT0 M3) machen. Von HROP88 liegen lediglich WES-Daten des Resektats vor, hier wurden drei Mutationen nachgewiesen.

Mutationen des Patientenmaterials ließen sich größtenteils auch in den PDX-Proben nachweisen. Mit Ausnahme der *CACNA1S* Mutation, welche nur in HROP68 Tu2 auftrat. Diese Mutation wurde nicht im korrespondierenden PDX nachgewiesen. In Tabelle 27 ist zudem abzulesen, dass teilweise Mutationen, welche nicht in HROP68 Tu1 aber im korrespondierenden PDX (HROP68Tu1 T1 M1) auftraten, auch in HROP68Tu2 fT0 M2 detektiert wurden. Darüber hinaus gibt es auch einzelne Mutationen, welche nur in einem der PDX-Modelle vorkamen.

Auf Grund der besonderen Bedeutung von HROP68 wurden weitere genomische Analysen dieses Falls durch Centogene (Rostock, D) durchgeführt. Grundlage war ein WES aller alterierten Gene, auch solcher die nicht in üblichen Tumorpanels verwendet werden. Dabei wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) sowie Insertionen und Deletionen analysiert. Es wurden nur Mutationen gezählt, die proteinkodierend waren, einen moderaten oder hohen Impact hatten, eine Allelfrequenz > 0,3 und eine normale *Depth of Coverage* (> 20) aufwiesen.

In der SNP-Analyse wurde eine hohe Anzahl an Frameshift-Mutationen also Insertionen und Deletionen, nachgewiesen (HROP68Tu1: 51, HROP68Tu1 T1 M1: 84, HROP68Tu2: 78 und HROP68Tu2 fT0 M2: 78).

Abbildung 6 stellt die Unterschiede der SNPs unter den HROP68-Proben (HROP68 Tu1, HROP68Tu1 T1 M1, HROP68Tu2 und HROP68Tu2 fT0 T1 M2) dar. Hier ist abzulesen, wie viele der Mutationen in mehreren Proben und wie viele allein in einer Probe auftraten. Die Zahl der SNPs verteilte sich wie folgt auf die Proben: HROP68Tu1: 274, HROP68Tu1 T1 M1: 698, HROP68Tu2: 376 und HROP68Tu2 fT0 M2: 1245.

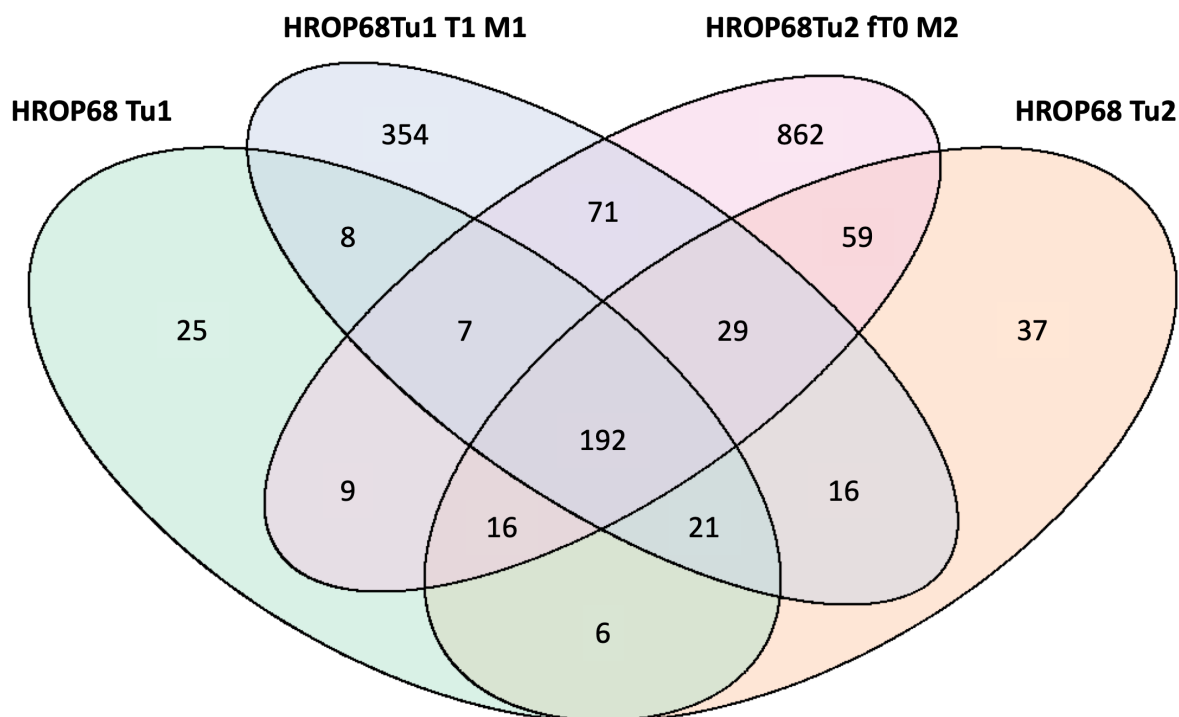


Abbildung 6: Vorkommen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in HROP68-Proben

Anmerkung. Gesamtzahl an SNPs: HROP68Tu1: 274, HROP68Tu1 T1 M1: 698, HROP68Tu2: 376 und HROP68Tu2 ft0 M2: 1245. Die Abbildung wurde von Centogene (Rostock, D) zur Verfügung gestellt.

Primarius (HROP68Tu1) und Rezidiv (HROP68Tu2) sind sich mit 235 gemeinsamen SNPs sehr ähnlich. Die PDX-Modelle besitzen die größte Zahl alleiniger Mutationen (HROP68Tu1 T1 M1: 354, HROP68Tu2 fT0 T1 M2: 862). Darüber hinaus wiesen die PDX-Proben 71 gemeinsame SNPs auf, welche nicht in den korrespondierenden Patientenproben auftraten.

Für HROP68 lässt sich zusammenfassen, dass die PDX-Modelle bedeutend mehr Mutationen aufwiesen als das Tumormaterial. HROP68Tu2 hatte eine größere Ähnlichkeit zu HROP68Tu2 ft0 M2 als zu HROP68Tu1 T1 M1. Eine große Ähnlichkeit bestand zwischen HROP68Tu1 T1 M1 und HROP68Tu2 ft0 M2.

MSI-Score

In Tabelle 20 sind die Gesamtzahl und die Anzahl mutierter *somatic sites* aufgelistet. Zum Vergleich der Mutationslast der Tumorprobe mit dem Normalgewebe wurde Blut der Patientinnen und Patienten verwendet. Der MSI-Score wurde, wie von Niu et al. (2014) beschrieben, bestimmt.

Tabelle 20: MSI-Score

	Gesamtzahl somatic sites	Anzahl mutierter somatic sites	MSI-Score [%]
HROP68 B	542	7	1,29
HROP68 Tu 1	1658	270	16,26
HROP68 Tu 2	1256	173	13,77
HROP75 B	319	15	4,70
HROP75 Tu	1224	50	4,08
HROP88 B	919	35	3,81
HROP88 Tu	1846	70	3,79

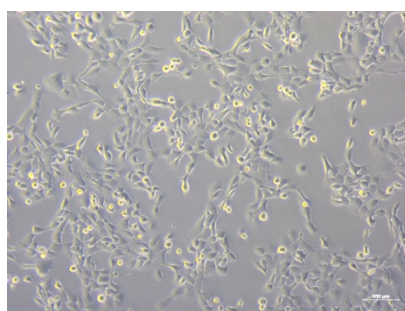
Anmerkung. Mikrosatelliten (MS), Blut (B), Tumor (Tu). MSI Score: $\leq 3,5\%$ = MSS, $3,5-20\%$ = MSI-Low, $\geq 20\%$ = MSI-High.

Bei HROP68 wurde für den Primarius (HROP68 Tu 1) ein MSI-Score von 16,26 % und bei dem Rezidiv (HROP68 Tu 2) ein MSI-Score von 13,77 % ermittelt. Die Tumorproben zeigten einen starken Unterschied zu dem Normalgewebe, welches einen MSI-Score von 1,29 % aufwies. Der MSI-Score lag bei beiden Proben zwischen 3,5 und 20 %, somit wurde die Mikrosatelliteninstabilität als MSI-Low eingestuft

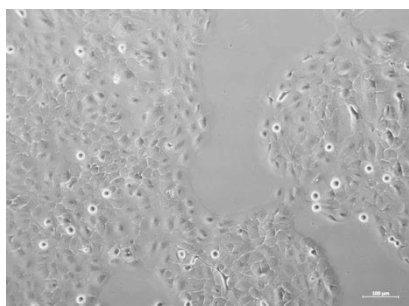
Der MSI-Score der Tumorprobe HROP75 lag mit 4,08 % über der MSI-Low Grenze von 3,5 %, aber unter der Vergleichsprobe aus normalem Gewebe (4,70 %). Somit war bei HROP75 trotz eines MSI-Scores von $> 3,5\%$ von einer MSS auszugehen. Der MSI-Score der Tumorprobe HROP88 lag mit 3,79 % ebenfalls über der MSI-Low Grenze von 3,5 %, aber unter der Vergleichsprobe aus Normalgewebe (3,81). Somit war bei HROP88 trotz eines MSI-Scores von $> 3,5\%$ von einer MSS auszugehen.

3.6 Morphologie und Wachstumsverhalten

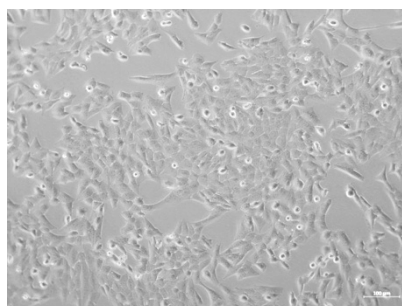
Abbildung 7 zeigt die Morphologie der Zelllinien im Vergleich. Die Zellen wuchsen dabei als adhärenter Monolayer auf dem Boden der Zellkulturflasche. Bei HROP68Tu2 unterschied sich die Morphologie der Zellen untereinander am stärksten, sowohl in ihrer Kern-Plasma-Relation als auch in ihrer Größe. Bei HROP68Tu2, HROP75 und HROP75 T0 M4 traten auch vereinzelt spindelförmige Zellen auf. Diese gemischte Morphologie aus epithelialen und spindelförmigen Zellformen wird im Folgenden als „pleomorph“ bezeichnet. Die Morphologie der Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 war als überwiegend epithelartig zu bezeichnen. Darüber hinaus wuchsen die beiden Zelllinien in dichten Kolonien. HROP68Tu2, HROP75 und HROP75 T0 M4 wuchsen hingegen in kleinen Zellverbänden.



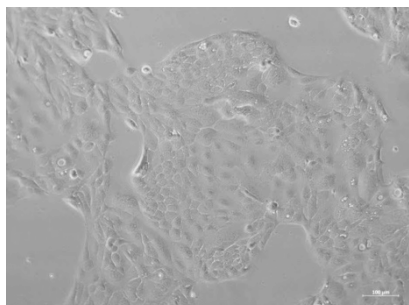
HROP68Tu2 P30



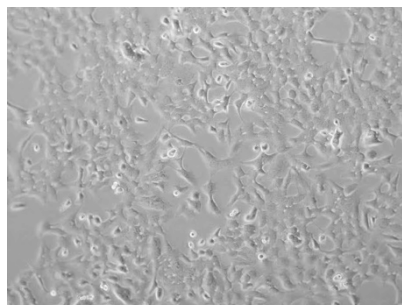
HROP40 T0 M2 P18



HROP75 P44



HROP88 P26



HROP75 T0 M4 P32

Abbildung 7: Morphologie der Zelllinien

Anmerkung. Repräsentative Aufnahmen der Zelllinien. Die Fotos wurden mit dem Zeiss-Primovert-Mikroskop (Carl Zeiss) bei 40x Vergrößerung aufgenommen.

Wachstumskinetik

Das Zellwachstum wurde wie zuvor beschrieben mittels eines KV-basierten Assays bestimmt. In Vorexperimenten wurde dafür die optimale Zellzahl je Well für jede Zelllinie bestimmt. Die ermittelten Zellzahlen für die jeweiligen Zelllinien sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Bei HROP68Tu2 und HROP88 zeigten sich unterschiedliche Wachstumsmuster bei der mehrfachen Wiederholung der Experimente. Teilweise wuchsen die Tumorzellen lediglich am Rand der Wells. Dieses Phänomen wurde als Randeffect bezeichnet. Um dem entgegenzuwirken, wurden bei HROP68Tu2 und HROP88 Kollagen-beschichtete 24-Well-Platten genutzt.

In Abbildung 8 sind die Mittelwerte der Verdopplungszeiten in Stunden und die absoluten Standardabweichungen pro Zelllinie dargestellt. Unterschiede in der Verdopplungszeit wurden mittels Kruskal-Wallis Test ($p = 0,019$) nachgewiesen. Die Ergebnisse des anschließend durchgeführten Post-hoc-Tests sind im Anhang in Tabelle 26 aufgeführt.

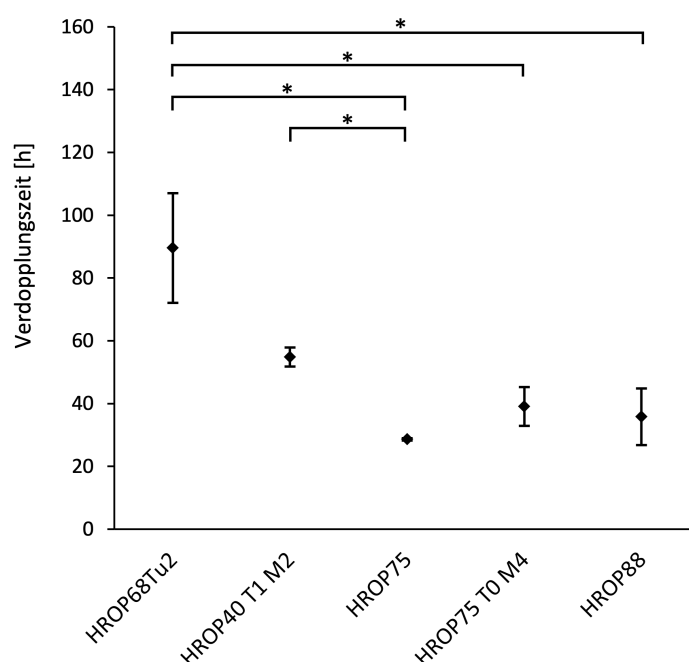


Abbildung 8: Verdopplungszeiten im Vergleich

Anmerkung. Mittelwerte und absolute Standardabweichungen: HROP68Tu2 ($89,56 \pm 17,46$), HROP40 T1 M2 ($54,84 \pm 3,03$), HROP75 ($28,61 \pm 0,37$), HROP75 T0 M4 ($39,09 \pm 6,18$) und HROP88 ($35,81 \pm 9,02$). * = $p < 0,05$

Nach signifikantem Kruskal-Wallis-Test ($H(4) = 11,83$; $p = 0,19$) wurde ein Post-Hoc-Test angeschlossen. Die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 wies die im Vergleich langsamste Verdopplungszeit auf (89,56 h). Ihre gemessene Verdopplungszeit war signifikant langsamer als die der Zelllinien HROP75 ($p = 0,003$), HROP75 T0 M4 ($p = 0,045$) und HROP88 ($p = 0,018$).

3.7 Migration

Die Migration und Invasion von Tumorzellen haben eine große Bedeutung, da Krebs-assoziierte Tode vor allem auf die Metastasierung der Erkrankung zurückzuführen sind (Justus et al., 2014). Um die Zellmigration am Zellkulturmodell darzustellen, wurde ein *Scratch-Assay* verwendet (siehe oben). Die Zellen von HROP75 T0 M4 lösten sich vom Boden der Kulturflasche beim Wechsel von 10 % VM auf 0 % VM ab. Daher wurde in Vorexperimenten die niedrigste FCS-Konzentration bestimmt, bei der sich die Zellen nicht ablösten. Diese lag bei 1,5 % FCS. In den folgenden Abbildungen ist HROP75 T0 M4 daher „eingeklammert“. Es war zu erkennen, dass auch diese geringe FCS-Konzentration zu einer deutlich höheren Migrationsgeschwindigkeit als erwartet führte.

In Abbildung 9 ist das Migrationsverhalten der Zelllinien im Vergleich anhand der relativen Größe des Kratzer-Durchmessers in % über den Messzeitraum von vier Tagen aufgetragen. Die Zelllinie HROP68Tu2 erreichte nach vier Tagen den geringsten Verschluss des Kratzers.

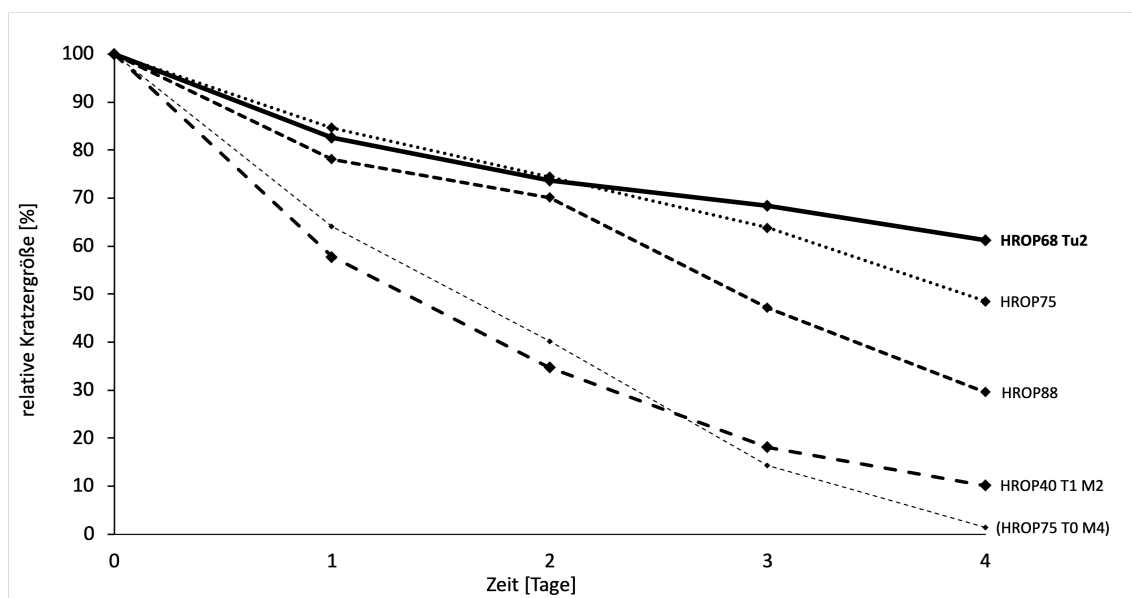


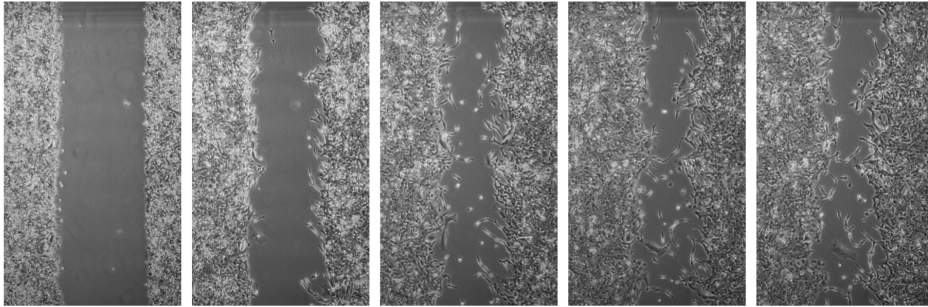
Abbildung 9: Migrationsverhalten anhand des relativen Kratzer-Durchmessers

Anmerkung. Die Messung wurde bei HROP75 T0 M4 mit 1,5 % VM durchgeführt. Die absoluten Werte und die entsprechenden Standardabweichungen sind im Anhang aufgeführt (s.

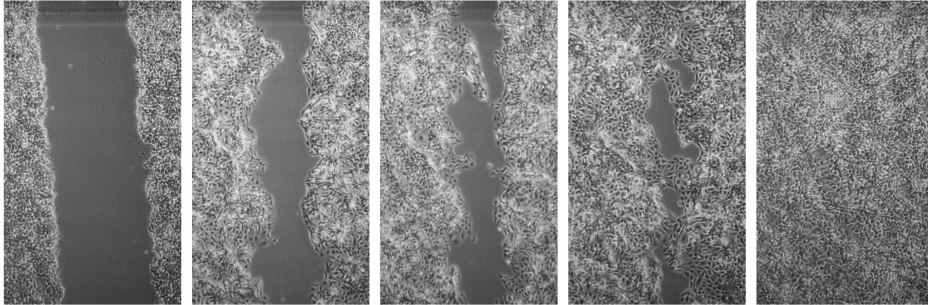
Die Abbildung 10 zeigt die Unterschiede in der Wundschließung zwischen den Zelllinien anhand von durchlichtmikroskopischen Bildern. Nur HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4 erreichten einen fast kompletten Verschluss des Kratzers nach vier Tagen. Bei HROP40 T1 M2 und HROP88 migrierten die Ränder des Kratzers als geschlossener Monolayer aufeinander zu. HROP68Tu2, HROP75 und HROP75 T0 M4 zeigten ein invasiveres Wachstum. Dieses war charakterisiert durch einzelne Zellen, welche den Zellverband verließen und in den Kratzer migrierten (s. Abbildung 10).

3. ERGEBNISSE

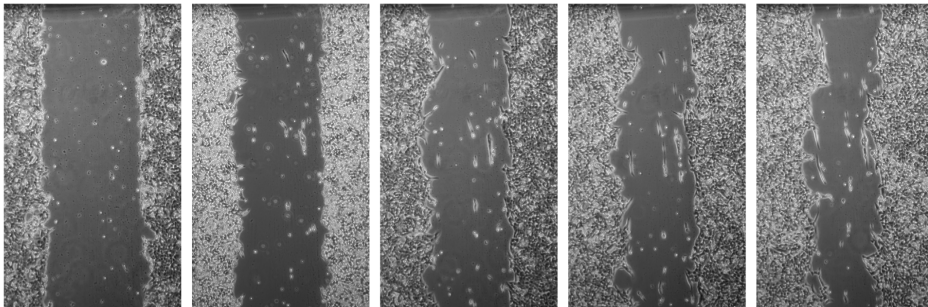
HROP68Tu2 P25



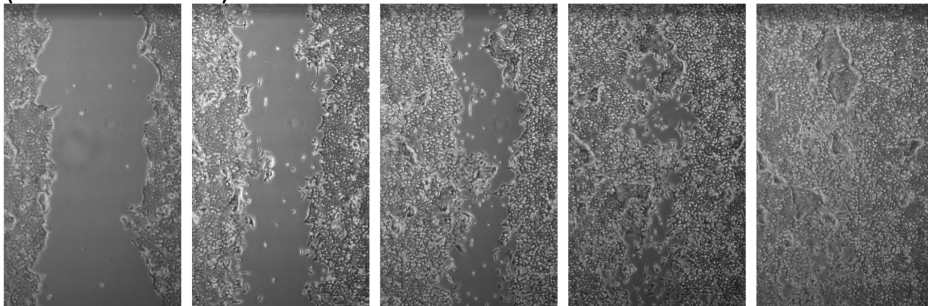
HROP40 T1 M2 P31



HROP75 P25



(HROP75 T0 M4 P31)



HROP88 P22

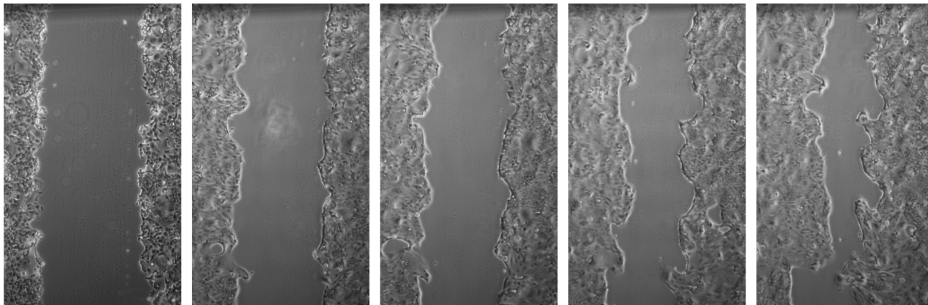


Abbildung 10: Vergleich des Migrationsverhaltens

Anmerkung. * = 1,5 % VM. Aufnahmen der Kratzers von Tag 0 bis Tag 4

3. ERGEBNISSE

Die Abbildung 11 zeigt die Mittelwerte der mittels *Scratch-Assay* bestimmten Migrationsgeschwindigkeiten in $\mu\text{m}/\text{h}$ sowie die absoluten Standardabweichungen pro Zelllinie.

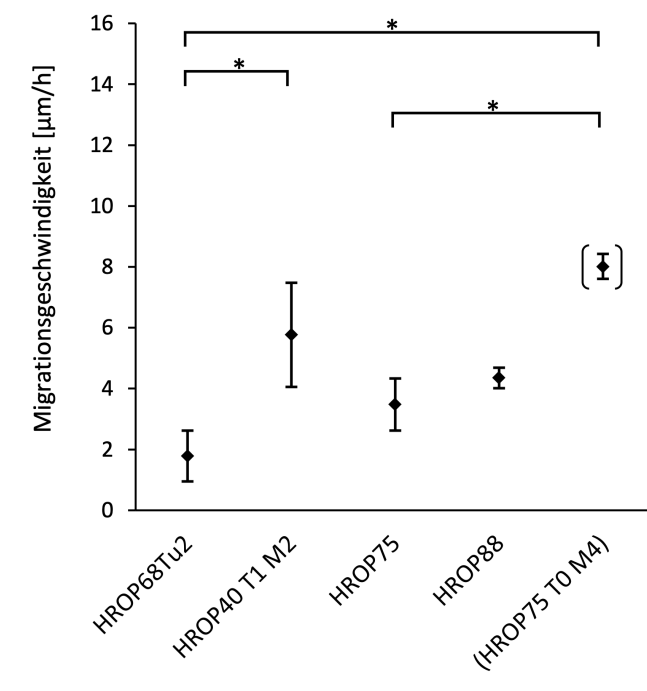


Abbildung 11: Migrationsgeschwindigkeiten im Vergleich

Anmerkung. Mittelwerte und absolute Standardabweichungen: HROP68Tu2 ($1,78 \pm 0,84$), HROP40 T1 M2 ($5,77 \pm 1,71$), HROP75 ($3,48 \pm 0,86$), HROP75 T0 M4 ($8,01 \pm 0,41$) und HROP88 ($4,35 \pm 0,34$). * = $p < 0,05$

Die Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 wiesen die höchste gemessene Migrationsgeschwindigkeit auf, wuchsen aber weniger invasiv (s. Abbildung 10). Die langsamste Migrationsgeschwindigkeit wies die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 mit $1,78 \mu\text{m}/\text{h}$ auf. Nach signifikantem Kruskal-Wallis-Test ($H(4) 14,14$; $p = 0,007$) wurde der Dunn-T-Test als Post-hoc-Test angeschlossen. Die Migrationsgeschwindigkeit der Zelllinie HROP68Tu2 war signifikant geringer als die der Zelllinien HROP40 T1 M2 ($p = 0,014$) und HROP5 T0 M4 ($p < 0,001$). Darüber hinaus war die Migrationsgeschwindigkeit von HROP75 signifikant geringer als die von HROP75 T0 M4 ($p = 0,039$).

3.8 Chemosensitivität

3.8.1 Einzeltestung

Um zu ermitteln, ob eine Zelllinie sensibel oder resistent gegenüber einem Therapeutikum war, wurden die experimentell bestimmten IC_{50} -Werte mit C_{max} -Werten aus der Literatur (Liston & Davis, 2017) (s. Tabelle 29) verglichen. Bei der C_{max} handelte es sich um die maximale Plasmakonzentration, wie sie in Patienten gemessen wurde. Eine IC_{50} kleiner als die C_{max} wurde als Sensibilität im therapeutischen Bereich betrachtet, während eine IC_{50} größer als die C_{max} als Resistenz außerhalb des therapeutischen Bereichs angesehen wurde.

In der Abbildung 12 sind die Mittelwerte der IC_{50} mit den entsprechenden SD im Vergleich zu den C_{max} -Werten nach Liston and Davis (2017) dargestellt. Anhand dieser Abbildung lässt sich die Chemosensitivität der Zelllinien bezüglich der Einzel-Therapeutika evaluieren.

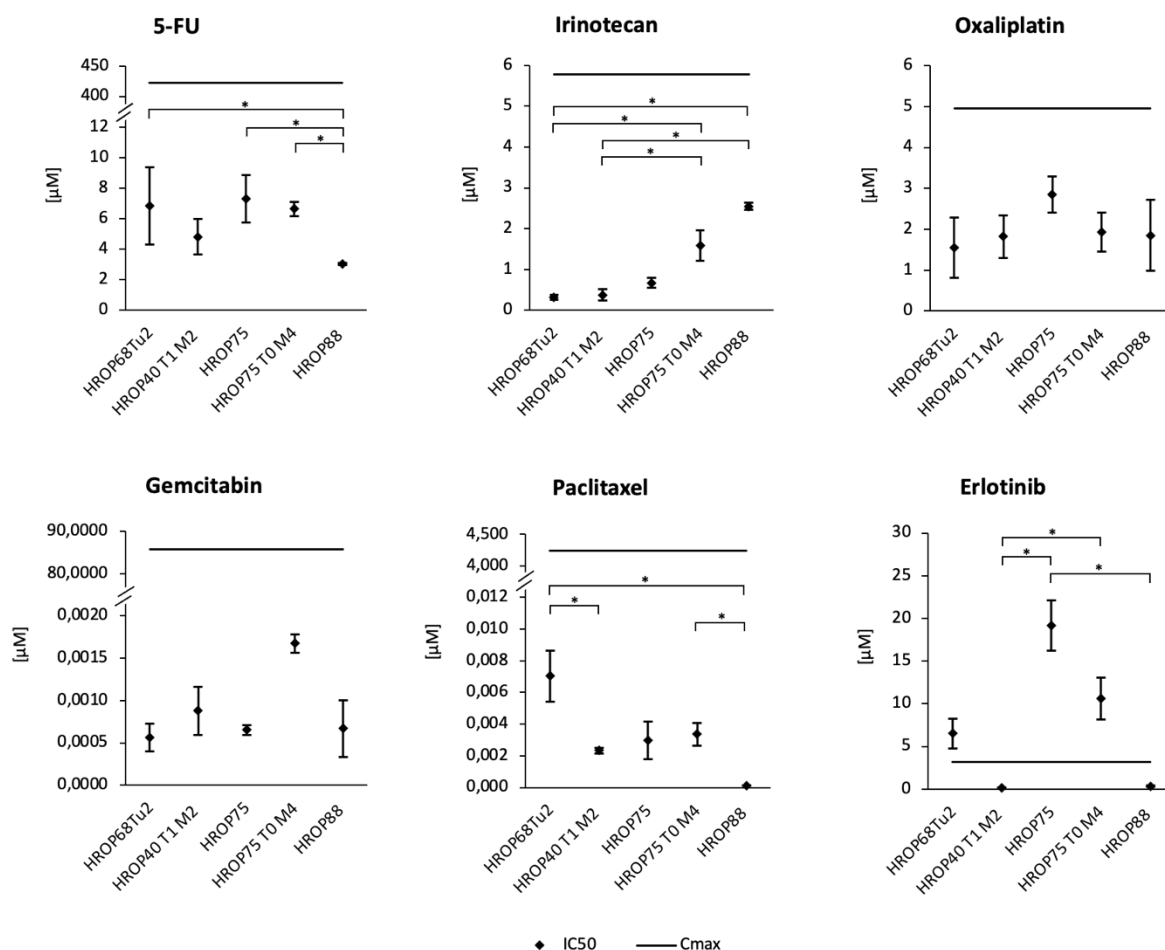


Abbildung 12: Einzeltestung IC_{50} - und C_{max} -Werte im Vergleich

Anmerkung. Die IC_{50} -Mittelwerte sind in μM angegeben (Rauten) mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD). Die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) (horizontale Linie) ist wie von Liston and Davis (2017) veröffentlicht angegeben (ebenfalls in nM). Die absoluten Werte sind im Anhang in Tabelle 29 aufgeführt. * = $p < 0,05$

3. ERGEBNISSE

Im Vergleich der IC_{50} und C_{max} zeigte sich, dass alle Zelllinien sensibel gegenüber den Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Gemcitabin und Paclitaxel waren. Unterschiede in der Sensibilität zwischen den Zelllinien traten bei Erlotinib auf. Die ermittelten IC_{50} von HROP68Tu2, HROP75 und HROP75 T0 M4 lagen über der C_{max} , daher waren diese Zelllinien als resistent gegenüber Erlotinib zu bezeichnen. Die Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 waren sensibel gegenüber Erlotinib.

Um zu untersuchen, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten der Zelllinien bestanden, wurde der Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,05$) wie in 2.2.13 beschrieben angewendet. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien bei den folgenden Therapeutika festgestellt: 5-FU ($H(4) = 10,57$; $p = 0,032$), Irinotecan ($H(4) = 13,56$; $p = 0,009$), Paclitaxel ($H(4) = 12$; $p = 0,017$) und Erlotinib ($H(4) = 12,52$; $p = 0,014$). Hingegen zeigten sich bei Oxaliplatin ($H(4) = 5,37$; $p = 0,252$) und Gemcitabin ($H(4) = 5,77$; $p = 0,252$) keine statistisch signifikanten Unterschiede der IC_{50} .

Nach signifikantem Kruskal-Wallis-Test wurde bei den entsprechenden Therapeutika eine Post-hoc-Analyse mittels Dunn-T-Test durchgeführt (s. 2.2.13). Diese identifizierte mehrere signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Zelllinien. Die Ergebnisse der Post-hoc-Analyse sowie die Bonferroni korrigierten Ergebnisse sind ausführlich im Anhang (s. Tabelle 30) aufgeführt.

Die Post-hoc-Analyse mittels Dunn-T-Test ergab bei 5-FU signifikante Unterschiede zwischen den IC_{50} -Mittelwerten der Zelllinien HROP68Tu2 und HROP88 ($p = 0,011$), zwischen HROP75 und HROP88 ($p = 0,01$), wie auch HROP75 T0 M4 und HROP88 ($p = 0,015$) (s. Abbildung 12 und Tabelle 30).

Bei Irinotecan ergab diese Analyse signifikante Unterschiede zwischen den folgenden Zelllinien: HROP68Tu2 und HROP75 T0 M4 ($p = 0,032$), HROP68Tu2 und HROP88 ($p = 0,004$), HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4 ($p = 0,033$), HROP40 T1 M2 und HROP88 ($p = 0,003$) sowie (s. Abbildung **12** und Tabelle **30**).

Gegenüber Paclitaxel zeigten sich nach Durchführung des Dunn-T-Tests statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der folgenden Zelllinien: HROP68Tu2 und HROP40 T1 M2 ($p = 0,028$), HROP68Tu2 und HROP88 ($p = 0,001$) sowie HROP75 T0 M4 und HROP88 ($p = 0,028$) (s. Abbildung 12 und Tabelle 30).

Für Erlotinib wurden signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP75 ($p = 0,001$), HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4 ($p = 0,019$) sowie HROP75 und HROP88 ($p = 0,019$) nachgewiesen (s. Abbildung 12 und Tabelle 30).

3.8.2 Kombinationen

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der kombinierten Chemosensitivitätstestung dargestellt. Die molaren Verhältnisse der Kombinationen wurden zuvor in Tabelle 13 aufgeführt. Die angegebenen IC_{50} -Werte beziehen sich dabei immer auf den Hauptanteil der jeweiligen Kombination (FOLFIRINOX: 5-FU, GemPac: Gemcitabin und GemErlo: Gemcitabin). Im Folgenden wird dies als IC_{50} relativ (rel.) zu der Hauptkomponente bezeichnet. Die abgebildete C_{max} bezieht sich ebenfalls auf die Hauptkomponenten.

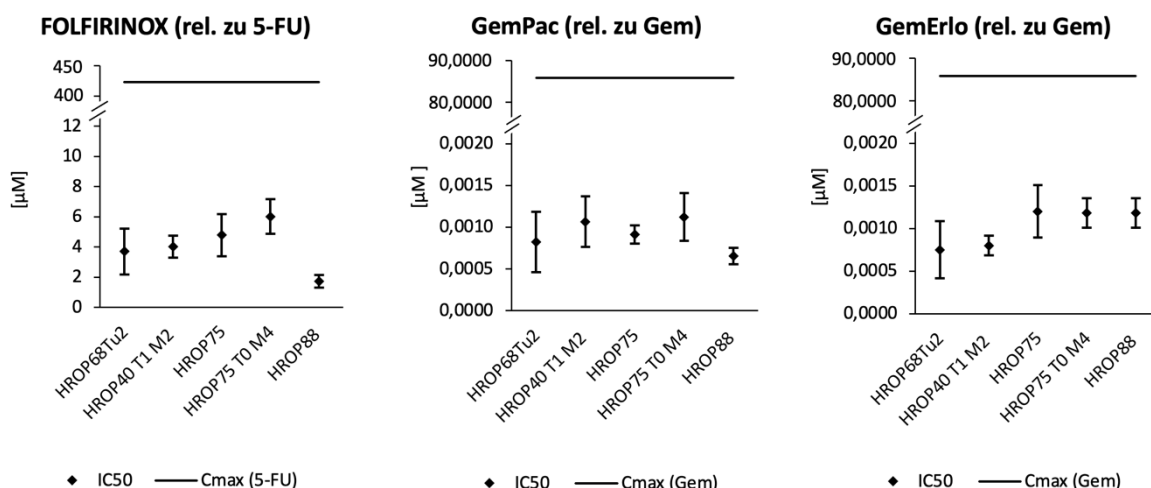


Abbildung 13: Kombinationstestung IC_{50} -Werte und C_{max} -Werte im Vergleich

Anmerkung. Die IC_{50} -Mittelwerte sind in μM angegeben (Rauten) mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD). Die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) (horizontale Linie) ist wie von (Liston & Davis, 2017) veröffentlicht angegeben (ebenfalls in μM). Die angegebenen IC_{50} -Werte beziehen sich dabei immer auf den Hauptanteils der jeweiligen Kombination (FOLFIRINOX: 5-FU, GemPac: Gemcitabin und GemErlo: Gemcitabin). Für FOLFIRINOX ist die C_{max} von 5-FU dargestellt, für GemPac und Gem Erlo die von Gemcitabin.

Um zu untersuchen, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten der Zelllinien bestanden, wurde der Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,05$) wie in 2.2.13 beschrieben angewendet. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der IC_{50} -Mittelwerte bei den getesteten Kombinationen festgestellt werden: FOLFIRINOX ($H(4) = 9,43$; $p = 0,051$), GemPac ($H(4) = 6,5$; $p = 0,165$) und GemErlo ($H(4) = 6,21$; $p = 0,184$).

In Tabelle 21 und Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Interaktionsberechnung der Kombinationen FOLFIRINOX sowie GemPac und GemErlo aufgeführt.

Tabelle 21: Interaktion von FOLFIRINOX

FOLFIRINOX								
Zelllinien	IC ₅₀ [µM]						Interaktion	
	5-FU	FOLFIRINOX (Relativ zu 5-FU)	Irino.	FOLFIRINOX (Relativ zu Irinotecan)	Oxa.	FOLFIRINOX (Relativ zu Oxaliplatin)	CI	
HROP68 Tu2	6,83	3,69	0,31	0,04	1,55	0,03	0,71	Mod. Syn.
HROP40 T1 M2	4,80	4,01	0,37	0,04	1,82	0,03	0,99	Add. Eff.
HROP75	7,29	4,78	0,66	0,05	2,84	0,04	0,76	Mod. Syn.
HROP75 T0 M4	6,61	6,01	1,58	0,07	1,93	0,05	0,99	Add. Eff.
HROP88	2,99	1,73	2,55	0,02	1,85	0,01	0,59	Syn.

Anmerkung. Die IC₅₀-Werte der Einzeltestung und der FOLFIRINOX-Kombination sind in µM angegeben. Die IC₅₀-Werte der Kombination sind relativ zu der entsprechenden Komponente angegeben, abhängig von der molaren Ratio (s. 2.2.11). Synergismus (Syn), moderater Synergismus (Mod. Syn.) und additiver Effekt (Add. Eff.).

Tabelle 22: Interaktion von GemPac und GemErlo

GemPac						
Zelllinie	IC ₅₀ [µM]				Interaktion	
	Gemcitabin	GemPac (Relativ zu Gemcitabin)	Paclitaxel	GemPac (Relativ zu Paclitaxel)	CI	
HROP68Tu2	0,57 ×10⁻³	0,82 ×10⁻³	7,04 ×10⁻³	0,03 ×10⁻³	1,44	Anta.
HROP40 T1 M2	0,88 ×10 ⁻³	1,07 ×10 ⁻³	2,34 ×10 ⁻³	0,04 ×10 ⁻³	1,23	Mod. Anta.
HROP75	0,65 ×10 ⁻³	0,91 ×10 ⁻³	2,97 ×10 ⁻³	0,03 ×10 ⁻³	1,41	Anta.
HROP75 T0 M4	1,68 ×10 ⁻³	1,12 ×10 ⁻³	3,36 ×10 ⁻³	0,04 ×10 ⁻³	0,68	Mod. Syn.
HROP88	0,67 ×10 ⁻³	0,65 ×10 ⁻³	0,10 ×10 ⁻³	0,02 ×10 ⁻³	1,23	Mod. Anta.

GemErlo						
Zelllinie	IC ₅₀ [µM]				Interaktion	
	Gemcitabin	GemErlo (Relativ zu Gemcitabin)	Erlotinib	GemErlo (Relativ zu Erlotinib)	CI	
HROP68Tu2	0,57 ×10⁻³	0,75 ×10⁻³	6,52	0,02	1,32	Anta.
HROP40 T1 M2	0,88 ×10 ⁻³	0,80 ×10 ⁻³	0,19	0,03	1,07	Add. Eff.
HROP75	0,65 ×10 ⁻³	1,20 ×10 ⁻³	19,18	0,04	1,85	Anta.
HROP75 T0 M4	1,68 ×10 ⁻³	1,18 ×10 ⁻³	10,59	0,04	0,71	Mod. Syn.
HROP88	0,67 ×10 ⁻³	0,74 ×10 ⁻³	0,34	0,02	1,19	Mod. Anta.

Anmerkung. Die IC₅₀-Werte der Einzeltestung und die GemPac und GemErlo-Kombination sind in µM angegeben. Die IC₅₀-Werte der Kombination sind relativ zu der entsprechenden Komponente angegeben, abhängig von der molaren Ratio (s. 2.2.11). Moderater Synergismus (Mod. Syn.), additiver Effekt (Add. Eff.), moderater Antagonismus (Mod. Anta.) und Antagonismus (Anta.).

3. ERGEBNISSE

Die meisten additiven und synergistischen Effekte wurden gegenüber der Kombinationstherapie FOLFIRINOX nachgewiesen. Die Kombinationstherapie FOLFIRINOX erzielte bei allen Zelllinien verstärkende Interaktionen (additive oder synergistische Effekte) und somit eine stärkere Wirkung als die 5FU-Monotherapie. Additive Effekte zeigten HROP40 T1 M2 (CI: 0,99) und HROP75 T0 M4 (CI: 0,99). Moderat synergistische Effekte wurden bei HROP68Tu2 (CI: 0,71) und HROP75 (CI: 0,76) gemessen. Die stärkste positive Interaktion zeigte sich bei HROP88, hier wurde ein Synergismus nachgewiesen (CI: 0,59).

Die Kombination GemPac erzielte größtenteils antagonistische Effekte. Die Kombination von Gemcitabin und Paclitaxel wirkte bei HROP68Tu2 (CI: 1,44) und HROP75 (CI: 1,41) antagonistisch. Moderat antagonistische Effekte zeigten sich für HROP40 T1 M2 (CI: 1,23) und HROP88 (CI: 1,23). Die stärkste positive Interaktion stellte sich bei HROP75 T0 M4 ein, hier wurde ein moderater Synergismus gemessen (CI: 0,68).

Die Kombination GemErlo erzielte ebenfalls größtenteils antagonistische Effekte. Die kombinierte Wirkung von Gemcitabin und Paclitaxel bei HROP68Tu2 (CI: 1,32) und HROP75 (CI: 1,85) war antagonistisch. Ein moderater Antagonismus zeigte sich bei HROP88 (CI: 1,19). Verstärkende Interaktionen wurden bei HROP40 T1 M2 (additiver Effekt, CI: 1,07) und HROP75 T0 M4 (moderater Synergismus, CI: 0,71) detektiert.

3.9 Durchflusszytometrie

In Abbildung 14 ist die Expression von Oberflächenproteinen anhand des Anteils der positiv gefärbten Zellen in Prozent und der MFIR in Form einer Heatmap dargestellt (Standardabweichungen: s. Tabelle 32). Dabei sind die Mittelwerte, die aus mindestens drei unabhängigen Messungen generiert wurden, aufgeführt. Es wurden Tumormarker, Signaltransduktion und Proliferation (CD326, CD66adeceb, CD15, CD26, CD29, CD71, EGFR, HER2, Mesothelin und Krebs-IgG), Chemo-Resistenz (CD227 und CD13), Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion (CD54, CD58, CD80 und CD86), Todesligand und -Rezeptor (CD95 und CD178), sowie Marker der Immunogenität und Immunsuppression (MHC-1, MHC2, CD90, CD40, CTLA4, PD-1 und PD-L1) durchflusszytometrisch untersucht.

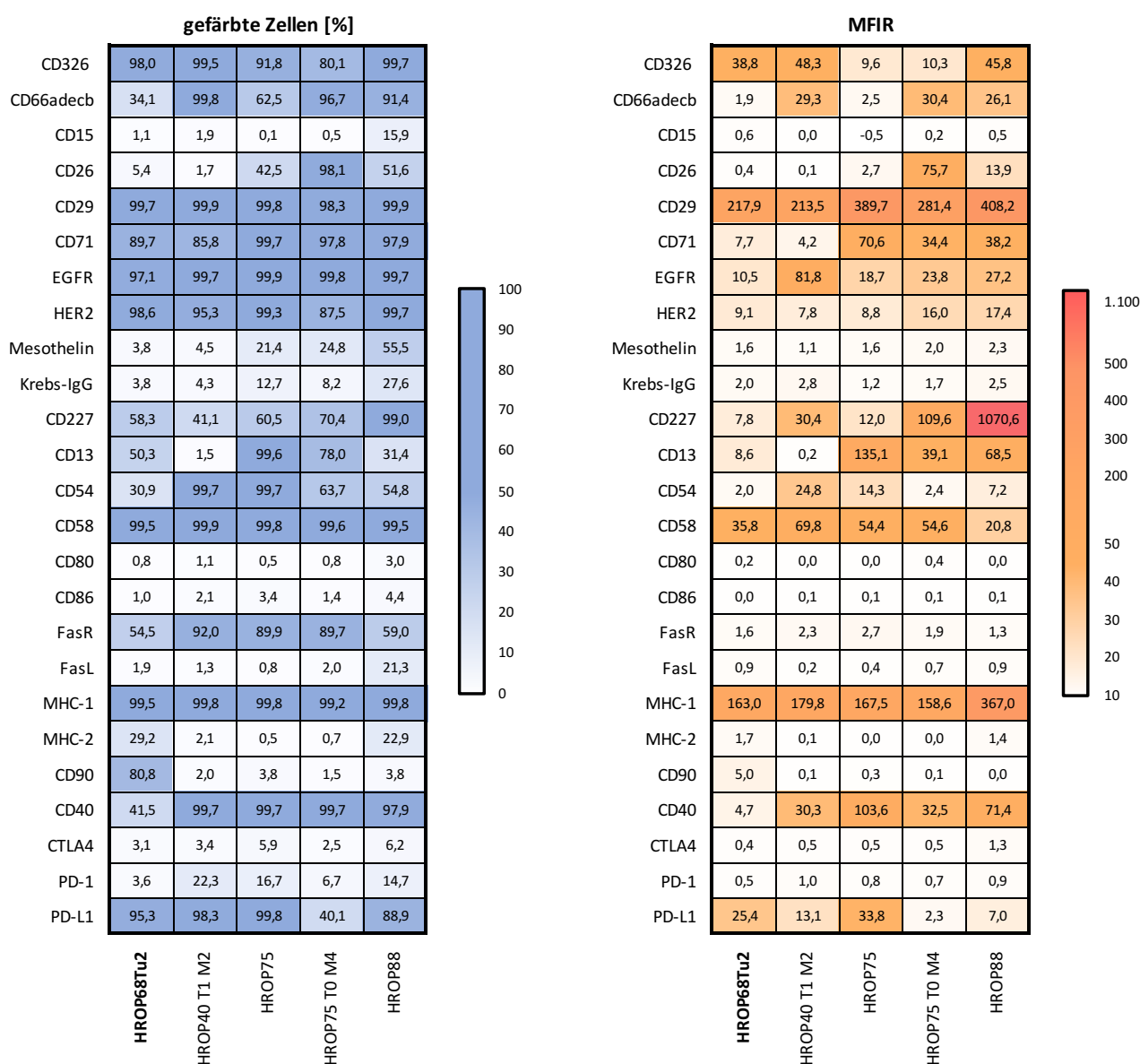


Abbildung 14: Heatmap Durchflusszytometrie

Anmerkung. Expression von Oberflächenantigenen. Standardabweichungen der positiv gefärbten Zellen und der MFIR s. Tabelle 32, Färbeansätze s. Tabelle 31.

Im Folgenden wird der Ausdruck „Expression“ für das Vorhandensein der detektierten Proteine auf der Zelloberfläche der Tumorzellen verwendet. Von einer homogenen Expression eines Markers wurde ausgegangen, wenn im *Density-Plot* lediglich eine Population an Zellen abzugrenzen war. Die Breite der Expression wurde ebenfalls bestimmt. Zeigten Zellen einer Population große Unterschiede in der Expression der entsprechenden Marker (breite Population auf der x-Achse), wurde dies als breite Varianz in der Expression bezeichnet. Konnten im *Density-Plot* zwei Populationen abgegrenzt werden, wurde die Expression als heterogen bezeichnet.

Epithel- und Tumormarker-Expression

Die Expression der Epithel- und Tumormarker CD326 und CD66adeceb wurden verwendet, um den epithelialen Ursprung der Zelllinien nachzuweisen; sie stellen damit einen Teil der Qualitätskontrolle im Rahmen der Etablierung dar. Mit dem verwendeten AK konnten die Subtypen a, b, c, d und e der CEA-Antigen-Familie detektiert werden, daher wird im Verlauf die etablierte Bezeichnung CD66adeceb verwendet. Im Anhang (s. Abbildung 15) sind die Expression von CD326 und CD66adeceb der fünf Zelllinien vergleichend, anhand von *Density-Plots* und Histogrammen, dargestellt.

Alle Zelllinien exprimierten CD326, somit konnte von einem epithelialen Ursprung aller fünf Zelllinien ausgegangen werden. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien wurde bei HROP68Tu2 (34,1 %, MFIR: 1,9) eine geringere Expression gemessen (HROP40 T1 M2 [99,8 %, MFIR: 29,3], HROP75 T0 M4 96,7 %, MFIR: 30,4] und HROP88 [91,4 %, MFIR: 26,1]). Bei HROP75 lag eine heterogene CD66adeceb-Expression vor, mit einer großen Standardabweichung der positiv gefärbten Zellen (62,5 % $\pm$ 30,8 %) und einer im Vergleich niedrigeren MFIR von 2,5. Eine CD66adeceb-positive Subpopulation ließ sich nicht eindeutig abgrenzen.

MHC-Expression

Im Anhang (s. Abbildung 16) sind die Expression von MHC-1 und MHC-2 der fünf Zelllinien vergleichend, anhand von *Density-Plots* und Histogrammen, dargestellt. Die Expression von MHC-1 war bei allen Zelllinien erhalten (> 99 %) mit einem homogenen Expressionsmuster. Die stärkste Expression lag bei HROP88 mit einer MFIR von 367 vor. Nur die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 und HROP88 zeigten eine signifikante Expression von MHC-2. Bei HROP68Tu2 (29,2 %, MFIR: 1,7) konnte keine zweite Population sicher abgegrenzt werden. Bei HROP88 deutete sich hingegen eine MHC-2-positive Subpopulation im *Density-Plot* und Histogramm an (22,9 %, MFIR: 1,4).

EGFR und HER-2-Expression

Alle Zelllinien waren homogen EGFR- (> 97 %), sowie HER-2-positiv (s. Abbildung 17). Mit der Ausnahme von HROP75 T0 M4 (87,5 %) waren mehr als 95 % der Zellen der restlichen Zelllinien HER-2-positiv. Während die MFIR von HER2 nur eine kleine Varianz zwischen den Zelllinien (MFIR: 7,8 bis 17,4) aufwies, lagen größere Unterschiede in der MFIR bei der EGFR-Expression vor. Die stärkste EGFR-Expression wurde für HROP40 T1 M2 (MFIR: 81,8) gemessen.

Um die Korrelation zwischen der EGFR-Expression und dem Ansprechen auf die Anti-EGFR Therapie mit Erlotinib zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der EGFR-Expression und den IC50-Werten der Zelllinien, die für Erlotinib bestimmt wurden.

Tabelle 23: Korrelation der EGFR-Expression mit der IC₅₀ von Erlotinib

		EGFR (Expression in %)	EGFR (Expression in MFIR)
IC50 (Erlotinib)	Pearson-Korrelation	0,699	-0,376
	Sig. (2-seitig)	0,189	0,533
	N	5	5

Anmerkung. Zweiseitige Signifikanz (Sig [2-seitig]), Anzahl der Zelllinien (N).

PD-1 und PD-L1-Expression

Mit Ausnahme HROP75 T0 M4 exprimierten alle Zelllinien homogen PD-L1. Bei HROP75 T0 M4 (40,1 %, MFIR: 2,3) zeigte sich eine kleine PD-L1-positive Subpopulation (s. Abbildung 18). Bei allen Zelllinien wurde eine kleine PD-1-positive Subpopulation gemessen, der höchste Wert positiv angefärbter Zellen wurde bei HROP40 T1 M2 (22,3 %) gemessen. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der EGFR-Expression und den IC50-Werten.

Weitere Oberflächenproteine

HROP68Tu2 und HROP40 T1 M2 zeigten eine geringere CD71-Expression als die anderen Zelllinien. Alle Zelllinien exprimierten CD54 (ICAM-1), jedoch in unterschiedlicher Ausprägung und Intensität. CD58 oder *lymphocyte function-associated antigen 3* (LFA-3) wurde von allen Zelllinien mit mehr als 99 % exprimiert. HROP68Tu2 zeigte eine geringere Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie 5 (TNFRSF5) und CD40-Expression (41,5 %, MFIR: 4,7) als die anderen Zelllinien. Diese waren mit > 99 % homogen CD40-positiv. Darüber hinaus wurde bei diesen auch eine bedeutend höhere MFIR gemessen (HROP40 T1 M2: 30,3; HROP75: 103,6; HROP75 T0 M4: 32,5 und HROP88: 71,4).

4. Diskussion

Das PDAC hat trotz massiver Forschungsbemühungen noch immer eine schlechte Prognose (siehe oben). Zur Entwicklung neuer Therapien werden aus Patientinnen und Patienten etablierte Tumormodelle benötigt, welche die Grundlage der präklinischen und translationalen Forschung darstellen (Krempley & Yu, 2017; Mullins et al., 2019). Bei der 2D-Zelllinie handelt es sich um ein seit langem etabliertes Forschungsmodell, welches sich besonders für der Evaluation neuer Therapien für seltene Erkrankungen eignet (Rivera et al., 2021; Wagner et al., 2021).

Das PDAC bietet einige Besonderheiten bei der Etablierung von 2D-Zelllinien. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine so genannte intratumorale Heterogenität aus. Darunter versteht man, dass ein Tumor aus verschiedenen Bereichen besteht, welche unterschiedliche molekularpathologische Eigenschaften besitzen (Gutierrez et al., 2021). Daher kann es bei der Etablierung verschiedener Modelle aus einem Tumor dazu kommen, dass sie sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Um die große phänotypische Heterogenität des Tumors mit 2D-Zelllinien darstellen zu können, ist es daher notwendig, immer neue primäre Tumorzelllinien zu entwickeln (Rückert et al., 2012). So kann vermieden werden, auf lang etablierte und weit verbreitete Zelllinien zurückgreifen zu müssen, die sich häufig von der originalen Tumormikro- und Makroarchitektur weit entfernt haben.

Im Rahmen des interdisziplinären BioBank-Projektes der AG MOI der Universitätsmedizin Rostock wurden seit 2007 in Summe 155 PDAC-Tumorproben gesammelt (Stand: 01.10.2022). Erst eine solche Infrastruktur ermöglicht die Etablierung neuer Zelllinien auch von seltenen Tumoren wie dem MPC. Diese stellt jedoch vor allem beim PDAC auf Grund der besonderen Histopathologie eine Herausforderung dar. Dazu gehören der mit etwa 10 % geringe Anteil an epithelialen Tumorzellen an der Gesamtmasse des Tumors, die umgebene desmoplastische Reaktion und die damit einhergehende Überproduktion von Fibroblasten sowie die häufig geringe Größe des Tumors zum Zeitpunkt der Resektion (Kim et al., 2017; Rückert et al., 2012; Xie & Xie, 2015). Daher stehen der Forschung bedeutend weniger PDAC-Zelllinien zur Verfügung, als dies bei anderen Tumorleiden der Fall ist (Kim et al., 2017).

4.1 Etablierung und Qualitätskontrolle

Von den initial zwölf in Kultur genommenen Zelllinien starben im Rahmen der Etablierung zwei der Zelllinien (HROP10 T5 M2, HROP25 T0 M2). Bei der Kultivierung einer heterogenen Tumorprobe setzt sich in der Regel der Zellklon mit dem schnellsten Wachstum durch und verdrängt die anderen Zelltypen. Dabei verdrängen die in der Mehrzahl vorkommenden Stromazellen häufig die epithelialen Tumorzellen. Dieses Phänomen trat bei der Etablierung von HROP100 und HROP100 T0 M1 auf und

stellte in der Etablierung primärer und sekundärer PDAC-Zelllinien ein bekanntes Problem dar (Rückert et al., 2012).

Auf Grund dieser Herausforderungen ist die Etablierungsrate von PDAC-Zelllinien gering. Rückert et al. (2012) beschrieben die erfolgreiche Etablierung von fünf primären Pankreaskarzinom-Zelllinien aus 54 Patientenproben (Etablierungsrate von 9,3 %). Kim et al. (2017) beschrieben eine Etablierungsrate von 7,4 % (6/81). In unserer Arbeitsgruppe wurden (Stand 16. Nov. 2024) bei 42 PDAC-Fällen 55 Etablierungsversuche unternommen. In Summe wurden 13 Zelllinien aus dem Tumormaterial von 11 Patientinnen und Patienten erfolgreich etabliert. Dies entsprach einer Gesamtablierungsrate von 23,6 % (13/55). Diese waren bei 3 von 24 (12,5 %) Versuchen der Etablierung von primären Zelllinien und bei 10 von 31 (32,3 %) Versuchen der Etablierung von sekundären Zelllinien erfolgreich.

Die sekundären Zelllinien wurden aus subkutan-xenotransplantierten Tumoren etabliert. Diese Methode ist technisch einfacher und ermöglicht im Vergleich zu orthotoper Transplantation eine ständige Kontrolle der Tumorgroße. Zwar zeigen sich genetisch zwischen orthotoper und subkutaner Xenotransplantation kaum Unterschiede (Jun et al., 2018), doch die subkutane Transplantation geht, verglichen mit der orthotopen Transplantation, mit einer unphysiologischen Tumor-Stroma Interaktion einher (Richmond & Su, 2008). In der AG MOI wurden die Tumormaterialien subkutan xenotransplantiert, da dieses Verfahren in der Arbeitsgruppe auch bei anderen Tumorentitäten verwendet wurde.

Als erster Schritt der Qualitätskontrolle während der Etablierung wurde eine human spezifische Cytochrom-B-PCR durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Zelllinien HROP67 T1 M2 und HROP88 T0 M2 nicht humanen Ursprungs waren. Die Zelllinien waren zuvor schon durch eine fibroblastenartige Morphologie aufgefallen.

Das Wachstum der Zelllinie HROP54 T1 M1 war so langsam, dass sie nicht rechtzeitig final etabliert werden konnte, um in diese Arbeit eingeschlossen zu werden. Dementsprechend verringerte sich die Zahl der Zelllinien von initial zwölf auf fünf. Die verbleibenden Zelllinien (HROP68Tu2, HROP40 T1 M2, HROP75, HROP75 T0 M4 und HROP88) wurden regelmäßig auf etwaige Mykoplasmen-Kontaminationen getestet, welche zu keinem Messzeitpunkt nachgewiesen wurden.

Zum Nachweis der Patientinnen- bzw. Patientenzugehörigkeit der Zelllinien und zum Ausschluss etwaiger Verwechslungen von Proben wurde im nächsten Schritt der Qualitätskontrolle eine STR-Analyse mittels Multiplex PCR und anschließender Kapillarelektrophorese durchgeführt. Für die Auswertung wurde das STR-Profil des Normalgewebes mit dem der Zelllinie verglichen.

Die stärksten Abweichungen im STR-Profil wurden zwischen den untersuchten HROP68-Proben festgestellt. Bei drei Markern kam es zu Abweichungen in der Fragmentlänge der Allele, bei zwei

Markern kam es zu einem Allel-Zugewinn und bei vieren zu einer LOH. Sowohl eine LOH als auch ein Allel-Zugewinn könnte in Zusammenhang mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium stehen, wie es bei HROP68 vorlag (G 3-4) (Masters et al., 2001). Darüber hinaus kam es bei dem Material des phänotypisch männlichen Patienten zu einer Konversion des Geschlechtsmarkers von männlich zu weiblich, welche Ausdruck des Verlusts des Y-Chromosoms ist. In der Zusammenschau zeigten die Ergebnisse der STR-Analyse der HROP68-Proben deutlich, dass immer neue genetische Mutationen über die Zeit auftraten. Bei HROP68 lagen diese Ergebnisse in der MSI begründet. Dieser Zusammenhang wird in der Diskussion an späterer Stelle genauer beleuchtet.

Bei den Normaltyp-PDAC-Fällen kam es zu bedeutend weniger Abweichungen im STR-Profil als bei HROP68. Bei HROP40 kam es zu Veränderungen in der Fragmentlänge dreier Marker-Allele, die allesamt jeweils ein Basenpaar kürzer waren als die des Normalgewebes. Die Ursache dieser Abweichungen waren wahrscheinlich Deletionen. Die HROP75 Proben wiesen lediglich eine Veränderung in der Allel-Fragmentlänge und eine LOH bei zwei Markern auf. Bei HROP88 wurde eine LOH und zwei Abweichungen in der Fragmentlänge nachgewiesen. Bei den Zelllinien HROP75 und HROP88, die beide als UICC-3-Tumor klassifiziert wurden, könnte die LOH mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium in Zusammenhang stehen. HROP40 wurde als UICC 2 klassifiziert und wies keine LOH auf, was diese These unterstützt.

Eine Konversion des Geschlechtsmarkers von weiblich zu männlich, welche ein Indiz einer Probenverwechslung sein könnte, war bei keiner der Proben zu verzeichnen. Die Abweichungen in der Fragmentlänge können auf die Markerinstabilität oder Mutationen zurückgeführt werden. Auf Grund der nur geringen Abweichungen des STR-Profils der Proben untereinander konnte die Patientenzugehörigkeit der Zelllinien festgestellt werden. Komplementiert wurde die Qualitätskontrolle mittels Durchflusszytometrie. Alle fünf Zelllinien exprimierten die Tumormarker CD66 und CD326, letzterer wies den epithelialen Ursprung der Zellen nach.

4.2 Basischarakterisierung

Nach der Qualitätskontrolle erfolgte eine Basischarakterisierung welche die Morphologie sowie das Wachstums- und Migrationsverhalten einschloss.

Morphologie

Morphologisch können PDAC-Zelllinien in zwei Gruppen eingeteilt werden. Ihre Morphologie kann als rein epithelartig oder pleomorph (gemischt epithelartig und spindelförmig) unterschieden werden

(Shichi et al., 2022). Die Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 wuchsen rein epithelartig und in dichten Zellverbänden. Die Morphologie der MPC-Zelllinie HROP68Tu2 hingegen war als pleomorpher Phänotyp zu beschreiben. Die Morphologie der Zelllinien HROP75 und HROP75 T0 M4 war vergleichbar zu der von HROP68Tu2. Darüber hinaus wuchsen diese drei Zelllinien als einzelne, weniger gruppierte Zellen im Vergleich zu HROP40 T1 M2 und HROP88, welche in dichten Zellkolonien wuchsen.

Wachstumsgeschwindigkeit

Die experimentell bestimmten Verdopplungszeiten waren vergleichbar mit denen bekannter PDAC-Zelllinien wie Mia PaCa-2 mit 40 h (Yunis et al., 1977), Pan-1 mit 52 h (Lieber et al., 1975) und Capan-2 mit 90 h (Kyriazis et al., 1986). Somit waren die hier ermittelten Verdopplungszeiten als plausibel anzusehen.

Die Verdopplungszeit von HROP68 Tu2 war die im Vergleich höchste (98,6 h). Somit zeigte die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 ein langsames Wachstum als die Normaltyp-PDAC-Zelllinien. Der Unterschied der Verdopplungszeit war im direkten Vergleich zu den Zelllinien HROP75, HROP75 T0 M4 und HROP88 signifikant (s. Abbildung 8).

Bei dem KV-basierten Assay zur Bestimmung der Verdopplungszeit kam es zu großen Abweichungen der Messwerte. Ursächlich dafür waren wahrscheinlich die auftretenden Randeffekte. Diese waren wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich die Platte nach dem Aussäen der Zellen vom Rand her aufwärmte. Die dicht wachsenden Zellen hemmten sich gegenseitig im Wachstum (Kontaktinhibition). Vor allem HROP68Tu2 und HROP88 waren von diesem unregelmäßig auftretenden Phänomen betroffen, welches hohe Standardabweichungen verursachte. Um zuverlässigere Ergebnisse zu erzielen, wurden bei diesen Zelllinien die Experimente mit Kollagen-beschichteten Wells wiederholt. So konnten geringere Abweichungen der Verdopplungszeiten erreicht werden.

Migration

Zu der grundlegenden Charakterisierung der Tumor-Zelllinien gehört auch die Zellmigration, welche einen integralen Bestandteil des Metastasierungsprozesses darstellt. Ein höheres Migrationspotenzial von Tumorzelllinien korreliert mit einem höheren metastatischen Potenzial (Sahai, 2007; Yamaguchi et al., 2005). Um Rückschlüsse auf das metastatische Potenzial der fünf Zelllinien zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit der Zellen zu migrieren mittels Messung der Migrationsgeschwindigkeit im 2D-Scratch-Assay objektiviert.

Die Tumorzellmigration im 2D-Versuch kann in zwei Arten unterschieden werden. Dabei wird die Migration von einzelnen Zellen in den *Scratch* hinein von der Migration im Verbund unterschieden (Friedl & Alexander, 2011). Die morphologisch rein epithelartig Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 migrierten als geschlossener Zellrasen im Verbund. Im Vergleich dazu kam es bei den pleomorphen Zelllinien, zu denen auch HROP68Tu2 gehörte, zu einer Migration von einzelnen Zellen in den *Scratch* hinein. Die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 wies die niedrigste Migrationsgeschwindigkeit der fünf Zelllinien auf. Der gemessene Unterschied war allerdings nur im Vergleich zu HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4 signifikant (s. Abbildung 11). Mit letzterer war ein Vergleich jedoch nicht sinnvoll, da die Zelllinie wie zuvor beschrieben das verwendete 0 %ige VM nicht tolerierte. Somit wurde bei HROP75 T0 M4 möglicherweise nicht allein die Migration gemessen, sondern es war davon auszugehen, dass Effekte der Zellproliferation das Messergebnis verfälschten. So ließ sich auch die unerwartet hohe Migrationsgeschwindigkeit erklären.

Die Ergebnisse des 2D-*Scratch-Assays* wiesen darauf hin, dass das Migrationspotenzial von HROP68Tu2 möglicherweise im Vergleich geringer war als das der anderen Zelllinien. Diese Beobachtung würde sich mit den klinischen Daten des längsten rückfalllosen Überlebens (zehn Monate) und dem im Vergleich langen Gesamtüberleben von 23 Monaten decken.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, in denen beispielsweise das Migrationsverhalten von HROP68Tu2 mit einer größeren Stichprobe von PDAC-Zelllinien verglichen werden könnte. Zur Ausbildung von Metastasen *in vivo* ist neben der Migration auch die Fähigkeit der Tumorzellen, Membranen von Blut- sowie Lymphgefäßen zu durchdringen elementar. Da der 2D-*Scratch-Assay* diese metastatischen Prozesse nicht erfasst, wären hier weiterführende Experimente anzuschließen, welche beispielsweise die Invasion anhand eines *Transwell-Assays* untersuchen.

4.3 Chemosensitivität

In dieser Arbeit wurden die in der S3-Leitlinie (Seufferlein et al., 2022) empfohlenen Therapieregime verwendet, welche auch bei den HROP-Patientinnen und Patienten verwendet wurden. So war es möglich, die Sensitivität der Zelllinien *in vitro* mit dem Ansprechen der Tumoren der entsprechenden Patientinnen und Patienten *in vivo* zu vergleichen.

Einzeltherapeutika

Die Sensibilität der Zelllinien gegenüber den einzelnen Therapeutika wurde mittels einem KV-basierten Assay bestimmt. Die IC_{50} der Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Gemcitabin und Paclitaxel lag bei allen Zelllinien unter der C_{max} . Folglich waren die fünf untersuchten Zelllinien als sensibel gegenüber diesen fünf Therapeutika einzustufen.

Zur Einordnung der in dieser Arbeit experimentell ermittelten IC_{50} -Werte wurden diese vorrangig mit den von Zhao et al. (2022) publizierten Ergebnissen verglichen, welche die Sensitivität von zehn Zelllinien gegenüber der Chemotherapeutika 5-FU, Irinotecan, Cisplatin, Gemcitabin und Paclitaxel untersuchten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Therapeutika verabreicht, und 72 h nach Aussäen der Zellen erfolgte die Messung der Zell-Viabilität.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob sich die IC_{50} -Werte der einzelnen Zelllinien untereinander unterschieden, wurden die Unterschiede der IC_{50} -Werte zwischen den Zelllinien auf statistische Signifikanz untersucht. Auf Grund des hohen Aufwands der Chemosensitivitätstestung durch das händische Erstellen der Verdünnungsreihen wurden pro Medikament und Zelllinie nur drei bis vier Messwerte erhoben. Darüber hinaus war die Methode fehleranfällig, denn schon kleine Pipettierungenauigkeiten konnten die Ergebnisse der IC_{50} -Werte stark beeinflussen. Um diese Faktoren in der statistischen Untersuchung zu berücksichtigen, werden hier die nicht-Bonferroni-korrigierten Ergebnisse des Dunn-T-Tests aufgeführt.

Die Sensibilität von HROP68Tu2 gegenüber 5-FU, der Hauptkomponente des FOLFIRINOX-Regimes, war vergleichbar mit der der anderen vier Zelllinien; ein statistisch signifikanter Unterschied bestand lediglich zwischen HROP68Tu2 und HROP88. Letztere zeigte die höchste Sensitivität gegenüber 5FU. Die IC_{50} -Werte der fünf Zelllinien lagen im Bereich von 2 bis 8 μM . In der Literatur wurden IC_{50} Werte zwischen 0,4 und 20,3 μM beschrieben (Zhao et al., 2022). Verglichen mit der aus der Literatur herangezogenen C_{max} (426 μM) war die ermittelte IC_{50} etwa um den Faktor 100 kleiner.

Für Irinotecan wurden bei HROP68Tu2 und HROP40 T1 M2 die niedrigsten IC_{50} -Werte nachgewiesen. Die Zelllinien HROP75 T0 M4 und HROP88 zeigten statistisch signifikant höhere IC_{50} -Werte als HROP68Tu2 und HROP40 T1 M2. Während die IC_{50} von HROP40 T1 M2 (0,38 μM) und HROP68Tu2 (0,32) etwa 10x geringer war als die C_{max} (5,78 μM), war die IC_{50} der im Vergleich am wenigsten sensiblen Zelllinie HROP88 (2,55 μM) nur halb so groß wie die C_{max} . Die ermittelten IC_{50} -Werte, die im Bereich von 0,3 bis 2,5 μM lagen, waren etwa eine Zehnerpotenz kleiner als die hier zum Vergleich herangezogenen IC_{50} -Werte, die zwischen 3,5 und 30,8 μM lagen (Zhao et al., 2022). Diese Abweichung war zu tolerieren und konnte verschiedene Gründe haben, wie eine hohe Sensibilität der Zelllinien gegenüber Irinotecan oder die abweichende Versuchsdurchführung.

Gegenüber Oxaliplatin zeigten die untersuchten Zelllinien keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Sensibilität. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen in einem Bereich von 1,5 bis 3 μM . Zwar lagen sie damit formal unter der C_{max} von 5 μM , sind allerdings nicht besonders weit entfernt. Tumore, welche eine *BRCA1/2*-Mutation aufweisen, besitzen häufig eine höhere Sensibilität gegenüber Platin-basierten Chemotherapeutika wie Oxaliplatin (Pishvaian et al., 2020). Solche Mutationen treten etwa bei 5 – 6 % der PDACs auf (Friedenson, 2005; Lynch et al., 2005). Bei HROP68 wurde lediglich in einer PDX-Probe (HROP68Tu2 fT0 M2) eine *BRCA1*-Mutation nachgewiesen (s. Anhang: Tabelle 27), jedoch nicht im Primarius oder dem Rezidiv. Folglich zeigte sich im Vergleich zu den anderen vier getesteten Zelllinien keine erhöhte Sensibilität der Zelllinie HROP68Tu2 gegenüber Oxaliplatin.

Die IC_{50} -Werte von Gemcitabin lagen im Bereich von 0,5 bis 2 $\times 10^{-3}$ μM . Die IC_{50} -Werte bekannter Zelllinien, wie MIA-CaPa-2 (0,32 $\times 10^{-3}$ μM) (Fujiwara-Tani et al., 2022) und CaPan-1 (30,1 $\times 10^{-3}$ μM) (Quint et al., 2012) lagen etwa im gleichen Bereich. Daher waren die hier bestimmten Werte als plausibel zu betrachten. Interessanterweise waren die IC_{50} der hier untersuchten Zelllinien mehr als 10.000 Mal niedriger als die C_{max} (89 μM). Hier kann von einer überaus starken Sensibilität aller fünf Zelllinien gegenüber Gemcitabine ausgegangen werden. Auch hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten der Zelllinien.

Die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 wies die im Vergleich höchste Resistenz gegenüber Paclitaxel auf. Die ermittelte IC_{50} war signifikant höher als die der Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88. Zhao et al. (2022) beschrieben vergleichbare Paclitaxel Sensitivitäten mit IC_{50} -Werten von < 0,1 bis 16,7 μM .

Resistenzen von Zelllinien gegenüber einem Therapeutikum wurden lediglich bei Erlotinib nachgewiesen. Die IC_{50} von HROP68Tu2 (6,5 μM), HROP75 (19 μM) und HROP75 T0 M4 (11 μM) waren größer als die C_{max} (3 μM). Die Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP88 reagierten sensibel auf Erlotinib. Die entsprechenden IC_{50} (0,19 und 0,34 μM) waren, verglichen mit der C_{max} , um das Zehnfache geringer. Ioannou et al. (2011) untersuchten die IC_{50} von Erlotinib bei sieben Zelllinien. Zwei der sieben Zelllinien hatten eine geringe IC_{50} (1 bis 6 μM), während hingegen die anderen fünf Zelllinien eine $IC_{50} > 20$ μM aufwiesen. Letztere waren folglich resistent gegenüber Erlotinib. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte lagen in einem ähnlichen Bereich und wurden daher als plausibel eingestuft.

Kombinationen

Die von Begg et al. (2020) ermittelten IC_{50} -Werte gegenüber FOLFIRINOX und GemPac waren höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte. Zu begründen ist dieser Unterschied wahrscheinlich in der abweichenden Durchführung der Chemosensitivitätstestung. Während Begg et al. (2020) die Zellen

24 h nach dem Aussäen behandelten und an Tag fünf die Messung der Viabilität durchführten, wurden in dieser Arbeit die Zellen zweimal den Therapeutika ausgesetzt und an Tag sieben die Messung der Viabilität durchgeführt. Auch wenn die zweifache Behandlung der Zellen mit bedeutend mehr Aufwand verbunden war, wurde sie verwendet, um das klinische Setting besser zu simulieren. Denn die Tumorzellen werden auch *in vivo*, im Rahmen eines Chemotherapie-Zyklus, mehrfach den Substanzen ausgesetzt. Folglich ist es nachvollziehbar, dass Begg et al. (2020) eine höhere Dosis verwenden mussten, um bei einmaliger Therapie einen IC₅₀-Effekt zu erzielen. Die für die HROP-Zelllinien bestimmten IC₅₀-Werte lagen bei FOLFIRINOX zwischen 1,5 und 6,5 µM und bei GemPac wie auch GemErlo im Bereich von 0,5 bis 1,5 nM. Sie sind, nach dem Vergleich der Werte mit denen von Begg et al. (2020) (FOLFIRINOX: $2,5 \times 10^{-3}$ bis 0,4 µM; GemPac 4×10^{-3} bis 0,31 µM), unter Berücksichtigung des abweichenden Studiendesigns, als plausibel anzusehen.

Gegenüber der drei getesteten Kombinationen FOLFIRINOX, GemPac und GemErlo zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede der IC₅₀ zwischen den Zelllinien. Folglich bewirken die jeweiligen Kombinationstherapien bei allen Zelllinien einen vergleichbar starken Effekt.

Für das Kombinationsregime FOLFIRINOX ergaben sich durchweg additive und synergistische Effekte. Die Zelllinie HROP88 war sowohl gegenüber FOLFIRINOX wie auch der Hauptkomponente 5-FU am sensibelsten. Bei dieser Zelllinie erzielte FOLFIRINOX einen Synergismus und damit die stärkste positive Interaktion (CI = 0,59), gefolgt von HROP68Tu2 und HROP75, bei denen ein moderater Synergismus nachgewiesen wurde. Additive Effekte erzielte FOLFIRINOX bei den beiden PDX-Zelllinien HROP40 T1 M2 und HROP75 T0 M4. Trotz der Unterschiede der IC₅₀ gegenüber den Einzelsubstanzen war FOLFIRINOX in der Lage, bei allen der fünf Zelllinien additive Effekte hervorzurufen.

Bei der Patientin HROP75 wurde das Therapieregime FOLFIRINOX im neoadjuvanten Setting klinisch angewendet. Auf Grund der anschließend erfolgten Resektion ist von einem Ansprechen des Tumors auf die Therapie auszugehen. Die Ergebnisse der Chemoresistenz-Testungen im Zellkulturversuch zeigten bei HROP75 im Vergleich zu anderen Zelllinien keine Anzeichen auf eine Resistenz.

Die Kombination von GemPac führte größtenteils zu antagonistischen Effekten. Folglich war der inhibitorische Effekt der Gemcitabin-Monotherapie stärker als der der Kombination mit Paclitaxel. Lediglich bei der Zelllinie HROP75 T0 M4, welche die geringste Sensitivität gegenüber Gemcitabin aufwies, konnte die Kombination einen moderaten Synergismus erzielen. Interessanterweise konnte in mehreren *in vitro*-Studien (Oliveras-Ferraros et al., 2008; Sui et al., 2006) nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen Gemcitabin und Paclitaxel abhängig war von dem zeitlichen Ablauf der Behandlung. Bei Therapieregimen, bei denen zuerst Paclitaxel und mit zeitlichem Versatz Gemcitabin angewendet wurde, konnten ausschließlich synergistische Effekte gemessen werden. Eine

gleichzeitige Applikation von Gemcitabine und Paclitaxel, wie sie auch in dieser Arbeit erfolgte, bedingte hingegen teilweise antagonistische Effekte (Oliveras-Ferraros et al., 2008; Sui et al., 2006).

In der Einzeltherapie erwies sich Erlotinib als hochwirksam bei HROP40 T1 M2 und HROP88. Erlotinib konnte jedoch die Wirksamkeit, in der Kombination mit Gemcitabin, nur bei HROP40 T1 M2 steigern (additiver Effekt), jedoch nicht bei HROP88. Die Ursache lag wahrscheinlich im molekularen Verhältnis von Gemcitabin zu Erlotinib (1 : 38,20). Dabei war die Erlotinib-Konzentration bei HROP88 wahrscheinlich zu gering, um einen additiven Effekt zu bewirken. Die Konzentration von GemErlo, welche bei HROP88 eine 50 %ige Wachstumsinhibition (IC_{50}) erzielte, lag bei $0,74 \times 10^{-3} \mu M$ Gemcitabin und $0,02 \mu M$ Erlotinib. Damit war die hier verwendete Erlotinib Dosis etwa um das Zehnfache geringer als die in der Einzeltestung bestimmte IC_{50} -Dosis von $0,34 \mu M$. Daher war die Wirkung von Erlotinib in der Kombination mit Gemcitabin bei HROP88 wahrscheinlich kaum vorhanden. Im Gegensatz dazu lagen bei HROP40 T1 M2 die IC_{50} -Dosis bei der Kombination ($0,03 \mu M$) und die IC_{50} , welche in der Einzelmessung bestimmt wurde ($0,19 \mu M$) nicht so weit auseinander. Wäre der Erlotinib-Anteil im molaren Verhältnis der GemErlo-Kombination größer gewesen, hätte sich eventuell auch bei HROP88 ein additiver Effekt eingestellt.

Interessanterweise konnten Moore et al. (2007) im klinischen Setting ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem EGFR-Expressionsstatus des Tumors und dem Ansprechen auf die Kombinationstherapie nachweisen. Auch in der in dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsanalyse zwischen der EGFR-Expression (% gefärbte Zellen und MFIR) und den IC_{50} -Werten von Erlotinib zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. Zu erklären ist dies, da entgegen der Annahme von Grunwald and Hidalgo (2003), dass es sich bei Erlotinib um einen selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor handelt, Conradt et al. (2011) beweisen konnten, dass es sich bei Erlotinib um einem Multikinaseinhibitor handelt. Erlotinib wies teilweise eine höhere Affinität zu anderen Kinasen als zu EGFR auf (Conradt et al., 2011). Die Wirkung auf mehrere Kinasen wird ein Grund sein, warum in dieser Arbeit (*in vitro*) und im klinischen Setting (Moore et al., 2007) keine statistische Korrelation zwischen dem EGFR-Expressionsstatus und dem Ansprechen auf Erlotinib festgestellt wurde.

Implikationen der *in vitro*-Chemosensitivitätstestung bei HROP68Tu2 für die Therapie des MPCs

Zwischen der MPC-Zelllinie HROP68Tu2 und den anderen Normaltyp-PDAC-Zelllinien wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Ansprechen auf die klassischen PDAC-Therapieregime festgestellt. Diese *in vitro*-Beobachtung impliziert, dass die Standard-Therapie des PDACs möglicherweise beim MPC ähnlich schwache Effekte erzielt und eine vergleichbar schlechte Prognose bedingt wie beim Normaltyp-PDAC.

Jedoch bietet das MPC auf Grund seiner histopathologischen und molekularbiologischen Eigenschaften die Möglichkeit neue Therapieverfahren einzusetzen. Diese könnten ein bedeutend besseres Überleben bei MPC-Betroffenen als bei Patientinnen und Patienten mit einem Normaltyp-PDAC erzielen. Dieses wird an späterer Stelle ausführlich diskutiert.

Limitationen der *in vitro*-Chemosensitivitätstestung

Die etablierten HROP-Zelllinien, die aus den Tumoren der Patientinnen und Patienten gewonnen wurden, erwiesen sich allesamt als empfindlich gegenüber den getesteten Kombinationstherapien. Angesichts dieser Ergebnisse könnte man annehmen, dass nach einer erfolgreichen Operation und Chemotherapie alle Patientinnen und Patienten tumorfrei sein sollten. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach der Operation betrug jedoch lediglich 16 Monate. Dies legt nahe, dass die Chemotherapie bei allen vier Patientinnen und Patienten versagte.

Das PDAC unterscheidet sich von anderen soliden Tumoren unter anderem durch die Tumorerogenität (Logsdon et al., 2015). Das Mutationsrepertoire der Tumoren der Patientinnen und Patienten variiert stark voneinander, ebenso zwischen den Metastasen und dem Primärtumor. Auch das Mutationsrepertoire einzelner Tumorregionen unterscheidet sich voneinander (Anaka et al., 2013; Kim et al., 2014; Logsdon et al., 2015). So lässt sich erklären, dass sich nach anfänglichem Erfolg der Therapie häufig dennoch ein Rezidiv entwickelt, da einige Zellen resistent gegenüber der verwendeten Therapie sind (Diaz et al., 2012). Daher ist die Vorhersagekraft der Zelllinien für die Chemosensitivität des PDACs nur bedingt gegeben, denn ein Großteil der Tumorzellklone wird nicht erfasst (Hwang et al., 2016; Masters, 2000). Allerdings ist auch in Betracht zu ziehen, dass bisher kein Tumormodell mittels Chemosensitivitätstestung in der Lage war, das klinische Outcome der Chemotherapie verlässlich vorherzusagen (Logsdon et al., 2015).

Da nur etwa 10 % des Tumors aus epithelialen Tumorzellen bestehen und der Rest aus Tumorstroma, welches eine spezifische Mikroumgebung bildet, muss eine effektive Therapie auch das Stroma adressieren. Auch wenn die Therapie des Tumorstromas ein großer Forschungsschwerpunkt ist, konnten die bisher gewonnenen Erkenntnisse noch nicht erfolgreich in die Patientenversorgung implementiert werden (Logsdon et al., 2015).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PDAC-Zelllinien Limitationen in der Simulation des Ansprechens auf Chemotherapie aufweisen. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit wiederholt bestätigt werden. Trotz dieser Limitationen bleibt die 2D-Zelllinie weiterhin ein wichtiges Standbein der präklinischen PDAC-Forschung. Denn sie eignet sich gut für Hochdurchsatzverfahren und Mechanismus-orientierte Forschung. Neben der Untersuchung klassischer Chemotherapeutika kann

an der Zelllinie HROP68Tu2 die Wirksamkeit neuer gen- und immunbasierter Therapien beim MPC erforscht werden. Die hier durchgeführte Charakterisierung kann die Grundlage dieser Forschungsbemühungen bilden.

4.4 Mutationsanalyse

Bei dem PDAC handelt es sich auf Grund der üblicherweise geringen Tumormutationslast um einen nicht immunogenen Tumor. Die Metaanalyse von Luchini et al. (2021), welche 34 Studien mit 8323 Patientinnen und Patienten mit einem PDAC einschloss, kam zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz einer dMMR bzw. MSI beim PDAC bei lediglich 1–2 % lag. Eine medulläre bzw. eine kolloide oder muzinöse Histologie korrelierte stark mit dem Vorliegen einer dMMR bzw. MSI ($p < 0.1$). So kamen Luchini et al. (2021) zu der Schlussfolgerung, dass PDAC-Tumoren mit einer solchen Histologie routinemäßig auf das Vorliegen einer dMMR bzw. MSI untersucht werden sollten. Denn diese Tumoren bieten die Möglichkeit, neuartige Immun- und Gentherapien beim PDAC einzusetzen, welche sonst auf Grund der nicht-immunogenen Eigenschaften des PDACs und der geringen Tumormutationslast nicht erfolgreich eingesetzt werden können (Balsano et al., 2023).

Die genetische Analyse der Tumorproben von HROP75 und HROP88 mittels WES zeigte ein für PDAC typisches Mutationsrepertoire. Dieses zeichnete sich durch das Vorliegen einiger weniger pathogener Mutationen aus. Diese betrafen bei HROP75 und HROP88 die Gene *KRAS* sowie *TP53*. HROP88 besaß dazu noch eine typische Mutation im *SMAD4*-Gen. Dieses deckte sich mit dem partiellen Verlust der SMAD4-Proteinexpression, welche immunhistochemisch im Rahmen der pathologischen Untersuchung des Resektats nachgewiesen wurde.

Bei HROP68 fielen im Rahmen der pathologischen Untersuchung eine untypische Zellmorphologie begleitet von einem geringen Stromaanteil sowie vielen Nekroseherden und ein T-Zell Infiltrat auf. Letzteres ist hinweisend für das Vorliegen eines immunogenen Tumors. Der Tumor wurde anschließend als MPC klassifiziert. In der Immunhistochemie fanden sich keine Hinweise auf eine MSI, da die Expression von MSH1 und MLH2 erhalten blieb. Zur weitergehenden Prüfung des Mikrosatelliten-Status wurde im Rahmen der pathologischen Untersuchung des Resektats eine Multiplex-PCR des Bethesda-Panels durchgeführt, deren Ergebnis ebenfalls eine MSS war.

Bei HROP68 bieten die Tumorproben des Primarius sowie des Rezidivs ein für ein PDAC untypisches Mutationsrepertoire. Dieses war bestimmt durch eine pathologische Mutation im *FOXP1*-Gen und sieben weitere Mutationen, welche als wahrscheinlich pathologisch klassifiziert wurden. Interessanterweise lag auch ein *TP53*-Wildtyp vor. Dieser korreliert stark mit der medullären Histologie (Luchini et al., 2021). Die vorliegende *KRAS*-Mutation war hingegen typisch für ein PDAC. Im Vergleich

war die Mutationslast pathogener und wahrscheinlich pathogener Mutationen bei den beiden anderen Fällen bedeutend geringer (HROP75: 2, HROP88: 3).

In der, wegen der besonderen Bedeutung von HROP68 als MPC, durchgeführten SNP-Analyse imponierte die hohe Tumormutationslast mit 274 SNP-Mutationen des Primarius und 376 des Rezidivs. Auffällig war, dass es sich bei einem großen Anteil dieser Mutationen um Frameshiftmutationen handelte, bei HROP68Tu1 waren es 18,6 % (51/274) und bei dem Rezidiv HROP68Tu2 20,7 % (78/376). Bestimmte pathogene Mutationen, welche typischerweise mit einer hohen Tumormutationslast einhergehen, wie beispielsweise *POLE*, *POLD1* und *MUTYH* (Chalmers et al., 2017) wurden nicht nachgewiesen. Hingegen wurden Mutationen der Gene *PALB2*, *ATR* und *CHECK2* nachgewiesen, die als wahrscheinlich-pathogen eingestuft wurden. Anhand des MSI-Scores des Primarius (16,26 %) und Rezidivs (13,77 %) wurden die Tumoren als MSI-Low eingestuft. Der MSI-Score der 24 weiteren HROP-Fälle, die in das PiCoP-Projekt aufgenommen wurden, lag im Durchschnitt bei 3,08 % ($\pm 1,43$). Hier unterscheidet sich HROP68 deutlich von den Normaltyp-PDAC-Fällen.

In der Zusammenschau sind, wegen der für ein PDAC ungewöhnlichen hohen Tumormutationslast sowie des MSI-Scores, signifikante Alterationen im MMR-System anzunehmen. Daher wurde die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 schlussendlich als MSI-Low bewertet. Die dMMR, welche die hohe Tumormutationslast zur Folge hatte, war wahrscheinlich die Ursache für die starken Abweichungen zwischen Normal- und Tumorgewebe im STR-Profil der HROP68-Proben. Die Tatsache, dass sich die Mutationen von Primarius und Rezidiv stark unterschieden und eine höhere Anzahl an Mutationen beim Rezidiv vorlag, unterstreicht diese These.

Interessanterweise konnte die Mikrosatelliteninstabilität weder mittels Multiplex-PCR des Bethesda-Panels noch immunhistochemisch durch das Fehlen von MSH1 und MLH2 im Rahmen der pathologischen Untersuchung des Resektats objektiviert werden.

In dieser Arbeit zeigten sich Hinweise, dass das Mutationsrepertoire zwischen dem Tumor und dem PDX-Modell stark voneinander abwich. Die Zahl der Mutationen der korrespondierenden PDX-Modelle von HROP68 war deutlich höher als die Zahl der Mutationen des Primarius sowie des Rezidivs. Ob also das PDX-Modell strukturelle Schwächen in der Beibehaltung des Mutationsrepertoires des Originaltumors hat, lässt sich auf Grund der geringen Datenlage von lediglich zwei gepaarten Tumor- und PDX-Proben nicht abschließend klären. Allerdings liegt der Verdacht nahe, dass das PDX bei Tumoren mit einer MSI die Molekularpathologie des Original-Tumors nicht verlässlich präservieren kann.

4.5 Immunogenität

Das PDAC entzieht sich vornehmlich durch drei Mechanismen der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem, auch Immunevasion genannt (Wachsmann et al., 2012). Dazu gehören die Vermeidung der Erkennung durch das Immunsystem, bei welcher unter anderem MHC-1 und MHC-2 eine Rolle spielen (Wachsmann et al., 2012). Daneben sind an der Vermeidung der Apoptose-Induktion FasR und FasL beteiligt und die Unterdrückung der Immunantwort wird unter anderem durch CD40, CD54 und PD-L1 moderiert (Wachsmann et al., 2012).

Durch das Herunterregulieren der MHC-1-Expression auf der Zelloberfläche entzieht sich das PDAC der Erkennung durch das Immunsystem. Hiraoka et al. (2020) untersuchten immunhistologisch die Expression von MHC-1 bei den resezierten PDACs von 243 Patientinnen und Patienten. Eine verminderte MHC-1-Expression wurde definiert, wenn weniger als 50 % der Tumorzellen MHC-1 positiv waren, was bei 33,1 % der Fälle festgestellt wurde. Nur 21 % der Tumoren zeigten eine MHC-1 Expression von mehr als 90 %. Im Gegensatz dazu waren bei den fünf untersuchten Zelllinien mehr als 99 % der Zellen MHC-1-positiv. Dies lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass in histologischen Präparaten alle Zellklone untersucht wurden, bei der Zelllinie jedoch nur ein einziger.

Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass PDACs mittels MHC-2 Neoantigene exprimieren (Baleeiro et al., 2022). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass CD4+ T-Zellen, welchen zuvor diese Neoantigene präsentiert wurden, die Tumorzellen erkannten und eine Apoptose indizieren konnten (Baleeiro et al., 2022). Gaida et al. (2012) konnten bei 86 von 112 (76,8 %) untersuchten Tumoren eine MHC-2-Expression nachweisen. Diese korrelierte mit der Infiltration von CD4+ T-Lymphozyten. Von den untersuchten Zelllinien in der Studie von Baleeiro et al. (2022) besaßen drei von 14 eine MHC-2 Expression. Die Expression von MHC-2 ist also bei den Tumoren selbst höher als bei den Zelllinien. Hier wird deutlich, wie wichtig die Entwicklung neuer Zelllinien ist, um das molekulare Profil des PDACs auch in den Zelllinien abbilden zu können, um der Heterogenität des PDACs zu begegnen. Von den untersuchten fünf HROP-Zelllinien exprimierten HROP68Tu2 und HROP88 MHC-2. Bei HROP68 steht das MHC-2-Membranprotein im Verdacht, an der Immunität des Tumors eine Rolle zu spielen. Zum Beweis dieser Interaktion sind genauere Untersuchungen nötig. Die Zelllinie HROP88 könnte auf Grund der MHC-2 Expression ebenfalls von CD4+ T-Zellen erkannt werden. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass der Tumor immunogen war, denn er wies weder eine T-Zell-Infiltration noch ein auffälliges Mutationsrepertoire auf.

Über das Fas-System und den FasR kann durch extrinsische Signale eine Apoptose der Tumorzellen induziert werden. Zwar exprimieren die meisten PDAC-Zelllinien FasR, sind aber häufig resistent gegenüber FasL vermittelter Apoptose (von Bernstorff et al., 1999; Wachsmann et al., 2012). Einige Zelllinien hingegen exprimieren auch FasL, welches eine Apoptose von aktivierten T-Zellen bewirken

kann (Ohta et al., 2004; von Bernstorff et al., 1999; Wachsmann et al., 2012). Die HROP-Zelllinien exprimieren Fas-R und bilden damit das typische Expressionsmuster beim PDAC ab. Ob die Zelllinien allerdings sensibel oder resistent gegenüber FasL vermittelter Apoptose sind, ließ sich anhand der durchflusszytometrischen Daten nicht bestimmen. Hier wären weitere Untersuchungen indiziert. Hingegen war auf Grund der fehlenden FasL-Expression der HROP-Zelllinien nicht davon auszugehen, dass sie eine Apoptose bei T-Zellen induzieren können. Das Vorliegen dieses Mechanismus der Immunevasion war damit als unwahrscheinlich zu bewerten.

Das Membranprotein PD-L1 spielt eine bedeutende Rolle in der Immunevasion von Tumoren. Wenn Tumorzellen PD-L1 exprimieren, bindet es an den PD-1-Rezeptor von T-Zellen, welches zu einer Hemmung der T-Zelle führt. Eine Blockade von PD-L1 führt dementsprechend zu einer verbesserten Bekämpfung des Tumors durch körpereigene Lymphozyten. Le et al. (2017) konnten in einer *proof-of-concept*-Studie erfolgsversprechende Ergebnisse der PD-L1 Blockade mittels Pembrolizumab bei zwölf verschiedenen soliden Tumorentitäten, darunter auch Tumoren des Pankreas, zeigen. Le et al. (2017) beobachteten, dass dMMR-Tumoren sensitiv gegenüber einer Immuncheckpoint-Blockade mittels Pembrolizumab waren, unabhängig vom Ursprung des Tumors. Sie erklärten dies mit dem Vorliegen zahlreicher Neoantigene auf den Tumorzellen von dMMR-Tumoren.

In einer Metaanalyse zur PD-L1-Expression beim PDAC wurde bei 32,2 % (247/688) der Fälle eine immunhistochemische PD-L1-Expression von > 10 % der Tumorzellen nachgewiesen (Gao et al., 2018). Die membranöse PD-L1-Expression beim PDAC ist daher als gering einzustufen. Ursache dafür ist wahrscheinlich die nur in seltenen Fällen vorhandene T-Zell Infiltration, denn die membranöse PD-L1-Expression wird durch onkogene Signalwege oder inflammatorische Zytokine als Folge der T-Zell vermittelten Immunantwort auf die Tumorzellen gebildet (Taubke et al., 2012; Zheng, 2017). Da beim PDAC eine solche T-Zell Infiltration fehlt, fehlt auch das Signal zur Expression von PD-L1 in den Tumorzellen (Clark et al., 2007; Lutz et al., 2014).

Eine solche T-Zell-Invasion liegt nur dann vor, wenn der Tumor ein gewisses Maß an Immunogenität aufweist. Diese Immunogenität ist also Voraussetzung für die PD-L1-Expression, welche dann wiederum Grundlage für den erfolgreichen Einsatz einer PD-L1-Blockade ist. Da das PDAC ein *per se* nicht immunogener Tumor ist, kann eine solche Therapie nur einem kleinen Patientenkollektiv zugutekommen. Eine solche Immunogenität ist auf Grund des hohen TMBs häufig bei MSI-PDACs der Fall. Bei diesem Patientenkollektiv bietet sich daher eine anti-PD-L1-Therapie an. Die KEYNOTE-18 Studie, welche das Ansprechen von MSI PDACs auf Pembrolizumab untersuchte, zeigte jedoch lediglich ein mit 18,2 % geringes Ansprechen (Marabelle et al., 2020). Leider wurden keine Ergebnisse veröffentlicht, bei wie vielen der Patientinnen und Patienten, die in die KEYNOTE-18 eingeschlossen waren, auch eine T-Zellinfiltration vorlag. Für den Einsatz einer Anti-PD-L1-Therapie sollte daher nicht

nur die MSI sondern auch das Vorliegen einer T-Zell-Infiltration als Kriterium herangezogen werden. Um ein mögliches Therapieansprechen der Anti-PD-L1 vorherzusagen, wäre der Nachweis von Neoantigenen zwar die erfolgsversprechende Methode, sie hat allerdings noch keinen Einzug in die Standard-Therapie solider Tumoren gehalten. Die Möglichkeiten der Neoantigen-basierten Immuntherapie werden im Ausblick (4.7) diskutiert.

Bei HROP68 lag eine homogene und starke PD-L1-Expression vor, daneben zeigten sich mikroskopisch infiltrierende T-Zellen im Tumor. Es ist daher anzunehmen, dass die Zellen den PD-L1 Mechanismus nutzen, um sich dem Immunangriff der infiltrierenden T-Zellen zu entziehen. Da es sich darüber hinaus bei dem hier vorliegenden MPC eine MSI vorlag, war davon auszugehen, dass er Neoantigene exprimierte. Der Einsatz eines Immuncheckpoint Inhibitors wie Pembrolizumab hätte möglicherweise das klinische Outcome des Patienten verbessern können.

Auch die anderen Zelllinien exprimierten PD-L1, allerdings ist davon auszugehen, dass eine Pembrolizumab-Therapie auf Grund der nicht vorhandenen Immunogenität keine Wirkung erzielt hätte. Es stellt sich allerdings die Frage, warum die Zelllinien dann überhaupt PD-L1 exprimierten. Die Datenlage zu der PD-L1-Expression von PDAC-Zelllinien ist geringer. In der Studie von Lu et al. (2017) wurden bei neun von zehn PDAC-Zelllinien PD-L1 durchflusszytometrisch nachgewiesen. Es zeigen sich damit Hinweise, dass die PD-L1-Expression bei PDAC-Zelllinien möglicherweise häufiger der Fall ist als bei den Tumoren selbst. Eine Erklärung dieses Phänomens ist in der Literatur nicht beschrieben. Möglicherweise liegt die Ursache in der Heterogenität des PDACs begründet. Vorstellbar wäre, dass sich bei der Etablierung der Zelllinien häufig die am aggressivsten wachsenden Zellklone durchsetzen, welche möglicherweise PD-L1-positiv sind. Ein weiterer Erklärungsversuch wäre, dass die Kulturbedingungen, welche für die Zellen mit hohem Stress verbunden sind, bestimmte Signalwege aktivieren und es so sekundär zu einer erhöhten PD-L1-Expression kommt. Um dieser Beobachtung genauer nachzugehen, müsste im Rahmen weiterer Forschungsbemühungen die PD-L1-Expression histologisch am Resektat untersucht und mit der aus dem gleichen Tumor etablierten Zelllinien verglichen werden.

Durchflusszytometrisch wurden bei HROP68Tu2 das Oberflächen-Antigen CD40, welches an der T-Zell-Inaktivierung und Immunevasion beteiligt ist, nachgewiesen (Vonderheide et al., 2013). Interessanterweise war die CD40-Expression von HROP68Tu2 im Vergleich zu den anderen Zelllinien bedeutend geringer. Dies könnte eine Ursache für die im Vergleich schwächere Immunevasion von HROP68 und die augenscheinliche Erkennung des Tumors durch die T-Zellen des Patienten sein.

CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) können die Bindung von zytotoxischen T-Zellen an die Tumorzelloberfläche ermöglichen und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem (Frangieh et al., 2021; Yan et al., 2022). Während HROP68Tu2 eine im

Vergleich zu den anderen Zelllinien geringere CD54-Expression zeigte, war die CD58-Expression vergleichbar hoch wie bei den anderen Zelllinien. Die Einflüsse von CD54 und CD58 sind jedoch komplex. Neben der Unterstützung der körpereigenen Immunantwort können sie auch eine immunhemmende Wirkung induzieren und die Funktion der Tumor-infiltrierenden T-Zellen hemmen (Frangieh et al., 2021; Yan et al., 2022). Aus den durchflusszytometrischen Ergebnissen ließ sich also nicht ableiten, inwiefern CD54 und CD58 bei der Erkennung durch die T-Zellen oder möglicherweise auch der Immunevasion eine Rolle spielten.

In Zusammenschau der Histopathologie und der Durchflusszytometrie war davon auszugehen, dass es sich bei HROP68 um einen immunogenen Tumor handelte. Die anderen HROP-Fälle zeigten vereinzelte Merkmale, die eine Immunogenität unterstützten. So beispielsweise die MHC-2-Expression von HROP88, allerdings standen diese Merkmale allein und wurden nicht durch andere Tumoreigenschaften, die eine Immunogenität suggerierten, gestützt. Um jedoch auszuschließen, dass die Tumoren immunogen waren, müssen weitere interaktionsorientierte Experimente durchgeführt werden.

4.6 HROP68Tu2: Das erste Modell eines MPCs

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich bei HROP68Tu2 um die erste Zelllinie eines MPCs handelt. Es zeigen sich keine Anzeichen auf einem EBV-assoziierten Tumor. HROP68 unterschied sich in der mikro- und makroskopischen Morphologie, wie auch genetisch von einem typischen PDAC und den hier untersuchten Normaltyp-PDAC-Fällen. Es wurden ein T-Zell-Infiltrat und die Expression von MHC-2, PD-L1 und eine verringerte CD40-Expression nachgewiesen. Der Tumor besaß also einen immunogenen Phänotyp. Das Mutationsrepertoire von HROP68 unterschied sich massiv von dem, wie es in einem PDAC zu erwarten gewesen wäre. Darunter fallen unter anderem die hohe Tumormutationslast, eine hohe Zahl an *Frameshift*-Mutationen, ein *TP53*-Wildtyp, Mutationen in den Genen *FOXG1*, *CHECK2*, *ATR* und *PALB2* und die nachgewiesene MSI-L.

Die aus diesem Fall etablierte Zelllinie HROP68Tu2 unterschied sich zu den anderen Zelllinien unter anderem durch die langsame Wachstums- und Migrationsgeschwindigkeit. Darüber hinaus exprimierte sie MHC-2, welches die Annahme der Immunogenität von HROP68 unterstützt. In der Chemoresistenz-Testung zeigte sich gegenüber den etablierten Therapieregimen (Gem-Monotherapie, GemPac, GemErlo und FOLFIRINOX) kein Unterschied zwischen HROP68Tu2 und den Normaltyp-PDAC-Zelllinien.

4.7 Ausblick

Was kann heute schon getan werden, um die Behandlungsergebnisse bei dem Vorliegen eines MPCs zu verbessern? Einerseits ist eine frühzeitige Diagnose der Tumorerkrankung von entscheidender Bedeutung, um sicherzustellen, dass der Tumor im Stadium der Entdeckung noch resektabel ist. Andererseits müssen *Screening*-Mechanismen implementiert werden, um seltene Tumoren wie das MPC zu identifizieren. Besondere Tumoreigenschaften wie eine MSI in Kombination mit einer T-Zell-Infiltration müssen dabei erfasst werden. In diesen seltenen Fällen sollte nicht gezögert werden, auch *Off-label*-Immuntherapien wie eine PD-1-Blockade mittels Pembrolizumab einzusetzen. Diese ist bereits in den USA bei Chemotherapierefraktären, fortgeschrittenen MSI-H/dMMR-PDACs zugelassen (Chakrabarti et al., 2022). Die Ansprechraten auf eine Pembrolizumab-Therapie bei MSI/dMMR PDACs lag in klinischen Studien zwischen 18,2 % (Marabelle et al., 2020) und 77 % (Chakrabarti et al., 2022).

Die Zelllinie HROP68Tu2 kann als erstes MPC-Modell als Grundlage präklinischer Forschung genutzt werden, um die Molekularpathologie des PDACs weiter zu untersuchen und möglicherweise neue Therapieansätze zu entwickeln. Die umfassende Datengrundlage des WES und der SNP-Analyse, die in dieser Arbeit präsentiert wird, kann als Grundlage für die Evaluierung der Effektivität gezielter Therapien dienen, die auf spezifische Mutationen abzielen.

Auf Grund des hohen TMBs von HROP68 mit einer Vielzahl von *Frameshift*-Mutationen sowie der T-Zellinfiltration und dem Expressionsmuster der Oberflächenantigene kann HROP68Tu2 ein ausgezeichnetes Modell für *in vitro*-Untersuchungen von immuntherapeutischen Ansätzen darstellen. Denn wie zuvor diskutiert, ist davon auszugehen, dass die Zellen Neoantigene exprimieren. Durch das konsequente Sammeln von Patientenproben im Rahmen der Aktivität der BioBank Rostock bietet sich die Möglichkeit, die Interaktion von Patienten-Lymphozyten mit autologen Tumorzellen zu untersuchen. Dabei könnten Co-Kulturen angelegt werden, Funktionsassays durchgeführt werden oder die Gen- und Proteinexpression nach Interaktion der Tumorzellen mit den T-Zellen untersucht werden. Zusätzlich können Proteom-Analysen zur Identifizierung von Neoantigenen durchgeführt werden sowie Therapieverfahren der personalisierten Immuntherapie und der Krebs-Vakzinierung untersucht werden.

Im klinischen Kontext müssen dafür beim Vorliegen eines MPCs neben der Standard-MSI-Diagnostik weitere molekularbiologische Untersuchungen folgen, denn zumindest HROP68Tu2 hat das gleiche Ansprechen gegenüber etablierten Therapieregimen wie andere Zelllinien. Jedoch bieten sich durch die hohe Tumormutationslast einige Möglichkeiten, gezielte Therapien einzusetzen oder Immuncheckpoint-Inhibitoren bei immunogenen Tumoren anzuwenden. So kann möglicherweise auch bei der weiterhin schlechten Prognose des PDACs mittels personalisierter Tumorthherapie die Prognose von MPC-Patientinnen und Patienten in Zukunft verbessert werden

Thesen

1. Bei HROP68Tu2 handelt es sich um die erste Zelllinie eines medullären Pankreaskarzinoms.
2. Die etablierten Zelllinien entsprechen den angelegten Qualitätsstandards bzgl. der Patientenzugehörigkeit, dem Ausschluss von Kontaminationen und dem epithelialen Ursprung.
3. HROP68Tu2 unterscheidet sich von den anderen Zelllinien unter anderem durch die langsame Wachstums- und Migrationsgeschwindigkeit.
4. HROP68 hatte das längste Rückfalllose- und Gesamtüberleben, welches möglicherweise auf das niedrige Migrationspotential der Zellen zurückzuführen ist wie es auch im *2D-Scratch-Assay* nachgewiesen wurde.
5. Alle fünf untersuchten Zelllinien sind sensibel gegenüber der Einzel-Therapeutika 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin, Gemcitabin und Paclitaxel.
6. Die Zelllinien HROP68Tu2 sowie HROP75 und HROP75 T0 M4 sind resistent gegenüber Erlotinib.
7. HROP68Tu2 und die Normaltyp-PDAC-Zelllinien zeigten keinen signifikanten Unterschied im Ansprechen auf die etablierten Therapieregime: Gem-Monotherapie, GemPac, GemErlo und FOLFIRINOX.
8. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der EGFR-Expression und dem Ansprechen der Zelllinien auf Erlotinib.
9. Beim PDAC ist die Zelllinie als Tumormodell stark limitiert das Ansprechen auf Chemotherapie *in vivo* zu simulieren bzw. vorherzusagen.
10. Das Mutationsrepertoire von HROP68 wich stark von den typischen PDAC-Mutationen ab und zeigte eine hohe Tumormutationslast, zahlreiche Frameshift-Mutationen, einen *TP53*-Wildtyp sowie Mutationen in den Genen *FOXG1*, *CHECK2*, *ATR* und *PALB2*.
11. Auf Grund der ungewöhnlichen hohen Tumormutationslast, dem MSI-Score, den Abweichungen im STR-Profil sowie der starken Unterscheidung von Mutationen im Primarius und Rezidiv ist die MPC-Zelllinie HROP68Tu2 als MSI-Low zu bewerten.
12. HROP68Tu2 ist als MSI-Low zu bewerten, auch wenn in der pathologischen Untersuchung weder mittels Multiplex-PCR des Bethesda-Panels noch immunhistochemisch durch das Fehlen von MSH1 und MLH2 die MSI des Resektats objektiviert werden konnte.
13. Das CD8+ T-Zell-Infiltrat, die Expression von MHC-2 und PD-L1 sowie die verringerte CD40-Expression stützen die Annahme, dass HROP68 einen immunogenen Phänotyp aufweist.

Anhang

Tabelle 24: Datenbasis zu Benennung der Marker-Allele, ausgehend von der Fragmentlänge.

VWA		TH01		TPOX		CSF1PO		D5S818		D7S820		D16S539		D13S317	
Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel	Bp	Allel
123	10	171	3	216	4	287	5	115	6	211	5	260	4	157	5
127	11	175	4	220	5	290	5.3	119	7	213	5.2	264	5	161	6
131	12	179	5	224	6	291	6	123	8	215	6	268	6	164	6.3
134	12.3	182	5.3	228	7	294	6.3	126	8.3	217	6.2	272	7	165	7
135	13	183	6	231	7.3	295	7	127	9	218	6.3	276	8	166	7.1
138	13.2	184	6.1	232	8	298	7.3	130	9.3	219	7	279	8.3	168	7.3
139	14	186	6.3	235	8.3	299	8	131	10	220	7.1	280	9	169	8
140	14.1	187	7	236	9	302	8.3	132	10.1	222	7.3	283	9.3	170	8.1
142	14.3	188	7.1	239	9.3	303	9	134	10.3	223	8	284	10	173	9
143	15	190	7.3	240	10	304	9.1	135	11	224	8.1	287	10.3	177	10
145	15.2	191	8	241	10.1	306	9.3	136	11.1	225	8.2	288	11	178	10.1
147	16	194	8.3	243	10.3	307	10	137	11.2	226	8.3	291	11.3	180	10.3
148	16.1	195	9	244	11	308	10.1	139	12	227	9	292	12	181	11
151	17	196	9.1	247	11.3	309	10.2	140	12.1	228	9.1	293	12.1	182	11.1
152	17.1	197	9.2	248	12	310	10.3	141	12.2	229	9.2	294	12.2	184	11.3
155	18	198	9.3	251	12.3	311	11	142	12.3	230	9.3	296	13	185	12
156	18.1	199	10	252	13	312	11.1	143	13	231	10	297	13.1	188	12.3
157	18.2	202	10.3	253	13.1	314	11.3	144	13.1	232	10.1	299	13.3	189	13
158	18.3	203	11	256	14	315	12	147	14	234	10.3	300	14	192	13.1
159	19	207	12	260	15	316	12.1	148	14.1	235	11	303	14.3	193	14
160	19.1	212	13.1	264	16	319	13	149	14.2	236	11.1	304	15	196	14.3
163	20	214	13.3			323	14	151	15	237	11.2	308	16	197	15
164	20.1	215	14			324	14.1	152	15.1	238	11.3			201	16
167	21					327	15	153	15.2	239	12			205	17
168	21.1					331	16	155	16	240	12.1				
171	22							157	16.2	241	12.2				
175	23							159	17	242	12.3				
176	23.1							163	18	243	13				
179	24									244	13.1				
180	24.1									246	13.3				
183	25									247	14				
184	25.1									248	14.1				
										251	15				
										255	16				

Anmerkung. Die Tabelle ermöglicht die Benennung der Marker-Allele auf Basis der Fragmentlängen, wie sie mittels Kapillarelektrophorese bestimmt wurden.

Tabelle 25: Marker (STR und Geschlechtsmarker) aus dem Promega PowerPlex® 16 System

Locus	Genlocus	GenBank® Locus und Locus Definition	Wiederholungssequenz 5' → 3'
vWA	12p13.31	HUMVWFA31, humanes von Willebrand Faktor Gen	TCTA
TH01	11p15.5	HUMTH01, humanes Tyrosin Hydroxylase Gen	AATG
TPOX	2p24–2pter	HUMTPOX, humanes Thyreoperoxidase Gen	AATG
CSF1PO	5q33.3–34	HUMCSF1PO, humanes c-fms Proto-Onkogen für CSF-1 Rezeptor Gen	AGAT
D5S818	5q23.3–32	NA	AGAT
D7S820	7q11.21–22	NA	GATA
D16S539	16q24.1	NA	GATA
D13S317	13q22–q31	NA	TATC
Amelogenin	Xp22.1–22.3 and Y	HUMAMEL, humanes Y chromosomales Gen für Amelogenin-like Protein	n.a.

Anmerkung. Nicht applikabel (n.a.). Amelogenin ist kein STR-Marker. Übernommen aus dem Technical Manual PowerPlex® 16 System (Promega, 2022).

Tabelle 26: Verdopplungszeit und Migrationsgeschwindigkeit: Ergebnisse der Post-hoc-Analyse

Experiment	Zelllinie A	Zelllinie B	Teststatistik	Standard- fehler	Standard- teststatistik	Sig.	Anp. Sig.
Verdopplungszeit	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	–3	3,651	–0,822	0,411	1
	HROP68Tu2	HROP75	11	3,651	3,012	0,003	0,026
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M5	7,333	3,651	2,008	0,045	0,446
	HROP68Tu2	HROP88	8,667	3,651	2,373	0,018	0,176
	HROP40 T1 M2	HROP75	8	3,651	2,191	0,028	0,285
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	4,333	3,651	1,187	0,235	1
	HROP40 T1 M2	HROP88	5,667	3,651	1,552	0,121	1
	HROP75	HROP75 T0 M4	–3,667	3,651	–1,004	0,315	1
	HROP75	HROP88	–2,333	3,651	–0,639	0,523	1
	HROP75 T0 M4	HROP88	1,333	3,651	0,365	0,715	1
Migrations- geschwindigkeit	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	8,8	3,581	2,457	0,014	0,14
	HROP68Tu2	HROP75	–4,8	3,899	–1,231	0,218	1
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M4	–13,8	3,899	–3,54	0	0,004
	HROP68Tu2	HROP88	–7,467	3,899	–1,915	0,055	0,555
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	–5	4,077	–1,226	0,22	1
	HROP40 T1 M2	HROP75	4	4,077	0,981	0,327	1
	HROP40 T1 M2	HROP88	1,333	4,077	0,327	0,744	1
	HROP75	HROP88	–2,667	4,359	–0,612	0,541	1
	HROP75	HROP75 T0 M4	–9	4,359	–2,065	0,039	0,389
	HROP75 T0 M4	HROP88	6,333	4,359	1,453	0,146	1

Anmerkung. Ergebnisse der Post-hoc-Analyse mittels Dunn-T-Test (Sig.) und anschließender Bonferroni-Korrektur (Anp. Sig.).

Tabelle 27: WES: pathogene, wahrscheinlich pathogene und Mutationen unsicherer Signifikanz

Gen	Ref	Alt	Peptid	dbSNP ID	Kl. Sig.	HROP68 Tu1	HROP68Tu1 T1 M1	HROP68 Tu2	HROP68Tu2 fT0 M2	HROP75	HROP75 fT0 M3	HROP88
<i>AIFM1</i>	C	T	Val78Ile	rs2031166484	us		23					
<i>ALG13</i>	T	C	Leu130Pro	rs1220905347	us				38			
<i>ARL13B</i>	A	G	Ser421Gly	rs112062713	us				25			
<i>ATM</i>	A	G	Asn1801Ser	rs1555106445	us				50			
<i>ATM</i>												
<i>C11orf65</i>	T	A	Phe279Ile	rs730881323	us				18			
<i>AXIN2</i>	T	C	Ile144Val	rs1555583470	us						21	
<i>BAG3</i>	G	A	Val12Met	rs367917821	us		20		21			
<i>BIN1</i>	G	A	Ala465Val	rs751051376	us		16					
<i>BRCA1</i>	T	C	Asn277Asp	rs2054040121	us				15			
<i>BRIP1</i>	T	G	Asn666His	rs765816425	us						34	
<i>CACNA1A</i>	T	C	Thr254Ala	rs2059189603	us			16				
<i>CACNA1S</i>	C	T	Arg119His	rs749588662	us	44	57	35	45			
<i>CHD7</i>	A	G	Ile304Val	rs1274555136	us				16			
<i>CIAO1</i>	C	T	Gly20Ser	rs1343615968	us		24					
<i>CILP</i>	A	G	Ile395Thr	rs2073711	rf							
<i>COL4A5</i>	C	T	Leu764Phe	rs2066735216	us				20			
<i>CPS1</i>	T	C	Ile385Thr	rs201955205	us				38			
<i>DICER1</i>	T	C	Ile1283Val	rs548255758	us						15	
<i>DICER1</i>	T	C	Ile521Val	rs966168689	us						17	
<i>DMD</i>	T	C	Thr3675Ala	rs768016083	us				18			
<i>DNAI1</i>	C	G	Asp306Glu	rs772207177	us				17			
<i>DOCK7</i>	C	T	Arg221His	rs761394671	us				24			
<i>DSP</i>	A	G	Thr2634Ala	rs373200747	us				16			
<i>DYRK1A</i>	T	C	Ser57Pro	rs1049763	us		16		24			
<i>EPG5</i>	T	C	2282Val	rs781691565	us				19			
<i>FBN1</i>	T	C	Lys2848Arg	rs765839151	us				17			
<i>FBXL4</i>	G	A	Thr181Met	rs767879225	us				47			
<i>FKRP</i>	C	T	Ala212Val	rs758125491	us		20					
<i>FOXP1</i>	CG	C	Glu154fs	rs398124204	p	54	73	49	45			
<i>GABRG2</i>	T	C	Ile6Thr	rs759392289	us		16					
<i>GBE1</i>	T	C	Tyr594Cys	rs370246900	us				50			
<i>GLUL</i>	G	A	Thr116Ile	rs144782603	us				18			
<i>GRIA3</i>	T	C	Met1Thr	rs752728469	us		25		20			
<i>GRIK2</i>	C	T	Arg198Ter	rs749995448	p		17					
<i>GRIN2A</i>	T	C	Asn1420Ser	rs775911833	us		20		31			
<i>KAT6B</i>	T	C	Ile413Thr	rs1842099343	wp		25		31			

ANHANG

Gen	Ref	Alt	Peptid	dbSNP ID	Kl. Sig.	HROP68 Tu1	HROP68Tu1 T1 M1	HROP68 Tu2	HROP68Tu2 fT0 M2	HROP75	HROP75 fT0 M3	HROP88
KCNA2	T	C	Ser198Gly	rs1649489553	us				16			
KIF1B	G	A	Val1604Ile	rs769092155	us		21					
KIF5A	G	A	Val411Ile	rs1881531764	us		19					
KIT	G	A	Glu306Lys	rs753258292	us						22	
KRAS	C	A	Gly12Val	rs121913529	p					70	66	30
KRAS	C	T	Gly12Asp	rs121913529	p	18	30	35	24			
LAMA2	C	T	Thr1012Ile	rs752658943	us		15					
LAMA4	C	T	Ala1187Thr	rs781943786	us				20			
LAMP2	C	T	Ala405Thr	rs1556078130	us		18		29			
MAX	T	C	Ser129Gly	rs2063062255	us		15					
MBD5	T	C	Ile172Thr	rs1481914876	us		15					
MLH1	A	G	Asn645Ser	rs587778963	us		15		26			
MSH2	C	T	Thr441Ile	rs1553361210	us				17			
MSH6	A	G	Lys1325Arg	rs876658189	us						29	
MTMR2	T	C	Ile281Val	rs887196115	us		26		50			
MYH11	C	G	Glu986Asp	rs774274573	us		15					
MYO5B	C	T	Gly270Ser	rs1047868917	us		15					
NF1	C	T	Thr774Ile	rs917302286	us		19					
NIN	C	T	Arg1999His	rs141405524	us		16					
NOTCH3	G	A	Pro36Leu	rs1311684711	us						24	
PGK1	T	C	Val83Ala	rs138851144	us		23		28			
PIGA	T	C	Ile80Val	rs1922163411	us		16					
PIGN	T	C	Ile85Val	rs202066215	us				15			
POMT2	C	T	Val234Ile	rs576822260	us		16					
PRDM16	G	A	Arg759Gln	rs762997591	us				16			
PRKAG2	G	A	Ala230Val	rs1554507908	us		15					
RAD50	G	A	Ala546Thr	rs760787160	us						40	
RAD51B	G	C	Ala268Pro	rs758696568	us						15	
RAD51B	G	C	Ala268Pro	rs758696568	us		15					
RBFOX1	G	A	Ala345Thr	rs150941982	us		19		15			
RDH5	C	G	Ser300Arg	rs769652740	us		16					
RELN	T	C	Thr954Ala	rs1471834146	us		16					
ROBO1	C	T	Ala972Thr	rs371174175	us				23			
RUNX1	A	C	Ser424Ala	rs2056451534	wp		24		20			
SCN3A	A	G	Met693Thr	rs1244798421	us	52	42	43	83			
SCN8A	G	A	Arg1891His	rs1555231135	us	93	100	87	99			
SETD2	C	T	Glu457Lys	rs2043179824	us		15					
SMAD4	G	A	Gly386Asp	rs121912580	wp							45

ANHANG

Gen	Ref	Alt	Peptid	dbSNP ID	Kl. Sig.	HROP68 Tu1	HROP68Tu1 T1 M1	HROP68 Tu2	HROP68Tu2 fT0 M2	HROP75	HROP75 fT0 M3	HROP88
<i>SOS1</i>	C	T	Glu95Lys	rs1558493384	us	51	44	39	45			
<i>STK11</i>	T	C	Cys158Arg	rs1431247846	us		71		100			
<i>SYNJ1</i>	T	C	Ile705Val	rs761614356	us		19		32			
<i>SZT2</i>	G	A	Arg3076Gln	rs201132575	us				18			
<i>TGFB2</i>	A	G	Thr260Ala	rs1659957362	us		19					
<i>TGFB2</i>	A	C	Asn274Thr	rs559315266	us		15					
<i>TMEM</i>	C	T	Gly20Ser	rs1343615968	us						16	
<i>TP53</i>	G	A	Arg282Trp	rs28934574	wp					100	99	
<i>TP53</i>	C	T	Arg175His	rs28934578	p							29
<i>TP53</i>	C	A	Cys277Phe	rs763098116	us	95	98	87	100			
<i>TTN TTN-AS1</i>	C	G	Glu35299Asp	rs886055219	us				29			
<i>WRN</i>	C	T	Ser115Phe	rs1362437279	us				18			

Anmerkung. Klinische Signifikanz (Kl. Sig.), Referenz (Ref), Alteration (Alt), codierendes Peptid (Peptid), unsichere Signifikanz (us), Risikofaktor (rf), wahrscheinlich pathogen (wp), pathogen (p). Es sind mittels WES nachgewiesene Mutationen aufgelistet (us, rf, wp und p). Bei allen aufgelisteten Mutationen handelt es sich um Missense Mutationen. Die Bewertung erfolgte durch einen automatischen Link zu ClinVar. Den jeweiligen Proben ist der Anteil der mutierten Allele zugeordnet. Mutationen von nicht codierenden Transkripten, Introns, synonyme Mutationen und Mutationen welche weniger als 15% der Allele betreffen sind hier nicht aufgeführt. Gesamtzahl der Mutationen je Probe: HROP68 Tu1: 7, HROP68Tu1 T1 M2: 44, HROP68 Tu2: 8, HROP68Tu2 fT0 M2: 46, HROP75: 2, HROP75 fT0 M3: 12 und HROP88: 3.

Tabelle 28: Durchmesser des Kratzers im Zellrasen (M und SD)

Zelllinien		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
HROP68Tu2	Mittelwert	599,70	495,30	442,15	410,39	366,82
	SD	25,89	32,92	79,67	87,58	81,64
HROP40 T1 M2	Mittelwert	621,76	341,10	213,10	122,88	49,66
	SD	68,31	105,92	139,32	107,12	69,94
HROP75	Mittelwert	691,61	585,81	514,77	441,52	335,52
	SD	46,22	39,36	57,34	92,92	46,00
HROP75 T0 M4	Mittelwert	781,63	500,74	314,45	112,07	10,21
	SD	128,76	119,91	61,91	95,38	17,68
HROP88	Mittelwert	644,70	503,68	452,23	303,72	190,52
	SD	150,15	137,74	181,89	195,29	140,81

Anmerkung. Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Durchmessers des Kratzers im Zellrasen über die Messdauer von vier Tagen angegeben.

Tabelle 29: Einzeltestung IC_{50} -Werte mit SD und C_{max} -Werte im Vergleich

Zelllinien	Einzeltestung					Kombinationen			
	5-FU	Irinotecan	Oxaliplatin	Gemcitabin	Paclitaxel	Erlotinib	FOLFIRINOX (rel. zu 5FU)	GemPac (rel. zu Gem)	GemErl (rel. zu Gem)
	M IC ₅₀ [µM] (SD)								
HROP68Tu2	6,83 (±2,52)	0,31 (±0,06)	1,55 (±736,7)	0,57 ×10 ⁻³ (±0,16 ×10 ⁻³)	7,04 ×10 ⁻³ (±1,62 ×10 ⁻³)	6,52 (±1,71)	3,69 (±1,53)	0,82 ×10 ⁻³ (±0,36 ×10 ⁻³)	0,75 ×10 ⁻³ (±0,33 ×10 ⁻³)
	4,80 (±1,12)	0,37 (±0,13)	1,82 (±0,52)	0,88 ×10 ⁻³ (±0,28 ×10 ⁻³)	2,34 ×10 ⁻³ (±0,19 ×10 ⁻³)	0,19 (±0,03)	4,01 (±0,72)	1,07 ×10 ⁻³ (±0,30 ×10 ⁻³)	0,80 ×10 ⁻³ (±0,11 ×10 ⁻³)
HROP75	7,29 (±1,54)	0,66 (±0,12)	2,84 (±0,44)	0,65 ×10 ⁻³ (±0,06 ×10 ⁻³)	2,97 ×10 ⁻³ (±1,18 ×10 ⁻³)	19,18 (±2,93)	4,78 (±1,39)	0,91 ×10 ⁻³ (±0,11 ×10 ⁻³)	1,20 ×10 ⁻³ (±0,31 ×10 ⁻³)
	6,61 (±0,44)	1,58 (±0,37)	1,93 (±0,47)	1,68 ×10 ⁻³ (±0,11 ×10 ⁻³)	3,36 ×10 ⁻³ (±0,70 ×10 ⁻³)	10,59 (±2,45)	6,01 (±1,14)	1,12 ×10 ⁻³ (±0,29 ×10 ⁻³)	1,18 ×10 ⁻³ (±0,17 ×10 ⁻³)
HROP88	2,99 (±0,06)	2,55 (±0,08)	1,85 (±0,86)	0,67 ×10 ⁻³ (±0,33 ×10 ⁻³)	0,10 ×10 ⁻³ (±0,04 ×10 ⁻³)	0,34 (±0,07)	1,73 (±0,41)	0,65 ×10 ⁻³ (±0,10 ×10 ⁻³)	1,18 ×10 ⁻³ (±0,17 ×10 ⁻³)

C_{max} [μM] nach Liston and Davis (2017)

426,00	5,78	4,96	89,30	4,27	3,15	426,00	89,30	89,30
--------	------	------	-------	------	------	--------	-------	-------

Anmerkung. Die IC_{50} -Werte der Einzeltestungen sind in μM angegeben. Um die Daten im klinischen Kontext interpretieren zu können sind die C_{max} -Werte wie von Liston and Davis (2017) veröffentlicht angegeben.

Tabelle 30: Einzeltestung der Chemosensitivität: Ergebnisse der Post-hoc-Analyse

Chemo	Zelllinie A	Zelllinie B	Teststatistik	Standard- fehler	Standard- teststatistik	Sig.	Anp. Sig.
5-FU	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	-5,25	3,571	-1,47	0,141	1
	HROP68Tu2	HROP75	-0,917	3,857	-0,238	0,812	1
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M4	-0,25	3,857	-0,065	0,948	1
	HROP68Tu2	HROP88	9,75	3,857	2,528	0,011	0,115
	HROP40 T1 M2	HROP75	-6,167	3,857	-1,599	0,11	1
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	-5,5	3,857	-1,426	0,154	1
	HROP40 T1 M2	HROP88	4,5	3,857	1,167	0,243	1
	HROP75	HROP75 T0 M4	0,667	4,123	0,162	0,872	1
	HROP75	HROP88	10,667	4,123	2,587	0,01	0,097
	HROP75 T0 M4	HROP88	10	4,123	2,425	0,015	0,153
Irino	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	0,583	3,636	0,16	0,873	1
	HROP68Tu2	HROP75	-5,333	3,887	-1,372	0,17	1
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M4	-8,333	3,887	-2,144	0,032	0,321
	HROP68Tu2	HROP88	-11,333	3,887	-2,915	0,004	0,036
	HROP40 T1 M2	HROP75	-4,75	3,636	-1,306	0,191	1
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	-7,75	3,636	-2,131	0,033	0,331
	HROP40 T1 M2	HROP88	-10,75	3,636	-2,956	0,003	0,031
	HROP75	HROP75 T0 M4	-3	3,887	-0,772	0,44	1
	HROP75	HROP88	-6	3,887	-1,543	0,123	1
	HROP75 T0 M4	HROP88	-3	3,887	-0,772	0,44	1
Paclitaxel	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	-8	3,651	-2,191	0,028	0,285
	HROP68Tu2	HROP75	6	3,651	1,643	0,1	1
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M4	4	3,651	1,095	0,273	1
	HROP68Tu2	HROP88	12	3,651	3,286	0,001	0,01
	HROP40 T1 M2	HROP75	-2	3,651	-0,548	0,584	1
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	-4	3,651	-1,095	0,273	1
	HROP40 T1 M2	HROP88	4	3,651	1,095	0,273	1
	HROP75	HROP75 T0 M4	-2	3,651	-0,548	0,584	1
	HROP75	HROP88	6	3,651	1,643	0,1	1
	HROP88	HROP75 T0 M4	8	3,651	2,191	0,028	0,285
Erlotinib	HROP68Tu2	HROP40 T1 M2	-5,5	3,819	-1,44	0,15	1
	HROP68Tu2	HROP75	-5,5	3,819	-1,44	0,15	1
	HROP68Tu2	HROP75 T0 M4	-2,5	3,819	-0,655	0,513	1
	HROP68Tu2	HROP88	2,5	3,819	0,655	0,513	1
	HROP40 T1 M2	HROP75	-11	3,416	-3,22	0,001	0,013
	HROP40 T1 M2	HROP75 T0 M4	-8	3,416	-2,342	0,019	0,192
	HROP40 T1 M2	HROP88	-3	3,416	-0,878	0,38	1
	HROP75	HROP75 T0 M4	3	3,416	0,878	0,38	1
	HROP75	HROP88	8	3,416	2,342	0,019	0,192
	HROP88	HROP75 T0 M4	5	3,416	1,464	0,143	1

Anmerkung. Ergebnisse der post-hoc-Analyse mittels Dunn-T-Test (Sig.) und anschließender Bonferroni-Korrektur (Anp. Sig.).

Tabelle 31: Färbeansätze Durchflusszytometrie

Ansatz	Primärantikörper			Sekundär AK	
	CD	Name	Label	Name	Label
1	-	-	-		
2		Anti-Human	FITC		
3		Anti-Human	PE		
4		Anti-Human	APC		
5		Anti-Human (Hase)	FITC		
6		Anti-Human (Ziege)	FITC		
7	CD66adeceb	Carcinoembryonic Antigen (CEA)	FITC		
8	CD13	Aminopeptidase-N	PE		
9	CD227	MUC-1	APC		
10	CD54	ICAM1	FITC		
	CD15		PE		
	MHC-1	Humanes Leukozyten Antigen 1	APC		
11	CD86	B7-2	FITC		
	CD80	B7-1	PE		
	CD29	Integrin β -1	APC		
12	CD66adeceb	Carcinoembryonic Antigen (CEA)	FITC		
	CD71	Transferrin Rezeptor (TFR)	APC		
13	CD326	EpCAM	PE		
	CD227	MUC-1	APC		
14	CD58	LFA III	PE		
	CD152	CTLA4	APC		
15	CD95	FasR	FITC		
	CD178	FasL	PE		
16	CD90		FITC		
	MHC-2	Humanes Leukozyten Antigen 2	PE		
17	CD26	DPP4	PE		
	CD40	Tumor Necrosis Factor Rezeptor Super Family 5 (TNFRSF5)	APC		
18		Mesothelin (MSLN)	-	anti-Maus	FITC
19	CD279	Programed cell death protein1 (PD-1) AK: Pembrolizumab	-	anti-Human	FITC
20	CD274	Programed cell death ligand1 (PD-L1) AK: Atezolizumab	-	anti-Human	FITC
21		Epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) AK: Cetuximab	-	anti-Human	FITC
22	CD340	human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) AK: Trastuzumab	-	anti-Human	FITC
23		Krebs-IgG / CA125	-	anti-Maus	FITC

Anmerkung. Ausführliche Informationen zu den AK finden sich in Material und Methoden (Tabelle 8) Ansatz 1: ungefärbt, Ansätze 2–6: Kontrollen, Ansätze 10–17 Primärfärbungen, Ansätze 18–23: Sekundärfärbungen.

Tabelle 32: Mittelwerte und Standardabweichungen (positiv gefärbte Zellen und MFIR)

Proteine	HROP68Tu2						HROP40 T1 M2						HROP75						HROP75 TO M4						HROP88					
	% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR			% MFIR		
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
CD326	98,0	2,2	38,8	3,0	99,5	0,3	48,3	17,6	91,8	6,6	9,6	2,7	80,1	13,2	10,3	4,8	99,7	0,1	45,8	4,1	99,7	0,1	45,8	4,1	99,7	0,1	45,8	4,1	99,7	0,1
CD66adech	34,1	1,5	1,9	0,2	99,8	0,0	29,3	3,5	62,5	30,8	2,5	1,4	96,7	1,6	30,4	2,3	91,4	1,3	26,1	4,2	91,4	1,3	26,1	4,2	91,4	1,3	26,1	4,2	91,4	1,3
CD15	1,1	0,5	0,6	0,3	1,9	2,1	0,0	0,2	0,1	0,1	-0,5	0,2	0,5	0,3	0,2	0,4	15,9	14,3	0,5	0,4	15,9	14,3	0,5	0,4	15,9	14,3	0,5	0,4	15,9	14,3
CD26	5,4	0,6	0,4	0,1	1,7	1,2	0,1	0,1	42,5	26,4	2,7	1,4	98,1	1,2	75,7	43,4	51,6	12,2	13,9	5,4	51,6	12,2	13,9	5,4	51,6	12,2	13,9	5,4	51,6	12,2
CD29	99,7	0,1	217,9	18,6	99,9	0,1	213,5	38,7	99,8	0,1	389,7	78,7	98,3	2,8	281,4	105,7	99,9	0,0	408,2	30,9	99,9	0,0	408,2	30,9	99,9	0,0	408,2	30,9	99,9	0,0
CD71	89,7	3,6	7,7	0,6	85,8	1,7	4,2	1,0	99,7	0,1	70,6	28,8	97,8	0,9	34,4	8,9	97,9	1,1	38,2	17,0	97,9	1,1	38,2	17,0	97,9	1,1	38,2	17,0	97,9	1,1
EGFR	97,1	0,7	10,5	0,8	99,7	0,5	81,8	18,8	99,9	0,1	18,7	5,0	99,8	0,2	23,8	2,6	99,7	0,1	27,2	2,5	99,7	0,1	27,2	2,5	99,7	0,1	27,2	2,5	99,7	0,1
HER2	98,6	0,2	9,1	0,9	95,3	6,0	7,8	2,0	99,3	1,1	8,8	3,4	87,5	21,4	16,0	10,7	99,7	0,1	17,4	3,2	99,7	0,1	17,4	3,2	99,7	0,1	17,4	3,2	99,7	0,1
Mesothelin	3,8	0,9	1,6	0,2	4,5	3,0	1,1	0,2	21,4	19,5	1,6	0,6	24,8	19,6	2,0	1,0	55,5	8,6	2,3	0,6	55,5	8,6	2,3	0,6	55,5	8,6	2,3	0,6	55,5	8,6
Krebs-IgG	3,8	0,5	2,0	0,4	4,3	3,2	2,8	0,9	12,7	12,7	1,2	0,2	8,2	4,0	1,7	0,2	27,6	7,1	2,5	0,8	27,6	7,1	2,5	0,8	27,6	7,1	2,5	0,8	27,6	7,1
CD227	58,3	1,6	7,8	1,1	41,1	18,6	30,4	21,5	60,5	18,0	12,0	8,2	70,4	6,1	109,6	47,2	99,0	0,7	1070,6	199,1	99,0	0,7	1070,6	199,1	99,0	0,7	1070,6	199,1	99,0	0,7
CD13	50,3	3,8	8,6	0,6	1,5	1,1	0,2	0,2	99,6	0,3	135,1	47,3	78,0	17,7	39,1	26,6	31,4	32,7	68,5	8,7	31,4	32,7	68,5	8,7	31,4	32,7	68,5	8,7	31,4	32,7
CD54	30,9	2,9	2,0	0,1	99,7	0,1	24,8	1,5	99,7	0,1	14,3	3,5	63,7	11,6	2,4	0,4	54,8	16,4	7,2	4,8	54,8	16,4	7,2	4,8	54,8	16,4	7,2	4,8	54,8	16,4
CD58	99,5	0,1	35,8	0,8	99,9	0,1	69,8	8,9	99,8	0,1	54,4	12,7	99,6	0,4	54,6	10,4	99,5	0,0	20,8	4,1	99,5	0,0	20,8	4,1	99,5	0,0	20,8	4,1	99,5	0,0
CD80	0,8	0,3	0,2	0,2	1,1	0,8	0,0	0,1	0,5	0,4	0,0	0,1	0,8	0,2	0,4	0,3	3,0	0,5	0,0	0,1	3,0	0,5	0,0	0,1	3,0	0,5	0,0	0,1	3,0	0,5
CD86	1,0	0,1	0,0	0,1	2,1	1,3	0,1	0,0	3,4	3,9	0,1	0,1	1,4	0,7	0,1	0,0	4,4	0,8	0,1	0,1	4,4	0,8	0,1	0,1	4,4	0,8	0,1	0,1	4,4	0,8
FasR	54,5	9,6	1,6	0,3	92,0	4,4	2,3	0,4	89,9	15,9	2,7	0,7	89,7	8,4	1,9	0,3	59,0	5,8	1,3	0,1	59,0	5,8	1,3	0,1	59,0	5,8	1,3	0,1	59,0	5,8
FasL	1,9	0,6	0,9	0,5	1,3	0,8	0,2	0,1	0,8	0,1	0,4	0,3	2,0	1,5	0,7	0,7	21,3	13,4	0,9	0,1	21,3	13,4	0,9	0,1	21,3	13,4	0,9	0,1	21,3	13,4
MHC-1	99,5	0,1	163,0	38,3	99,8	0,1	179,8	38,4	99,8	0,0	167,5	76,7	99,2	1,2	158,6	80,0	99,8	0,0	367,0	56,6	99,8	0,0	367,0	56,6	99,8	0,0	367,0	56,6	99,8	0,0
MHC-2	29,2	9,5	1,7	0,3	2,1	1,0	0,1	0,2	0,5	0,3	0,0	0,1	0,7	0,3	0,0	0,0	22,9	4,7	1,4	0,3	22,9	4,7	1,4	0,3	22,9	4,7	1,4	0,3	22,9	4,7
CD90	80,8	2,3	5,0	0,6	2,0	1,0	0,1	0,0	3,8	3,7	0,3	0,1	1,5	0,8	0,1	0,1	3,8	0,7	0,0	0,1	3,8	0,7	0,0	0,1	3,8	0,7	0,0	0,1	3,8	0,7
CD40	41,5	2,9	4,7	0,4	99,7	0,1	30,3	5,0	99,7	0,3	103,6	32,1	99,7	0,1	32,5	6,5	97,9	0,2	71,4	11,8	97,9	0,2	71,4	11,8	97,9	0,2	71,4	11,8	97,9	0,2
CTLA4	3,1	2,9	0,4	0,4	3,4	3,4	0,5	0,5	5,9	1,7	0,5	0,2	2,5	2,3	0,5	0,3	6,2	1,2	1,3	0,1	6,2	1,2	1,3	0,1	6,2	1,2	1,3	0,1	6,2	1,2
PD-1	3,6	1,5	0,5	0,3	22,3	21,6	1,0	0,4	16,7	16,6	0,8	0,2	6,7	2,8	0,7	0,3	14,7	2,2	0,9	0,3	14,7	2,2	0,9	0,3	14,7	2,2	0,9	0,3	14,7	2,2
PD-L1	95,3	2,5	25,4	1,2	98,3	2,6	13,1	4,9	99,8	0,2	33,8	9,0	40,1	7,5	2,3	0,9	88,9	1,6	7,0	1,6	88,9	1,6	7,0	1,6	88,9	1,6	7,0	1,6	88,9	1,6

Anmerkung: Positiv gefärbte Zellen (%), Mean Fluorescence Intensity (MFIR), Mittelwert (M), absolute Standardabweichung (SD).

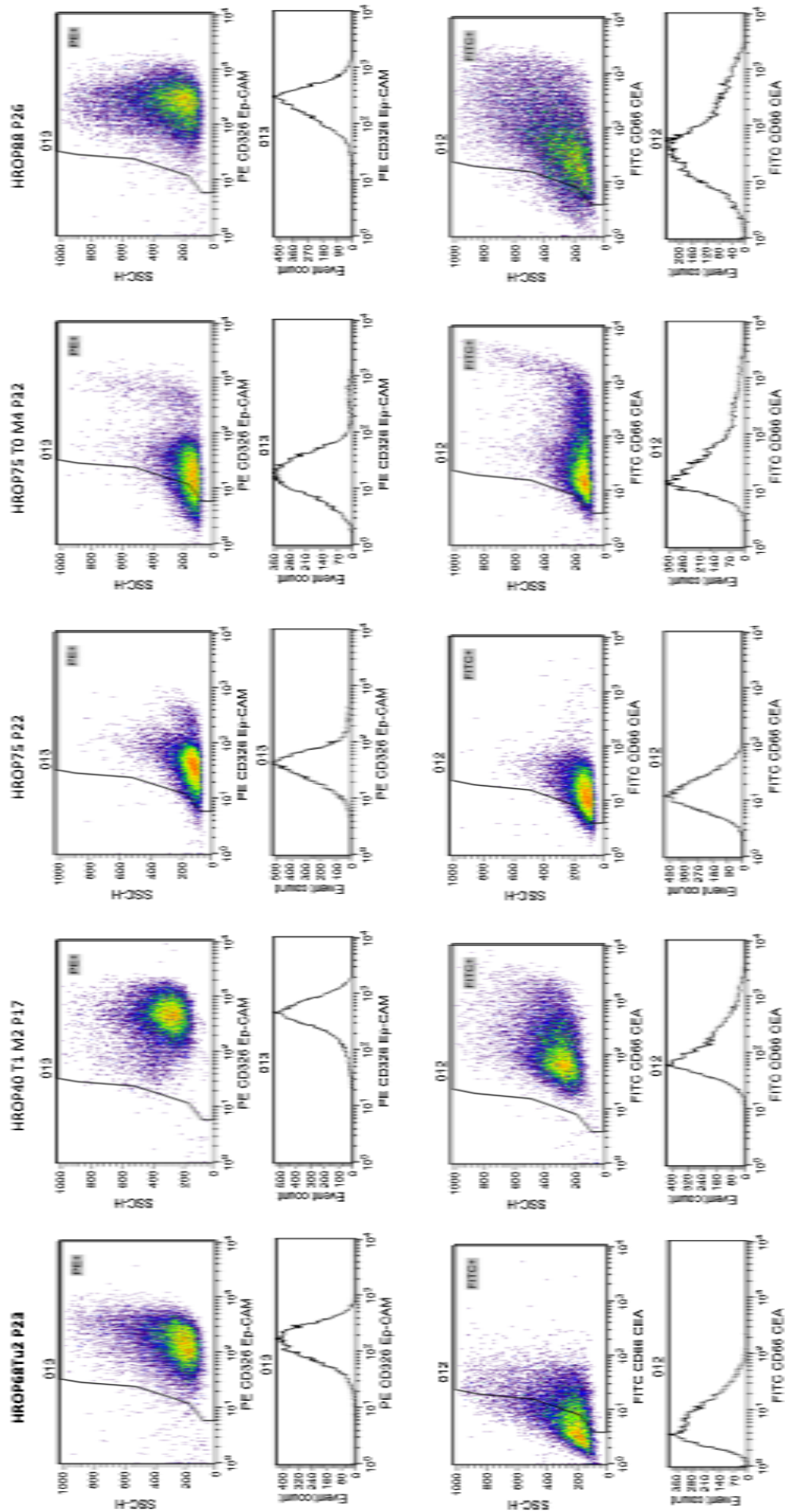


Abbildung 15: Epithel- und Tumormarker-Expression (CD326 und CD66adeb)

Anmerkung. Die Expression der Tumormarker CD326 und CD66adeb (Färbeansätze 13 und 12) wurden als *Density-Plots* mit den dazugehörigen Histogrammen dargestellt. Der Übersicht wegen ist die Expression aus lediglich einer Passage dargestellt. Die Mittelwerte der prozentualen Expression und MFIR sind im Text angegeben und auch in Abbildung 14 abzulesen. Die Abbildung wurden mit dem Programm FCSalyser 0.9.21 – alpha erstellt.

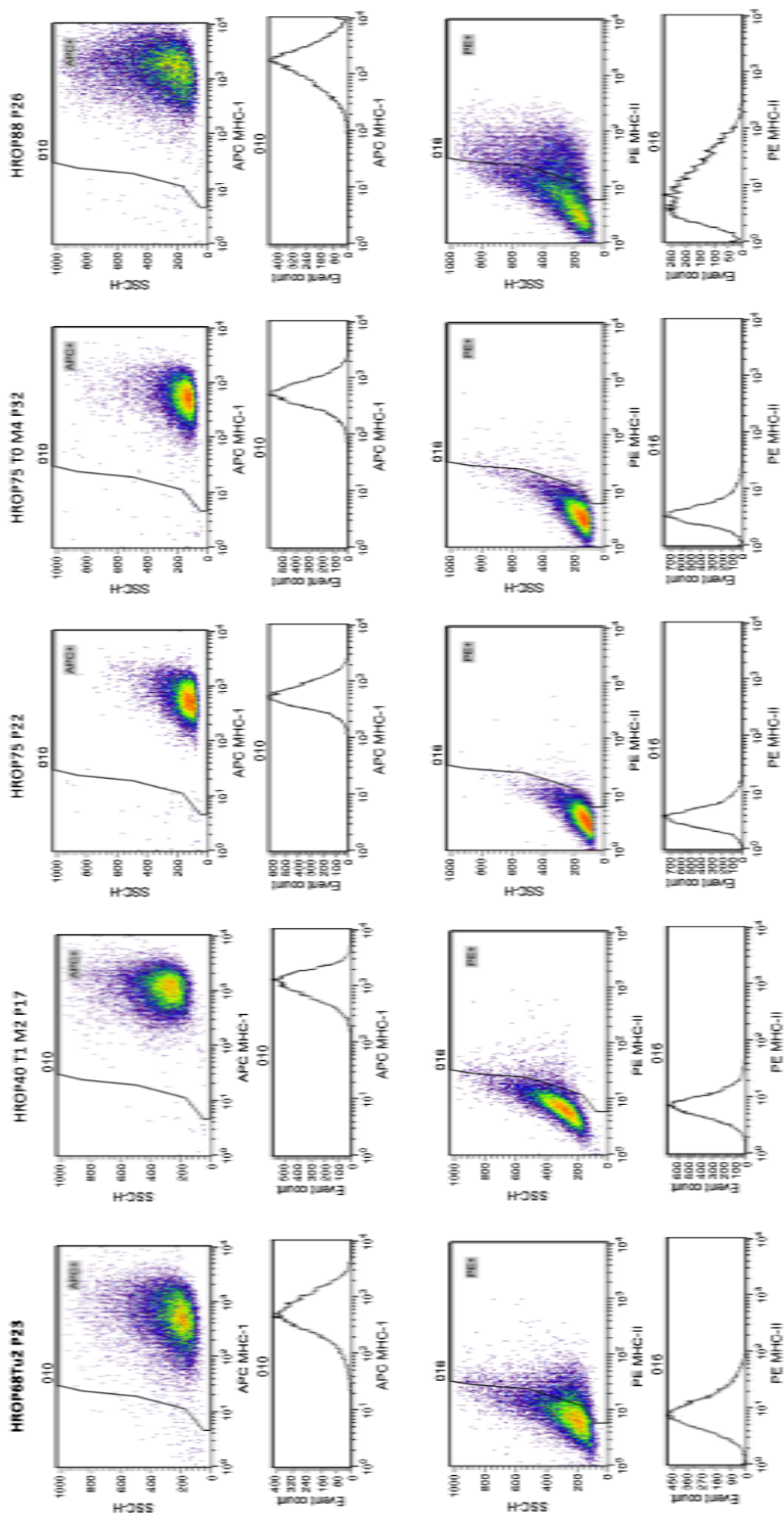


Abbildung 16: MHC-Expression (MHC-1 und MHC-2)

Anmerkung. Die Expression der MHC-Expression (Färbeansätze 10 und 16) wurden als *Density-Plots* mit den dazugehörigen Histogrammen dargestellt. Der Übersicht wegen ist die Expression aus lediglich einer Passage dargestellt; die Mittelwerte der prozentualen Expression und MFIR sind im Text angegeben und auch in Abbildung 14 abzulesen. Die Abbildung wurden mit dem Programm FCSalyser 0.9.21 – alpha erstellt.

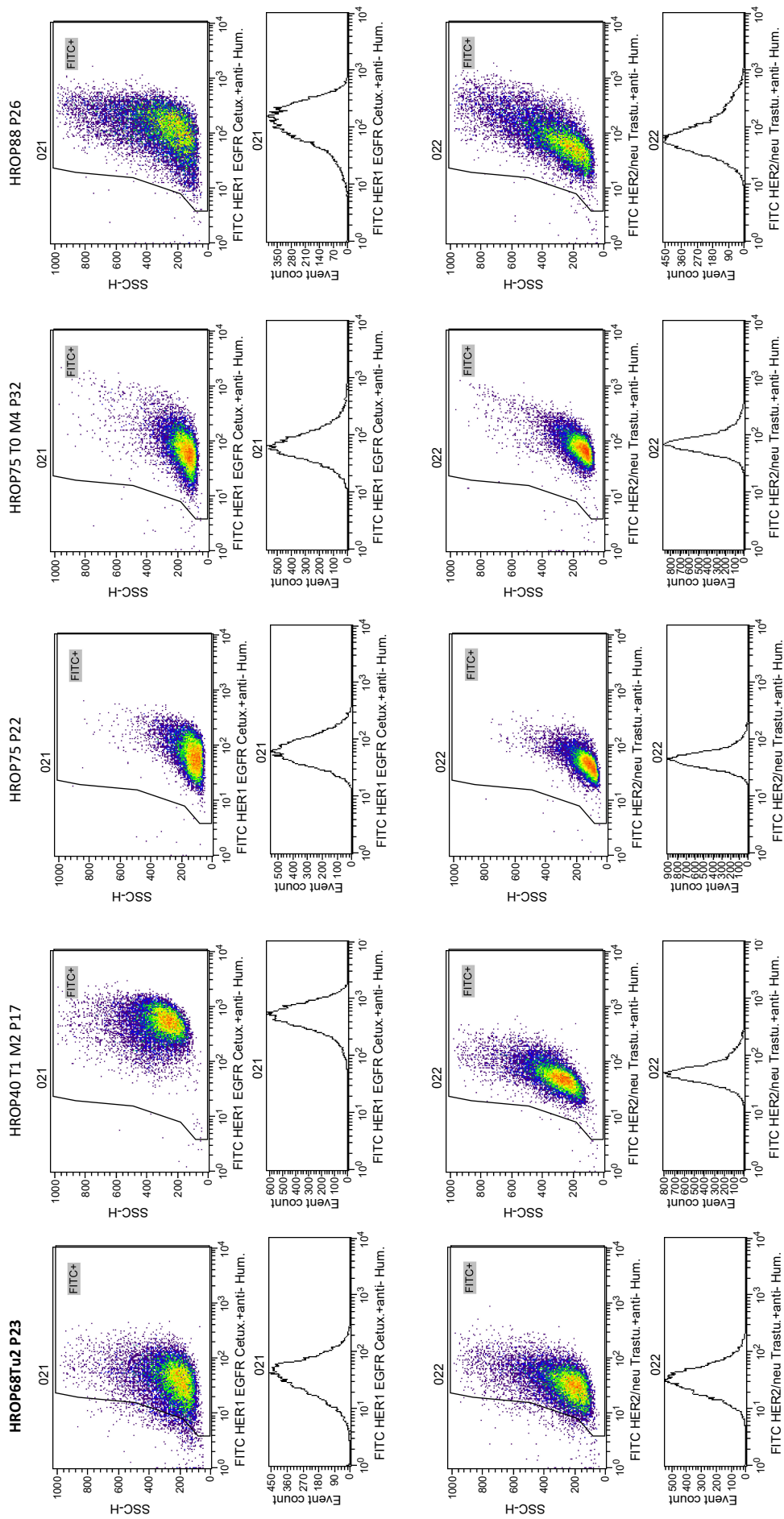


Abbildung 17: EGFR- und HER-2-Expression

Anmerkung. Die Expression der humanen-epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR (HER-1) und HER-2 (Färbeansätze 21 und 22) wurden als *Density-Plots* mit den dazugehörigen Histogrammen dargestellt. Der Übersicht wegen ist die Expression aus lediglich einer Passage dargestellt, die Mittelwerte der prozentualen Expression und MFIR sind im Text angegeben und auch in Abbildung 14 abzulesen. Die Abbildung wurden mit dem Programm FCSalyser 0.9.21 – alpha erstellt.

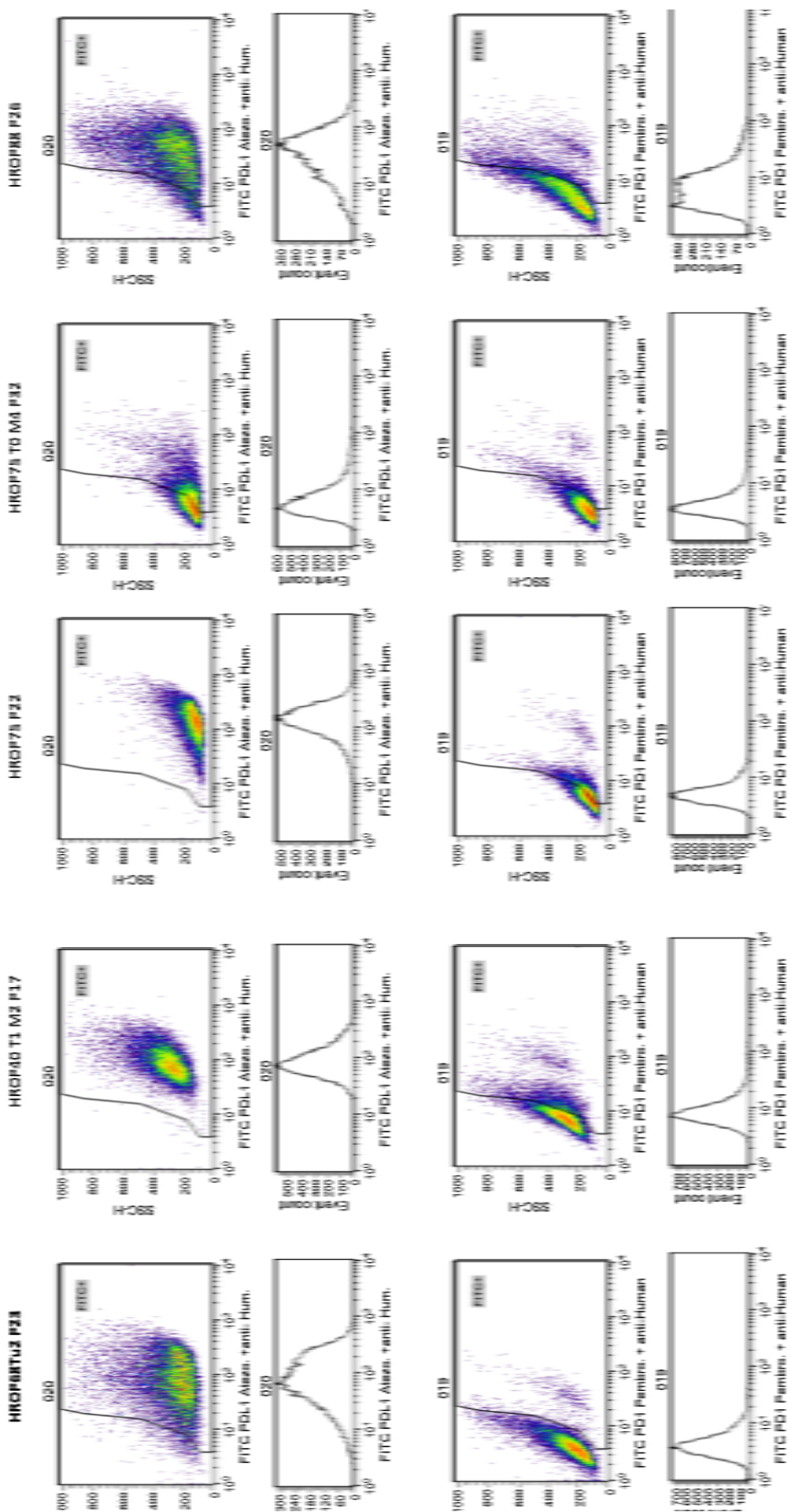


Abbildung 18: PD-L1- und PD-1-Expression

Anmerkung. Die Expression von PD-L1 und PD-1 (Färbensätze 20 und 19) wurden als *Density-Plots* mit den dazugehörigen Histogrammen dargestellt. Der Übersicht wegen ist die Expression aus lediglich einer Passage dargestellt; die Mittelwerte der prozentualen Expression und MFI sind im Text angegeben und auch in Abbildung 14 abzulesen. Die Abbildung wurden mit dem Programm FCSalyser 0.9.21 – alpha erstellt.

Literaturverzeichnis

- Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., Redston, M. S., & DePinho, R. A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 17(24), 3112-3126. <https://doi.org/10.1101/gad.1158703>
- Anaka, M., Hudson, C., Lo, P. H., Do, H., Caballero, O. L., Davis, I. D., Dobrovic, A., Cebon, J., & Behren, A. (2013). Intratumoral genetic heterogeneity in metastatic melanoma is accompanied by variation in malignant behaviors. *BMC Med Genomics*, 6, 40. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-40>
- Anderson, A. R., Weaver, A. M., Cummings, P. T., & Quaranta, V. (2006). Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*, 127(5), 905-915. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.042>
- Andre, T., Berton, D., Curigliano, G., Sabatier, R., Tinker, A. V., Oaknin, A., Ellard, S., de Braud, F., Arkenau, H. T., Trigo, J., Gravina, A., Kristeleit, R., Moreno, V., Abdeddaim, C., Vano, Y. A., Samouelian, V., Miller, R., Boni, V., Torres, A. A., . . . Banerjee, S. (2023). Antitumor Activity and Safety of Dostarlimab Monotherapy in Patients With Mismatch Repair Deficient Solid Tumors: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Netw Open*, 6(11), e2341165. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.41165>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., . . . Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592), 47-52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>
- Baleeiro, R. B., Bouwens, C. J., Liu, P., Di Gioia, C., Dunmall, L. S. C., Nagano, A., Gangeswaran, R., Chelala, C., Kocher, H. M., Lemoine, N. R., & Wang, Y. (2022). MHC class II molecules on pancreatic cancer cells indicate a potential for neo-antigen-based immunotherapy. *Oncoimmunology*, 11(1), 2080329. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2080329>
- Balsano, R., Zanuso, V., Pirozzi, A., Rimassa, L., & Bozzarelli, S. (2023). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Immune Checkpoint Inhibitors: The Gray Curtain of Immunotherapy and Spikes of Lights. *Curr Oncol*, 30(4), 3871-3885. <https://doi.org/10.3390/curroncol30040293>
- Barton, C. M., Staddon, S. L., Hughes, C. M., Hall, P. A., O'Sullivan, C., Kloppel, G., Theis, B., Russell, R. C., Neoptolemos, J., Williamson, R. C., & et al. (1991). Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 64(6), 1076-1082. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.467>
- Beauchemin, N., & Arabzadeh, A. (2013). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 32(3-4), 643-671. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9444-6>
- Begg, S. K. S., Birnbaum, D. J., Clark, J. W., Mino-Kenudson, M., Wellner, U. F., Schilling, O., Lillemoe, K. D., Warshaw, A. L., Castillo, C. F., & Liss, A. S. (2020). FOLFIRINOX Versus Gemcitabine-based Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Lessons from Patient-derived Cell Lines. *Anticancer Res*, 40(7), 3659-3667. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14355>
- Belyaev, O., & Uhl, W. (2019). Pankreaskarzinom – Pathologie, Ätiologie und diagnostisches Vorgehen. *Allgemein- und Viszeralchirurgie up2date*, 13, 495-508. <https://doi.org/10.1055/a-0953-2938>
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., & Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58(22), 5248-5257. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823339>
- 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & 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. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403>
- Bürtin, F., Matschos, S., Prall, F., Mullins, C. S., Krohn, M., & Linnebacher, M. (2021). Creation and Maintenance of a Living Biobank - How We Do It. *J Vis Exp*(170). <https://doi.org/10.3791/62065>
- Chakrabarti, S., Bucheit, L., Starr, J. S., Innis-Shelton, R., Shergill, A., Dada, H., Resta, R., Wagner, S., Fei, N., & Kasi, P. M. (2022). Detection of microsatellite instability-high (MSI-H) by liquid biopsy predicts robust and durable response to immunotherapy in patients with pancreatic cancer. *J Immunother Cancer*, 10(6). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004485>

- Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., . . . Frampton, G. M. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>
- Chand, S., O'Hayer, K., Blanco, F. F., Winter, J. M., & Brody, J. R. (2016). The Landscape of Pancreatic Cancer Therapeutic Resistance Mechanisms. *Int J Biol Sci*, 12(3), 273-282. <https://doi.org/10.7150/ijbs.14951>
- Chang, M. C., Wu, C. H., Yang, S. H., Liang, P. C., Chen, B. B., Jan, I. S., Chang, Y. T., & Jeng, Y. M. (2017). Pancreatic cancer screening in different risk individuals with family history of pancreatic cancer-a prospective cohort study in Taiwan. *Am J Cancer Res*, 7(2), 357-369. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337383>
- Ciardello, F., & Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 358(11), 1160-1174. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0707704>
- Ciccolini, J., Serdjebi, C., Peters, G. J., & Giovannetti, E. (2016). Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol*, 78(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3003-0>
- Clark, C. E., Hingorani, S. R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D. A., & Vonderheide, R. H. (2007). Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*, 67(19), 9518-9527. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0175>
- Conradt, L., Godt, K., Schaab, C., Tebbe, A., Eser, S., Diersch, S., Michalski, C. W., Kleeff, J., Schnieke, A., Schmid, R. M., Saur, D., & Schneider, G. (2011). Disclosure of erlotinib as a multikinase inhibitor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*, 13(11), 1026-1034. <https://doi.org/10.1593/neo.111016>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., & Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817-1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Chone, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., . . . the Unicancer, G. I. P. G. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*, 379(25), 2395-2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*, 13(11), 828-851. <https://doi.org/10.1038/nrd4389>
- de Jesus, V. H. F., Donadio, M. D. S., de Brito, A. B. C., & Gentili, A. C. (2024). A narrative review on rare types of pancreatic cancer: should they be treated as pancreatic ductal adenocarcinomas? *Ther Adv Med Oncol*, 16, 17588359241265213. <https://doi.org/10.1177/17588359241265213>
- Dennaoui, R., Shrestha, H., & Wagner, K. U. (2021). Models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev*, 40(3), 803-818. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09989-9>
- Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Tao, C., De, T., Beals, B., Dykes, D., Noker, P., Yao, R., Labao, E., Hawkins, M., & Soon-Shiong, P. (2006). Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12(4), 1317-1324. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1634>
- Di Federico, A., Mosca, M., Pagani, R., Carloni, R., Frega, G., De Giglio, A., Rizzo, A., Ricci, D., Tavolari, S., Di Marco, M., Palloni, A., & Brandi, G. (2022). Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Why Do We Keep Failing? A Focus on Tumor Immune Microenvironment, Predictive Biomarkers and Treatment Outcomes. *Cancers (Basel)*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/cancers14102429>
- Diaz, L. A., Jr., Williams, R. T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J. R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J. G., Nowak, M. A., Kinzler, K. W., Oliner, K. S., & Vogelstein, B. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486(7404), 537-540. <https://doi.org/10.1038/nature11219>
- Dobrynin, Y. V. (1963). Establishment and Characteristics of Cell Strains from Some Epithelial Tumors of Human Origin. *J Natl Cancer Inst*, 31, 1173-1195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14071827>
- Esposito, I., Konukiewicz, B., Schlitter, A. M., & Kloppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*, 20(38), 13833-13841. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13833>
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*, 18(16), 4266-4276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3114>

- Ferrara, B., Pignatelli, C., Cossutta, M., Citro, A., Courty, J., & Piemonti, L. (2021). The Extracellular Matrix in Pancreatic Cancer: Description of a Complex Network and Promising Therapeutic Options. *Cancers (Basel)*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174442>
- Frangieh, C. J., Melms, J. C., Thakore, P. I., Geiger-Schuller, K. R., Ho, P., Luoma, A. M., Cleary, B., Jerby-Arnon, L., Malu, S., Cuoco, M. S., Zhao, M., Ager, C. R., Rogava, M., Hovey, L., Rotem, A., Bernatchez, C., Wucherpfennig, K. W., Johnson, B. E., Rozenblatt-Rosen, O., . . . Izar, B. (2021). Multimodal pooled Perturb-CITE-seq screens in patient models define mechanisms of cancer immune evasion. *Nat Genet*, 53(3), 332-341. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00779-1>
- Friedenson, B. (2005). BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed*, 7(2), 60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369438>
- Friedl, P., & Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), 992-1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Fujiwara-Tani, R., Sasaki, T., Takagi, T., Mori, S., Kishi, S., Nishiguchi, Y., Ohmori, H., Fujii, K., & Kuniyasu, H. (2022). Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cell Lines Stems from Reprogramming of Energy Metabolism. *Int J Mol Sci*, 23(14). <https://doi.org/10.3390/ijms23147824>
- Gaida, M. M., Welsch, T., Herpel, E., Tschaharganeh, D. F., Fischer, L., Schirmacher, P., Hansch, G. M., & Bergmann, F. (2012). MHC class II expression in pancreatic tumors: a link to intratumoral inflammation. *Virchows Arch*, 460(1), 47-60. <https://doi.org/10.1007/s00428-011-1175-x>
- Gandhi, V., Legha, J., Chen, F., Hertel, L. W., & Plunkett, W. (1996). Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Res*, 56(19), 4453-4459. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813140>
- Gao, H. L., Liu, L., Qi, Z. H., Xu, H. X., Wang, W. Q., Wu, C. T., Zhang, S. R., Xu, J. Z., Ni, Q. X., & Yu, X. J. (2018). The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in pancreatic cancer: A meta-analysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 17(2), 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.03.007>
- Ghiorzo, P. (2014). Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 20(31), 10778-10789. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i31.10778>
- Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 105(7), 452-458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
- Gillies, R. J., Didier, N., & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159(1), 109-113. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90314-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90314-3)
- Goggins, M., Offerhaus, G. J., Hilgers, W., Griffin, C. A., Shekher, M., Tang, D., Sohn, T. A., Yeo, C. J., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (1998). Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol*, 152(6), 1501-1507. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626054>
- Grapa, C. M., Mocan, T., Gonciar, D., Zdrehus, C., Mosteanu, O., Pop, T., & Mocan, L. (2019). Epidermal Growth Factor Receptor and Its Role in Pancreatic Cancer Treatment Mediated by Nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 14, 9693-9706. <https://doi.org/10.2147/IJN.S226628>
- Grunwald, V., & Hidalgo, M. (2003). Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 95(12), 851-867. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.12.851>
- Gutierrez, M. L., Munoz-Bellvis, L., & Orfao, A. (2021). Genomic Heterogeneity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Clinical Impact. *Cancers (Basel)*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174451>
- Haeberle, L., & Esposito, I. (2019). Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 4, 50. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.06.02>
- Hahn, S. A., Greenhalf, B., Ellis, I., Sina-Frey, M., Rieder, H., Korte, B., Gerdes, B., Kress, R., Ziegler, A., Raeburn, J. A., Campra, D., Grutzmann, R., Rehder, H., Rothmund, M., Schmiegler, W., Neoptolemos, J. P., & Bartsch, D. K. (2003). BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(3), 214-221. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.3.214>
- Hahn, S. A., Seymour, A. B., Hoque, A. T., Schutte, M., da Costa, L. T., Redston, M. S., Caldas, C., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., & et al. (1995). Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res*, 55(20), 4670-4675. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553647>
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*, 10(3), 727-742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
- Hartwig, W., & Buchler, M. W. (2013). Pancreatic Cancer: Current Options for Diagnosis, Staging and Therapeutic Management. *Gastrointest Tumors*, 1(1), 41-52. <https://doi.org/10.1159/000354992>

- Heinemann, V., Hertel, L. W., Grindey, G. B., & Plunkett, W. (1988). Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*, 48(14), 4024-4031. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3383195>
- Hiraoka, N., Ino, Y., Hori, S., Yamazaki-Itoh, R., Naito, C., Shimasaki, M., Esaki, M., Nara, S., Kishi, Y., Shimada, K., Nakamura, N., Torigoe, T., & Heike, Y. (2020). Expression of classical human leukocyte antigen class I antigens, HLA-E and HLA-G, is adversely prognostic in pancreatic cancer patients. *Cancer Sci*, 111(8), 3057-3070. <https://doi.org/10.1111/cas.14514>
- Hwang, C. I., Boj, S. F., Clevers, H., & Tuveson, D. A. (2016). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*, 238(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/path.4651>
- Ioannou, N., Dalglish, A. G., Seddon, A. M., Mackintosh, D., Guertler, U., Solca, F., & Modjtahedi, H. (2011). Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. *Br J Cancer*, 105(10), 1554-1562. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.396>
- Jun, E., Hong, S. M., Yoo, H. J., Kim, M. B., Won, J. S., An, S., Shim, I. K., Chang, S., Hoffman, R. M., & Kim, S. C. (2018). Genetic and metabolic comparison of orthotopic and heterotopic patient-derived pancreatic-cancer xenografts to the original patient tumors. *Oncotarget*, 9(8), 7867-7881. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23567>
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*(88). <https://doi.org/10.3791/51046>
- Kato, M., Shimada, Y., Tanaka, H., Hosotani, R., Ohshio, G., Ishizaki, K., & Imamura, M. (1999). Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer*, 85(4), 832-840. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990215\)85:4<832::aid-cncr10>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990215)85:4<832::aid-cncr10>3.0.co;2-7)
- Kciuk, M., Marciniak, B., & Kontek, R. (2020). Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci*, 21(14). <https://doi.org/10.3390/ijms21144919>
- Keane, M. G., Horsfall, L., Rait, G., & Pereira, S. P. (2014). A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open*, 4(11), e005720. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005720>
- Kim, M. J., Kim, M. S., Kim, S. J., An, S., Park, J., Park, H., Lee, J. H., Song, K. B., Hwang, D. W., Chang, S., Kim, K. P., Jeong, S. Y., Kim, S. C., & Hong, S. M. (2017). Establishment and characterization of 6 novel patient-derived primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines from Korean pancreatic cancer patients. *Cancer Cell Int*, 17, 47. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0416-8>
- Kim, M. S., Zhong, Y., Yachida, S., Rajeshkumar, N. V., Abel, M. L., Marimuthu, A., Mudgal, K., Hruban, R. H., Poling, J. S., Tyner, J. W., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., & Pandey, A. (2014). Heterogeneity of pancreatic cancer metastases in a single patient revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13(11), 2803-2811. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.038547>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., Brown, J. M., Bastidas, A. J., & Vierra, M. (2000). Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48(4), 919-922. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)00803-8](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)00803-8)
- Kornek, G., & Selzer, E. (2009). Targeted therapies in solid tumours: pinpointing the tumour's Achilles heel. *Curr Pharm Des*, 15(2), 207-242. <https://doi.org/10.2174/138161209787002906>
- Krempley, B. D., & Yu, K. H. (2017). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chin Clin Oncol*, 6(3), 25. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.15>
- Kyriazis, A. A., Kyriazis, A. P., Sternberg, C. N., Sloane, N. H., & Loveless, J. D. (1986). Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma Capan-2 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Res*, 46(11), 5810-5815. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3019537>
- Labori, K. J., Katz, M. H., Tzeng, C. W., Bjornbeth, B. A., Cvancarova, M., Edwin, B., Kure, E. H., Eide, T. J., Dueland, S., Buanes, T., & Gladhaug, I. P. (2016). Impact of early disease progression and surgical complications on adjuvant chemotherapy completion rates and survival in patients undergoing the surgery first approach for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma - A population-based cohort study. *Acta Oncol*, 55(3), 265-277. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1068445>
- Lambert, A., Gavoille, C., & Conroy, T. (2017). Current status on the place of FOLFIRINOX in metastatic pancreatic cancer and future directions. *Therap Adv Gastroenterol*, 10(8), 631-645. <https://doi.org/10.1177/1756283X17713879>
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubner, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., . . . Diaz, L. A.,

- Jr. (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357(6349), 409-413. <https://doi.org/10.1126/science.aan6733>
- Lennon, A. M., Wolfgang, C. L., Canto, M. I., Klein, A. P., Herman, J. M., Goggins, M., Fishman, E. K., Kamel, I., Weiss, M. J., Diaz, L. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Hruban, R. H. (2014). The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? *Cancer Res*, 74(13), 3381-3389. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0734>
- Leppanen, J., Lindholm, V., Isohookana, J., Haapasaari, K. M., Karihtala, P., Lehenkari, P. P., Saarnio, J., Kauppila, J. H., Karttunen, T. J., Helminen, O., & Huhta, H. (2019). Tenascin C, Fibronectin, and Tumor-Stroma Ratio in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 48(1), 43-48. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001195>
- Lieber, M., Mazzeita, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., & Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*, 15(5), 741-747. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910150505>
- Liot, S., Balas, J., Aubert, A., Prigent, L., Mercier-Gouy, P., Verrier, B., Bertolino, P., Hennino, A., Valcourt, U., & Lambert, E. (2021). Stroma Involvement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview Focusing on Extracellular Matrix Proteins. *Front Immunol*, 12, 612271. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.612271>
- Liston, D. R., & Davis, M. (2017). Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin Cancer Res*, 23(14), 3489-3498. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>
- Logsdon, C. D., Arumugam, T., & Ramachandran, V. (2015). Animal Models of Gastrointestinal and Liver Diseases. The difficulty of animal modeling of pancreatic cancer for preclinical evaluation of therapeutics. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309(5), G283-291. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00169.2015>
- Lu, C., Paschall, A. V., Shi, H., Savage, N., Waller, J. L., Sabbatini, M. E., Oberlies, N. H., Pearce, C., & Liu, K. (2017). The MLL1-H3K4me3 Axis-Mediated PD-L1 Expression and Pancreatic Cancer Immune Evasion. *J Natl Cancer Inst*, 109(6). <https://doi.org/10.1093/inci/djw283>
- Luchini, C., Brosens, L. A. A., Wood, L. D., Chatterjee, D., Shin, J. I., Sciammarella, C., Fiadone, G., Malleo, G., Salvia, R., Kryklyva, V., Piredda, M. L., Cheng, L., Lawlor, R. T., Adsay, V., & Scarpa, A. (2021). Comprehensive characterisation of pancreatic ductal adenocarcinoma with microsatellite instability: histology, molecular pathology and clinical implications. *Gut*, 70(1), 148-156. <https://doi.org/10.1136/gutnl-2020-320726>
- Lutz, E. R., Wu, A. A., Bigelow, E., Sharma, R., Mo, G., Soares, K., Solt, S., Dorman, A., Wamwea, A., Yager, A., Laheru, D., Wolfgang, C. L., Wang, J., Hruban, R. H., Anders, R. A., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2014). Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunol Res*, 2(7), 616-631. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0027>
- Lynch, H. T., Deters, C. A., Snyder, C. L., Lynch, J. F., Villeneuve, P., Silberstein, J., Martin, H., Narod, S. A., & Brand, R. E. (2005). BRCA1 and pancreatic cancer: pedigree findings and their causal relationships. *Cancer Genet Cytogenet*, 158(2), 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.01.032>
- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., & Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*, 16(9), 902-912. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Rosso, T., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2016). European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann Oncol*, 27(4), 725-731. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw022>
- Marabelle, A., Le, D. T., Ascierto, P. A., Di Giacomo, A. M., De Jesus-Acosta, A., Delord, J. P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A. R., Piha-Paul, S. A., Doi, T., Gao, B., Chung, H. C., Lopez-Martin, J., Bang, Y. J., Frommer, R. S., Shah, M., Gori, R., . . . Diaz, L. A., Jr. (2020). Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*, 38(1), 1-10. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02105>
- Masters, J. R. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3), 233-236. <https://doi.org/10.1038/35043102>
- Masters, J. R., Thomson, J. A., Daly-Burns, B., Reid, Y. A., Dirks, W. G., Packer, P., Toji, L. H., Ohno, T., Tanabe, H., Arlett, C. F., Kelland, L. R., Harrison, M., Virmani, A., Ward, T. H., Ayres, K. L., & Debenham, P. G. (2001). Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), 8012-8017. <https://doi.org/10.1073/pnas.121616198>
- Matschos, S., Burtin, F., Kdimati, S., Radefeldt, M., Krake, S., Prall, F., Engel, N., Krohn, M., Micheel, B., Kreutzer, M., Mullins, C. S., & Linnebacher, M. (2021). The HROC-Xenobank-A High Quality Assured PDX Biobank of >100 Individual Colorectal Cancer Models. *Cancers (Basel)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13235882>

- Matsuda, H., Seo, Y., Kakizaki, E., Kozawa, S., Muraoka, E., & Yukawa, N. (2005). Identification of DNA of human origin based on amplification of human-specific mitochondrial cytochrome b region. *Forensic Sci Int*, 152(2-3), 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.07.019>
- McQueen, H. A., Wyllie, A. H., Piris, J., Foster, E., & Bird, C. C. (1991). Stability of critical genetic lesions in human colorectal carcinoma xenografts. *Br J Cancer*, 63(1), 94-96. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.19>
- Misset, J. L. (1998). Oxaliplatin in practice. *Br J Cancer*, 77 Suppl 4(Suppl 4), 4-7. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.428>
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W., & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 25(15), 1960-1966. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9525>
- Moyer, A. M., Yu, J., Sinnwell, J. P., Dockter, T. J., Suman, V. J., Weinshilboum, R. M., Boughey, J. C., Goetz, M. P., Visscher, D. W., & Wang, L. (2019). Spontaneous murine tumors in the development of patient-derived xenografts: a potential pitfall. *Oncotarget*, 10(39), 3924-3930. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27001>
- Mullins, C. S., Micheel, B., Matschos, S., Leuchter, M., Bürtin, F., Krohn, M., Huhns, M., Klar, E., Prall, F., & Linnebacher, M. (2019). Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research. *Cancers (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101520>
- National Cancer Institute. (2022). *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Populations (1969-2020)* National Cancer Institute. Retrieved 08.05.2023 from
- Nedaeinia, R., Avan, A., Manian, M., Salehi, R., & Ghayour-Mobarhan, M. (2014). EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies. *Curr Drug Targets*, 15(14), 1293-1301. <https://doi.org/10.2174/1389450115666141125123003>
- Neesse, A., Algul, H., Tuveson, D. A., & Gress, T. M. (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut*, 64(9), 1476-1484. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309304>
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(6), 333-348. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>
- Neoptolemos, J. P., Moore, M. J., Cox, T. F., Valle, J. W., Palmer, D. H., McDonald, A. C., Carter, R., Tebbutt, N. C., Dervenis, C., Smith, D., Glimelius, B., Charnley, R. M., Lacaine, F., Scarfe, A. G., Middleton, M. R., Anthoney, A., Ghaneh, P., Halloran, C. M., Lerch, M. M., . . . European Study Group for Pancreatic, C. (2012). Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected periampullary adenocarcinoma: the ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial. *JAMA*, 308(2), 147-156. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.7352>
- Niu, B., Ye, K., Zhang, Q., Lu, C., Xie, M., McLellan, M. D., Wendl, M. C., & Ding, L. (2014). MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics*, 30(7), 1015-1016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt755>
- Nurwidya, F., Takahashi, F., Murakami, A., Kobayashi, I., Kato, M., Shukuya, T., Tajima, K., Shimada, N., & Takahashi, K. (2014). Acquired resistance of non-small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Respir Investig*, 52(2), 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2013.07.007>
- Ohta, T., Elnemr, A., Kitagawa, H., Kayahara, M., Takamura, H., Fujimura, T., Nishimura, G., Shimizu, K., Yi, S. Q., & Miwa, K. (2004). Fas ligand expression in human pancreatic cancer. *Oncol Rep*, 12(4), 749-754. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375495>
- Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., De Llorens, R., Brunet, J., & Menendez, J. A. (2008). Sequence-dependent synergism and antagonism between paclitaxel and gemcitabine in breast cancer cells: the importance of scheduling. *Int J Oncol*, 32(1), 113-120. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097549>
- Parkin, D. M., Boyd, L., & Walker, L. C. (2011). 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*, 105 Suppl 2(Suppl 2), S77-81. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.489>
- Patriarca, C., Macchi, R. M., Marschner, A. K., & Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev*, 38(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>
- Pishvaian, M. J., Blais, E. M., Brody, J. R., Lyons, E., DeArbeloa, P., Hendifar, A., Mikhail, S., Chung, V., Sahai, V., Sohal, D. P. S., Bellakbira, S., Thach, D., Rahib, L., Madhavan, S., Matrisian, L. M., & Petricoin, E. F., 3rd. (2020). 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*, 21(4), 508-518. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30074-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30074-7)

- Promega. (2022). Technical Manual PowerPlex 16 System. In T. P. S. L.-S. Information. (Ed.). www.promega.com/protocols/: Promega.
- Quevedo, R., Smirnov, P., Tkachuk, D., Ho, C., El-Hachem, N., Safikhani, Z., Pugh, T. J., & Haibe-Kains, B. (2020). Assessment of Genetic Drift in Large Pharmacogenomic Studies. *Cell Syst*, 11(4), 393-401 e392. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.08.012>
- Quint, K., Tonigold, M., Di Fazio, P., Montalbano, R., Lingelbach, S., Ruckert, F., Alinger, B., Ocker, M., & Neureiter, D. (2012). Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*, 41(6), 2093-2102. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1648>
- 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. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Ratnayake, B., Savastyuk, A. Y., Nayar, M., Wilson, C. H., Windsor, J. A., Roberts, K., French, J. J., & Pandanaboyana, S. (2020). Recurrence Patterns for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma after Upfront Resection Versus Resection Following Neoadjuvant Therapy: A Comprehensive Meta-Analysis. *J Clin Med*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/jcm9072132>
- Richmond, A., & Su, Y. (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech*, 1(2-3), 78-82. <https://doi.org/10.1242/dmm.000976>
- Rivera, M., Fichtner, I., Wulf-Goldenberg, A., Sers, C., Merk, J., Patone, G., Alp, K. M., Kanashova, T., Mertins, P., Hoffmann, J., Stein, U., & Walther, W. (2021). Patient-derived xenograft (PDX) models of colorectal carcinoma (CRC) as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine. *Neoplasia*, 23(1), 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.11.005>
- Robert Koch Institut. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. <https://doi.org/DOI.10.25646/8353>
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 57(9), 1731-1734. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135016>
- Rückert, F., Aust, D., Böhme, I., Werner, K., Brandt, A., Diamandis, E. P., Krautz, C., Hering, S., Saeger, H. D., Grützmann, R., & Pilarsky, C. (2012). Five primary human pancreatic adenocarcinoma cell lines established by the outgrowth method. *J Surg Res*, 172(1), 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.04.021>
- Saad, M., & Saikaly, E. (2022). Medullary Carcinoma of the Pancreas: Report of a Rare Pancreatic Malignancy and Review of Literature. *EMJ Gastroenterology*. <https://doi.org/10.33590/emjgastroenterol/21-00140>
- Sade-Feldman, M., Jiao, Y. J., Chen, J. H., Rooney, M. S., Barzily-Rokni, M., Eliane, J. P., Bjorgaard, S. L., Hammond, M. R., Vitzthum, H., Blackmon, S. M., Frederick, D. T., Hazar-Rethinam, M., Nadres, B. A., Van Seventer, E. E., Shukla, S. A., Yizhak, K., Ray, J. P., Rosebrock, D., Livitz, D., . . . Hacohen, N. (2017). Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun*, 8(1), 1136. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01062-w>
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 737-749. <https://doi.org/10.1038/nrc2229>
- Samdani, R. T., Hechtman, J. F., O'Reilly, E., DeMatteo, R., & Sigel, C. S. (2015). EBV-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the pancreas: Case report with targeted sequencing analysis. *Pancreatology*, 15(3), 302-304. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.03.016>
- Schiff, P. B., & Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(3), 1561-1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1561>
- Schilsky, R. L. (1998). Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Oncology (Williston Park)*, 12(10 Suppl 7), 13-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830619>
- Schlitter, A., Kasajima, A., Groß, C., Konukiewitz, B., & Klöppel, G. (2019). Pathologie des PDAC: Übersicht und Neues. *Info Hämatologie + Onkologie*, 22, 10-15. <https://doi.org/10.1007/s15004-019-6744-1>
- Seetharam, R., Sood, A., & Goel, S. (2009). Oxaliplatin: pre-clinical perspectives on the mechanisms of action, response and resistance. *Ecancermedicalscience*, 3, 153. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2009.153>
- Seufferlein, T., Mayerle, J., Bock, S., Brunner, T., Ettrich, T. J., Grenacher, L., Gress, T. M., Hackert, T., Heinemann, V., Kestler, A., Sinn, M., Tannapfel, A., Wedding, U., & Uhl, W. (2022). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom – Langversion 2.0 – Dezember 2021 – AWMF-Registernummer: 032/010OL. *Z Gastroenterol*, 60(11), e812-e909. <https://doi.org/10.1055/a-1856-7346>
- Sherr, C. J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(10), 731-737. <https://doi.org/10.1038/35096061>

- Shichi, Y., Gomi, F., Sasaki, N., Nonaka, K., Arai, T., & Ishiwata, T. (2022). Epithelial and Mesenchymal Features of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines in Two- and Three-Dimensional Cultures. *J Pers Med*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/jpm12050746>
- Sobin LH, G. M., Wittekind C. (2009). TNM Classification of Malignant Tumours. 7th Edition.
- Solomon, S., Das, S., Brand, R., & Whitcomb, D. C. (2012). Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J*, 18(6), 485-491. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318278c4a6>
- Sorrentino, M. F., Kim, J., Foderaro, A. E., & Truesdell, A. G. (2012). 5-fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature. *Cardiol J*, 19(5), 453-458. <https://doi.org/10.5603/cj.2012.0084>
- Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3), 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017>
- Sui, M., Xiong, X., Kraft, A. S., & Fan, W. (2006). Combination of gemcitabine antagonizes antitumor activity of paclitaxel through prevention of mitotic arrest and apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 5(8), 1015-1021. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.8.2909>
- Taboada, R. G., Arruda Almeida, M. F., Santiago, K. M., Carraro, D. M., Nunes, W. A., Diniz, A. L., Felismino, T. C., & de Jesus, V. H. F. (2025). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma with Medullary Features and a Complete Pathological Response After Neoadjuvant FOLFIRINOX: A Case Report and Literature Review. *J Gastrointest Cancer*, 56(1), 42. <https://doi.org/10.1007/s12029-024-01140-5>
- Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., Chen, S., Klein, A. P., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Chen, L. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*, 4(127), 127ra137. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>
- Tempero, M. A., Pelzer, U., O'Reilly, E. M., Winter, J., Oh, D. Y., Li, C. P., Tortora, G., Chang, H. M., Lopez, C. D., Bekaii-Saab, T., Ko, A. H., Santoro, A., Park, J. O., Noel, M. S., Frassinetti, G. L., Shan, Y. S., Dean, A., Riess, H., Van Cutsem, E., . . . Investigators, A. (2022). Adjuvant nab-Paclitaxel + Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *J Clin Oncol*, JCO2201134. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01134>
- Trujillano, D., Bertoli-Avella, A. M., Kumar Kandaswamy, K., Weiss, M. E., Koster, J., Marais, A., Paknia, O., Schroder, R., Garcia-Aznar, J. M., Werber, M., Brandau, O., Calvo Del Castillo, M., Baldi, C., Wessel, K., Kishore, S., Nahavandi, N., Eyaid, W., Al Rifai, M. T., Al-Rumayyan, A., . . . Abou Jamra, R. (2017). Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet*, 25(2), 176-182. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.146>
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*, 378(9791), 607-620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Vineis, P., Schatzkin, A., & Potter, J. D. (2010). Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*, 31(10), 1703-1709. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq087>
- von Bernstorff, W., Spanjaard, R. A., Chan, A. K., Lockhart, D. C., Sadanaga, N., Wood, I., Peiper, M., Goedegebuure, P. S., & Eberlein, T. J. (1999). Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. *Surgery*, 125(1), 73-84. <https://doi.org/10.1067/msy.2099.93570>
- von den Driesch, J., Flöttmann, J., Prall, F., Mullins, C. S., Linnebacher, M., & Bürtin, F. (2022). HROP68: A rare case of medullary pancreatic cancer-characterization and chemosensitivity of the first patient-derived cell line. *Front Oncol*, 12, 1082927. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1082927>
- Vonderheide, R. H., Bajor, D. L., Winograd, R., Evans, R. A., Bayne, L. J., & Beatty, G. L. (2013). CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 62(5), 949-954. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1427-5>
- Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J. L., & Seymour, L. (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res*, 9(11), 4227-4239. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519650>
- Wachsmann, M. B., Pop, L. M., & Vitetta, E. S. (2012). Pancreatic ductal adenocarcinoma: a review of immunologic aspects. *J Invest Med*, 60(4), 643-663. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31824a4d79>
- Wagner, S., Beger, N. T., Matschos, S., Szymanski, A., Przybylla, R., Bürtin, F., Prall, F., Linnebacher, M., & Mullins, C. S. (2021). Tumour-Derived Cell Lines and Their Potential for Therapy Prediction in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/cancers13184717>
- Wang, L., Xie, D., & Wei, D. (2019). Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. *Methods Mol Biol*, 1882, 299-308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8879-2_26

- Wei, K., & Hackert, T. (2021). Surgical Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081971>
- Wilentz, R. E., Goggins, M., Redston, M., Marcus, V. A., Adsay, N. V., Sohn, T. A., Kadkol, S. S., Yeo, C. J., Choti, M., Zahurak, M., Johnson, K., Tascilar, M., Offerhaus, G. J., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (2000). Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol*, 156(5), 1641-1651. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65035-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65035-3)
- Wong, M. C. S., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., & Sung, J. J. Y. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Sci Rep*, 7(1), 3165. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02997-2>
- Xie, D., & Xie, K. (2015). Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes Dis*, 2(2), 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.01.002>
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5), 559-564. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.002>
- Yamamoto, K., Venida, A., Perera, R. M., & Kimmelman, A. C. (2020). Selective autophagy of MHC-I promotes immune evasion of pancreatic cancer. *Autophagy*, 16(8), 1524-1525. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1769973>
- Yan, X., Chen, D., Ma, X., Wang, Y., Guo, Y., Wei, J., Tong, C., Zhu, Q., Lu, Y., Yu, Y., Wu, Z., & Han, W. (2022). CD58 loss in tumor cells confers functional impairment of CAR T cells. *Blood Adv*, 6(22), 5844-5856. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007891>
- Yardley, D. A. (2013). nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J Control Release*, 170(3), 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.041>
- Yu, Y., Yang, G., Huang, H., Fu, Z., Cao, Z., Zheng, L., You, L., & Zhang, T. (2021). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma: challenges and opportunities in the era of precision medicine. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01787-5>
- Yunis, A. A., Arimura, G. K., & Russin, D. J. (1977). Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer*, 19(1), 128-135. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190118>
- Zeng, M., Feng, Q., Lu, M., Zhou, J., Yang, Z., & Tang, J. (2018). Predictive role of skin rash in advanced pancreatic cancer patients treated with gemcitabine plus erlotinib: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther*, 11, 6633-6646. <https://doi.org/10.2147/OTT.S168418>
- Zeng, S., Pottler, M., Lan, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., & Yang, H. (2019). Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184504>
- Zhang, L., Liu, Y., Wang, X., Tang, Z., Li, S., Hu, Y., Zong, X., Wu, X., Bu, Z., Wu, A., Li, Z., Li, Z., Huang, X., Jia, L., Kang, Q., Liu, Y., Sutton, D., Wang, L., Luo, L., & Ji, J. (2015). The extent of inflammatory infiltration in primary cancer tissues is associated with lymphomagenesis in immunodeficient mice. *Sci Rep*, 5, 9447. <https://doi.org/10.1038/srep09447>
- Zhao, B., Qin, C., Li, Z., Wang, Y., Li, T., Cao, H., Yang, X., Li, T., & Wang, W. (2022). Multidrug resistance genes screening of pancreatic ductal adenocarcinoma based on sensitivity profile to chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell Int*, 22(1), 374. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02785-7>
- Zheng, L. (2017). PD-L1 Expression in Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 109(6). <https://doi.org/10.1093/inci/djw304>
- Zoetemelk, M., Ramzy, G. M., Rausch, M., & Nowak-Sliwinska, P. (2020). Drug-Drug Interactions of Irinotecan, 5-Fluorouracil, Folinic Acid and Oxaliplatin and Its Activity in Colorectal Carcinoma Treatment. *Molecules*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112614>

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Innsbruck, 01.04.2025
Ort, Datum


Jens von den Driesch

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ihm danke ich für die ständige Betreuung und für das Korrigieren der Arbeit.

Einen besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. rer. hum. Sandra Schwarz für die geduldige Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und die Korrektur der ersten Versionen dieser Arbeit aussprechen. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. med. Florian Bürtin für das zur Verfügung stellen der klinischen Daten.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Team der Arbeitsgruppe, welches mich herzlich in ihre Reihen aufnahm. Ich möchte Herrn Matthias Krohn für die geduldige Einarbeitung und für die Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor danken. Zusammen mit Inga Schönberg-Richter etablierte er in den vergangenen Jahren die hier verwendeten Zelllinien, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellen. Darüber hinaus führte er die Cytochrom-B-PCR und in Zusammenarbeit mit Annika Brüsewitz die STR-Analyse durch. Auch möchte ich Herrn Randy Przybilla für die Einarbeitung in die Methodik und Auswertung vieler Experimente danken.

Des Weiteren gilt mein Dank den kooperierenden Instituten der Universitätsmedizin Rostock, wie der Pathologie und Biochemie. Auch dem Unternehmen Centogene danke für die Durchführung der DNA-Analysen im Rahmen des PiCoP-Projektes.

Schließlich möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken, denn ohne ihre Unterstützung wären weder mein Studium noch diese Promotion möglich gewesen.